

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

**PARTICIPAÇÃO HEPÁTICA E EFEITO GLICOCORTICOIDE
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR
Aeromonas hydrophila EM TILÁPIA DO NILO, INTOXICADA
POR CCl₄**

Alessandra Cristina de Moraes

Medica Veterinária

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

**PARTICIPAÇÃO HEPÁTICA E EFEITO GLICOCORTICOIDE
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR
Aeromonas hydrophila EM TILÁPIA DO NILO, INTOXICADA
POR CCl₄**

Alessandra Cristina de Moraes
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).

2014

M827p Moraes, Alessandra Cristina de
Participação hepática e efeito glicocorticoide na resposta
inflamatória aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápia do
Nilo, intoxicada por CCl₄ / Alessandra Cristina de Moraes. --
Jaboticabal, 2014
vii, 57 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. Hepatotoxicidade. 2. Xenobiótico. 3. Bioquímico. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993:639.31



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

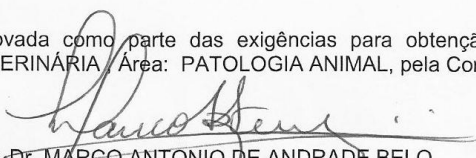
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

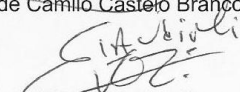
TÍTULO: PARTICIPAÇÃO HEPÁTICA E EFEITO GLICOCORTICOIDE NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIA DO NILO, INTOXICADA POR CCl₄

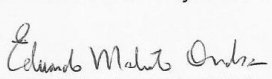
AUTORA: ALESSANDRA CRISTINA DE MORAES

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Aprovada 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: 27 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALESSANDRA CRISTINA DE MORAES – Natural de Muzambinho – MG, nascido em 08 de fevereiro de 1986, Médica Veterinária. Ingressou em 2007 no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO, campus Descalvado (SP), concluído a graduação no ano de 2011. 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. Foi representante discente do Conselho Universitário da UNICASTELO, órgão máximo desta instituição (2008 – 2011). 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).

*Por que preocupar-se com
o futuro e muito menos com o
passado, se na vida temos apenas
que cultivar alma e os sentimentos que o
restante tudo nos será acrescentado.*

(autor desconhecido)

Aos meus pais

José Vitor De Moraes E Margarida Maria De Moraes

Dedico pela compreensão e carinho.

À

Ed Johnny da Rosa Prado

Ofereço por dedicar-se a este trabalho intensamente.

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar a *DEUS*, por ter me dado à oportunidade da evolução espiritual.
- As vidas cedidas a este estudo. Espero que estejam muito bem onde quer que estejam.
- Ao meu marido Ed Johnny da Rosa Prado, pela intensa dedicação para sucesso deste trabalho.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo pelo incentivo e orientação à pesquisa desde a graduação.
- A Elizabeth Prada Foz pela recepção, carinho e trabalho durante o período experimental.
- A piscicultura Pirajuba, pelo fornecimento de infraestrutura para o alojamento dos peixes.
- Aos colegas Roberto e Vanessa, os quais estiveram sempre de pronto auxílio.
- A Francisca de Assis Ardisson pela confecção das laminas histológicas e respectivas colorações.
- A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - FCAV - campus de Jaboticabal em especial ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de fazer parte do corpo discente.
- E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.
- Destaque ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pela concessão de bolsa institucional.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	I
CEUA.....	II
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 Inflamação em Teleósteos.....	2
3.2 Fígado em peixes teleósteos.....	4
3.3 Tetracloreto de carbono.....	5
3.4 Anti-inflamatório esteroidal	6
3.5 <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4.1 Peixes e acondicionamento.....	8
4.2 Delineamento experimental.....	10
4.3 Isolamento de bactérias do gênero <i>Aeromonas hydrophila</i>	11
4.4 Preparação do inóculo bacteriano e Indução do processo inflamatório.....	12
4.6 Administração do tetracloreto de carbono (CCl ₄).....	13
4.7 Administração de dexametasona.....	16
4.8 Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória	16
4.9 Avaliação do eritrograma, contagem total e diferencial de leucócitos.....	17
4.10 Bioquímica sérica.....	18
4.11 Avaliação de índice somático.....	18
4.12 Estudo histopatológico.....	19
4.13 Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Avaliação do acúmulo celular na aerocistite.....	19
5.2 Avaliação do hemograma na aerocistite.....	22
5.2.1 Trombograma e Leucograma.....	22
5.2.2 Estudo eritrocitário.....	25
5.3 Avaliação bioquímica.....	27
5.4 Estudo do índice hepático, esplênico e renal somático.....	30
5.5 Avaliação do histopatológico.....	32
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	47
8. CONSIDERAÇÃO FINAL.....	48
9. REFERÊNCIAS.....	48



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 001040/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Estudo da participação hepática e do efeito glicocorticóide na resposta inflamatória aguda em tilápias do nilo desafiadas 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 Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de fevereiro de 2013.

Jaboticabal, 05 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

**PARTICIPAÇÃO HEPÁTICA E EFEITO GLICOCORTICOIDE NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila*, EM TILÁPIA DO NILO,
INTOXICADA POR CCl₄**

RESUMO – Este estudo objetivou avaliar a participação hepática e efeito glicocorticoide sobre a resposta inflamatória em tilápias do Nilo desafiadas com *Aeromonas hydrophila*, submetidas ou não a hepatotoxicidade induzida pelo CCl₄. Para a realização desta investigação, 130 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de 150g, oriundos da mesma desova, foram distribuídas aleatoriamente em 13 tanques com capacidade de 2500L de água cada, constituindo quatro tratamentos: NN = sem CCl₄ e sem glicocorticoide; CN = com CCl₄ e sem glicocorticoide; NG = sem CCl₄ e com glicocorticoide; CG = com CCl₄ e com glicocorticoide. Um 13º tanque foi composto de peixes não submetidos a nenhum tipo de manipulação para constituir os valores de referência para o estudo (PF). Para todos os grupos foram amostrados 10 animais. A administração do CCl₄ foi realizada na cavidade celomática em dose única de 0,5 mL.Kg⁻¹ de p.v. nos grupos CN e CG, enquanto a dexametasona foi administrada via IM na região dorso-lateral esquerda na concentração de 0,2% na dose de 2mg Kg⁻¹ de p.v. nos tratamentos NG e CG. Ambas as administrações foram realizadas no momento de inoculação da cepa de *A. hydrophila*. Em 6, 24 e 48 HPI (horas pós inoculação), foram colhidos: o exsudato inflamatório para quantificação e avaliação das células inflamatórias; amostras de sangue para avaliação hematológica e bioquímica; feita avaliação somática e histológica do fígado e baço. Como resultado destacamos transtorno hepático gerado pelo CCl₄. Este acarretou diversas alterações no mecanismo da resposta inflamatória em tilápias do Nilo como diminuição da síntese de proteínas e formação de degeneração gordurosa hepática, bem com alteração do metabolismo energético apresentando muitas vezes efeito sinérgico quando associado ao efeito imunossupressor da dexametasona, sugerindo a ocorrência de diminuição na produção de fatores de coagulação, mediadores químicos da inflamação e inibição de receptores de membrana celular.

Palavras-chave: esteatose; bioquímico; hemograma; hepatotoxicidade; *Oreochromis niloticus*; xenobiótico.

**PARTICIPATION AND HEPATIC GLUCOCORTICOID EFFECTS ON ACUTE
INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY *Aeromona hydrophila*,
INTOXICATED BY CCl₄**

ABSTRACT - This study evaluated the hepatic participation and the glucocorticoid effect on the inflammatory response in Nile tilapia challenged with *Aeromonas hydrophila*, submitted or not to by CCl₄. Conducting this research, 130 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) hepatotoxicity with average weight 150g, from the same spawning, were randomly distributed into 13 tanks with a capacity of 2500L of water each, in four treatments: NN = no CCl₄ and without glucocorticoids, CN = with CCl₄ and without glucocorticoids, NG = no CCl₄ and glucocorticoid, CG = with CCl₄ and glucocorticoids. A 13 ° tank was composed of fish not subjected to any manipulation to provide reference values for the study (PF). For all groups 10 animals were sampled. The administration of CCl₄ was performed on coelomic cavity in a single dose of 0.5 mL. kg⁻¹ and the CG CN groups, while dexamethasone was administered intramuscularly in the left dorso lateral region in the concentration of 0.2% at a dose of 2mg Kg⁻¹ bw in NG and CG treatments. Both administrations were performed at the time of inoculation strain of *A. hydrophila*. In 6, 24 and 48 HPI (hours post inoculation) were harvested: the inflammatory exudate for quantification and evaluation of inflammatory cells, blood samples for hematological and biochemical evaluation; made somatic and histological assessment of the liver and spleen was made. As a result include liver disorder generated by CCl₄. This led to several harmful changes in the mechanism of the inflammatory response in Nile tilapia as decreased protein synthesis and the formation of fatty liver degeneration, and with altered energy metabolism often presenting synergistic effect when combined with the immunosuppressive effect of dexamethasone, suggesting the occurrence of decreased production of coagulation factors, chemical mediators of inflammation and inhibition of cell membrane receptors.

Keywords: steatosis; biochemical; blood count; hepatotoxicity; *Oreochromis niloticus*; xenobiotic

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Valores médios e respectivos desvios padrão da qualidade de água...	9
Tabela 2- Distribuição das tilápias nos tratamentos.....	10
Tabela 3 - Pré-ensaios com tetracloreto de carbono para indução de lesão hepática transitória, disposta cronologicamente.....	14
Tabela 4- Contagem diferencial celular de exsudato inflamatório proveniente aerocistite de tilápias do Nilo nos tratamentos.....	20
Tabela 5- Resposta diferencial leucocitária observada em tilápias do Nilo nos tratamento.....	23
Tabela 6- Resposta sérica-vermelha em tilápias do Nilo nos tratamento	26
Tabela 7- Resposta bioquímica-sérico em tilápias do Nilo nos tratamentos.....	28
Tabela 8- Resposta bioquímica-sérico em tilápias do Nilo nos tratamentos.....	29
Tabela 9- Valores médios $\pm$ erro padrão dos índices somático hepático, renal e esplênico.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura.1- Tanque para acondicionamento dos peixes.....	9
Figura.2- Comparação de sequência genética obtida por PCR no GenBank.....	12
Figura.3- A: Inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> na região dorso lateral esquerdo, ao final do opérculo; B: aerocistite acentuada.....	13
Figura 4- A: Administração de CCL4 via IP; Fotomicrografias: B: Histopatológico de fígado de tilápias 6 horas após receberem CCL4, MERCK®, via Intraperitoneal (IP); coloração HE; C:Histopatológico de fígado de tilápias 6 horas após receberem, MERCK®, IP; D: Histopatológico de fígado de tilápias 24 horas após receberem CCL4, MERCK®, IP; E: Histopatológico de fígado de tilápias 48 horas após receberem CCL4, MERCK®, IP; F: Histopatológico fígado de tilápias sem nenhum tratamento. Barra= 10µm. Coloração Sudan Black.....	15
Figura 5- Fotografia da administração de dexametasona, via intramuscular na região dorso-lateral esquerdo.....	16
Figura 6- Fotomicrografia de uma alíquota de exsudato em câmara de Neubauer.....	17
Figura 7- A: punção de vaso caudal; B:separação de alíquota para obtenção de soro; C: contagem de células sanguíneas em câmara de neubauer.....	18
Figura 9- Células provenientes do exsudato: A- granulócito; B- macrófago; C- linfócito, D- trombócito.....	22
Figura 10- Fotomicrografia da bexiga natatória: A - grupo PF; B - grupo CG, 48 HPI; C - grupo CN, 48 HPI; D - grupo CN, 48 HPI; E - grupo NG, 48 HPI; F – grupo NN, 48 HPI. Cruz:serosa parietal, Bolinha: serosa interna, seta: camada epitelial. Coloração HE. 400X.....	33
Figura 11- Fotomicrografia do fígado 6 horas após indução da aerocistite infeccioso: A- grupo PF; B- grupo CN 6 HPI; C - grupo CG 6 HPI; D- grupo NG 6 HPI; E- grupo NN 6 HPI. Hepatócito(seta vermelha), veia central (seta preta), sinusóide (seta amarela). Coloração HE. 400X.....	34
Figura 12- Fotomicrografia esplênica, 48 HPI: A - grupo PF; B – grupo NN; C - grupo CG. Eritrócitos (setas preta). Coloração HE. 400x.....	35
Figura 13- Fotomicrografia esplênica, 24 HPI: A e B - grupo PF; C e D - grupo NN; E e F - grupo CG. Eritrócitos (seta preta). Imagens B, D e F foram submetidos a leitura por contraste de fase com filtro verde para melhor destaque dos eritrócitos. Coloração HE. 400x.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase
AST – Aspartato aminotransferase
C3a e C5a – proteínas do sistema complemento
CG – Peixes inoculados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com CCl₄ e dexametasona
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
CN – Peixes inoculados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com CCl₄
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Crebio – Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica
FA – Fosfatase alcalina
FC – Receptor de superfície celular: "Fragment crystallizable"
FDA – Food & Drug Administration
GLM – General Linear Modo
g L⁻¹ – Grama por litro
gm.dL⁻¹ – Grama por decilitro
HB – Hemoglobina
HPI – Horas após inóculo
HT – Hematócrito
IC – Intracelomática
ICAM-1 – intercellular adhesion molecule-1
IES – Índice esplenio somático
Ig – Imunoglobulinas
IHS – Índice hepatossomático
IL-2 – Interleucina 2
ILPs – Peptídeos semelhantes à insulina
INS – Índice nefrossomático
IS – Índice somático
IM – Intramuscular
LDH – Lactato desidrogenase
LPS – lipopolissacarídeos
NaCl – Cloreto de sódio
NG – Peixes inoculados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com dexametasona
NK – Células natural Killers
NN – Peixes somente inoculados com *Aeromonas hydrophila*
PC – Peso corporal
PF – Padrão fisiológico
PO – Peso do órgão
SAS – Statistical Analyses System
SC – Subcutâneo
Tf – Transferinas
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TSI – Trílice-açúcar-ferro
UFC – Unidades formadoras de colônias
VCM – Volume corpuscular médio
VCAM-1 – Moléculas de aderência de células vasculares 1.
YSI – Incorporated in Yellow Springs

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da demanda por produtos derivados da aquicultura intensificou a necessidade de investimentos em novas tecnologias, objetivando a maximização dos recursos produtivos, associado à sustentabilidade dos sistemas de criação. O elevado adensamento populacional, a alta taxa de matéria orgânica no ecossistema aquático, a diminuição da qualidade da água, a manipulação excessiva dos animais, entre outros, favorecem a ocorrência de estresse nos peixes (HIRSCH et al., 2006; YOUSEFIAN & AMIRI, 2009), condição fisiológica responsável por elevar significativamente os níveis circulantes de cortisol endógeno (BARTON & IWAMA, 1991). Este esteróide exerce importantes efeitos glicocorticoides em processos neoglicogênicos e na supressão dos mecanismos de defesa dos animais, tornando-os mais susceptíveis ao ataque de patógenos (BELO et al., 2005).

Os peixes estão, no entanto, expostos a vários produtos químicos naturais e sintéticos originados das atividades agrícolas e industriais em seu ambiente aquático, assim como, o uso indiscriminado de antibióticos, antiparasitários, antifúngicos e outros produtos químicos em grande quantidade para prevenir e controlar as doenças em plantéis aquícolas. Estes compostos podem atuar como xenobióticos para os peixes, e em muitos casos comprometem processos metabólicos fundamentais para a integridade do organismo (CABELLO, 2006).

Neste contexto, o fígado participa efetivamente do metabolismo da maioria destes compostos químicos, realizando pelo menos 1.500 funções bioquímicas essenciais para a sobrevivência do indivíduo (CENTER, 2004). Em mamíferos, o fígado apresenta células de defesa residentes como linfócitos natural killers (NK) e células de Kupffer, além de participar da produção de componentes do sistema complemento e proteínas reagentes da fase aguda (FRIEDMAN, 2008), cujas concentrações sofrem significativas variações quando em contato com lipopolissacarídeos bacterianos (ABBAS, 2008), assim mostrando-se como um importante sítio de regulação do sistema imune inato durante processos infecciosos e inflamatórios. No entanto, muitas destas funções não estão bem definidas em peixes teleósteos (SATO et al., 2003).

A proposta visa investigar em condições experimentais controladas, o efeito transitório da debilidade hepática induzida pelo CCl₄ e/ou de elevadas concentrações de corticosteroides sobre a resposta de defesa das tilápias frente ao desafio com *Aeromonas hydrophila*, buscando compreender melhor a participação hepática associada ou não ao efeito glicocorticoide da dexametasona na fisiopatologia da resposta inflamatória aguda.

2. OBJETIVOS

Os objetivos foram

- Induzir alteração hepática transitória pela administração de CCl₄ via I.C.
- Induzir resposta inflamatória local por inóculo de *A.hidrophila* em bexiga natatória durante a vigência do transtorno hepático.
- Mimetizar o efeito do estresse pela administração da dexametasona.
- Avaliar o acúmulo celular no foco inflamatório,
- Avaliar a resposta do hemograma,
- Avaliar a resposta bioquímica sérica,
- Avaliar a relação peso do órgão e peso do corpo do animal,
- Avaliar a histopatologia do fígado e baço.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Inflamação em Teleósteos

A inflamação desenvolve-se por uma agressão local a um tecido vivo vascularizado, ocorrendo como resposta inespecífica, caracterizada por uma série de alterações que tendem a limitar os efeitos lesivos ao organismo, tornando-se um processo modulado variando de amplitude com a intensidade do estímulo, sendo 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 (GARCIA LEME, 1989).

Em peixes teleósteos, há o acúmulo de células no foco lesado e fagocitose por células competentes. Havendo a produção de peptídeos para controle microbiano, atividade de lisozima, sistema complemento e outras proteínas sanguíneas (COLONNA et al., 2006).

Por inoculação de carragenina na bexiga natatória de *O. niloticus* e *P. mesopotamicus* houve uma resposta inflamatória caracterizada por congestão vascular, acúmulo de células mononucleares e raros granulócitos (MATUSHIMA & MARIANO, 1996; MARTINS et al., 2006). A inoculação de *Aeromonas hydrophila* inativada, tioglicolato e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* na bexiga natatória de *P. mesopotamicus*, demonstrou após 24 horas maior acúmulo de exsudato com presença marcante de trombócitos e em menor quantidade linfócitos, seguidos de macrófagos e granulócitos (BOZZO et al., 2007), o mesmo foi notado por Claudiano et al. (2013). No entanto, Endo et al. (1997) com a injeção de LPS na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* houve a formação de exsudato constituído principalmente por neutrófilos (96%) 24 horas depois da aplicação, o mesmo acúmulo de granulócitos foi encontrado por Moraes et al. (2011) em estímulo por *Aeromonas hydrophila* na mesma espécie.

A reação inflamatória segue por uma resposta sistêmica conhecida por resposta de fase aguda. Em mamíferos, esta resposta caracteriza-se por febre, produção de diversos hormônios, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. As citocinas, como IL-1, IL-6, e TNF- α produzidas no local de inflamação, desempenham papel crucial na resposta de fase aguda, induzindo a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (BILATE, 2007; ABBAS, 2008).

A albumina e todas as outras proteínas, com exceção das imunoglobulinas, são sintetizadas pelo fígado, incluindo o fibrinogênio e as alfa-globulinas. As imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM e IgE) são sintetizadas no tecido linfóide resultantes da diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e estes em anticorpos em resposta à estimulação antigênica, e estão incluídas nas frações beta e gama-globulinas (ECKERSALL, 2008).

O pico de produção das proteínas de fase aguda geralmente ocorre entre 12 e 24 horas após o início da resposta inflamatória aguda. Entre as proteínas de fase aguda, destaca-se a proteína-C-reativa, uma vez que seu nível sérico aumenta aproximadamente 1.000 vezes durante a inflamação aguda e tem potencial para ligar-se a uma variedade de patógenos, ativa as proteínas do sistema complemento que resulta na deposição de C3b na superfície do microrganismo. Este processo facilita a fagocitose dos patógenos mediada por fagócitos que expressam receptor para C3b (BILATE, 2007).

3.2 Fígado em peixes teleósteos

O fígado desempenha importantes funções para o organismo como: no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos; secreção de sais e ácidos biliares; armazenamento de lipídios e vitaminas; biotransformação de substâncias tóxicas, drogas, hormônios e medicamentos. As funções do fígado ainda incluem filtração e armazenamento de sangue, ferro e formação de fatores de coagulação (GUYTON & HALL, 2011).

Em teleósteos, o fígado recebe o volume de sangue previamente filtrado pelas brânquias, tendo grande importância na desintoxicação e eliminação de diversas substâncias do organismo (GIRÓN-PÉREZ et al., 2007). Em ambiente natural os peixes estão sujeitos ao ataque de agentes biológicos e químicos, levando a formação de centros melanomacrófagos no fígado, rim e baço dos peixes (ROBERTS, 2012; CAMPOS et al., 2008;). Essas estruturas contêm pigmentos como a melanina, hemossiderina, lipofucsina e pigmento lipogênico. Estes podem auxiliar nos mecanismos de defesa sendo observada em infecção por *Aeromonas hydrophila* (ROBERTS, 2012). Ainda, a melanina pode absorver ou neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (ZUASTI et al., 1998), tem importância na produção de compostos bactericidas especialmente peróxido de hidrogênio (WOLKE et al., 1985).

O fígado dos peixes apresenta lentidão do fluxo sanguíneo em relação ao débito cardíaco, e o fluxo biliar circula 50 vezes mais lento, tornando mais vagarosa a

depuração de produtos tóxicos, portanto resultando em maior tempo de ação para os produtos químicos (GINGERICH, 1982). Sugerindo a hipótese de que substâncias tóxicas em concentrações mais baixas possam causar severos transtornos hepáticos quando comparados aos mamíferos (CAMPOS et al., 2008).

A exposição do tecido hepático a agentes químicos constitui um importante risco à saúde, causando injúria pela produção de radicais livres que iniciam o processo de lipoperoxidação ou por depleção de componentes endógenos de antioxidantes glutatiônicos (PAWA & ALI, 2004). Entre as substâncias químicas utilizadas como modelos para o estudo da intoxicação e regeneração hepatocelular estão o tetracloreto de carbono (CCl_4), D-Galactosamina, a tioacetamida e o acetaminofen, além do etanol (PAWA & ALI, 2004).

3.3 Tetracloreto de carbono

O tetracloreto de carbono (CCl_4) caracteriza-se por ser um agente químico hepatotóxico seletivo, atuando como xenobiótico na indução de estresse oxidativo, causando severas injúrias no tecido hepático (KANTER et al., 2005), sendo amplamente usado para estudo de compostos hepatoprotetores (KONERI et al., 2008; BELO et al., 2009; BELO et al., 2012). Em mamíferos, o CCl_4 é principalmente metabolizado no fígado pelo sistema citocromo P450, estimulando a produção de radicais livres, levando a peroxidação lipídica e lesão da membrana do hepatócito (LEE et al., 2006). De acordo com BASU (2003), estes provocam necrose aos hepatócitos, induzem a inflamação e promovem uma maior progressão da fibrose.

Statham et al. (1978) provaram que peixes são tão sensíveis ao CCl_4 quanto mamíferos. Ribergh & Lipsky (1997) observaram efeito dose dependente na liberação de lactato desidrogenase (LDH) e alanina aminotransferase (ALT) em culturas primárias de hepatócitos de truta arco-íris após intoxicação com CCl_4 . Lesões oxidativas foram observadas em hepatócitos de *Cyprinus carpio* intoxicados com CCl_4 (YIN et al., 2011; JIA et al., 2011).

Em exposição ao CCl_4 , notou-se aumento da atividade do aspartato aminotransferase (AST) e ALT em *Oncorhynchus mykiss* (CHEN et al., 2004;

RACICOT et al., 1975; STATHAM et al., 1978), *Oncorhynchus* sp (SAKAGUCHI & HAMAGUCHI, 1975) e *Parophrys vetulus* (CASILLAS et al., 1983), apresentando pico de concentração em 24 horas, perdurando concentrações elevadas por vários dias. Em teleósteos expostos a toxicidade do CCl₄ ocorre aumento de glicose, creatina quinase, Fosfatase Alcalina, uréia, creatinina e magnésio, assim como, diminuição do colesterol, potássio, proteína total e albumina (FOLMAR, 1993).

Nos peixes, as lesões comumente observadas em estudos de toxicidade aguda por tetracloreto de carbono incluem áreas de necrose focal, difusa ou laminar e necrose subcapsular, mas sem lesão de centros lobulares (GINGERICH, 1982). No entanto, também existem relatos indicando menor toxicidade do CCl₄ em peixes quando comparados aos mamíferos (HINTON et al., 2001). Tal fato é atribuído à inexistência de células Kupffer no fígado de peixes, que estariam associadas com o aumento da toxicidade ao tetracloreto de carbono (SAUER et al., 1997; HINTON et al., 2001).

3.4 Anti-inflamatório esteroideal

A dexametasona possui potente ação anti-inflamatória e imunossupressora uma vez que seu efeito leva a inibição da produção de várias citocinas. Diferente de outros análogos, este fármaco apresenta propriedades anguínas e coídes reduzidas. É cerca de vinte e cinco a trinta vezes mais potente que seu análogo natural, o cortisol (PARFITT et al., 1999), que em peixes teleósteos participa da regulação do equilíbrio hidromineral, do metabolismo energético, além de suprimir o sistema imunológico e a capacidade reprodutiva dos animais (WENDELAAR BONGA, 1997).

O modo de ação está relacionado à inibição da fosfolipase A₂, responsável pela conversão enzimática de fosfolipídeos de membrana em ácido aracdônico (BOOTH, 1992), impedindo assim a formação de produtos das vias cicloxigenase e lipoxigenase.

Dentre as ações desta droga destaca-se: a diminuição do número de leucócitos na área inflamada; diminuição da função dos macrófagos teciduais e de outras células apresentadoras de antígenos no combate a microorganismos intracelulares; à diminuição na liberação de radicais tóxicos do oxigênio por neutrófilos e macrófagos; a diminuição da função auxiliadora (*helper*) de linfócitos T; a diminuição da proliferação

clonal de linfócitos T por queda da produção de IL-2; as alterações no curso da resposta imune; a queda na função de fibroblastos com diminuição da produção de colágenos e glicosaminoglicanos; a interferência negativa na produção de mediadores inflamatórios como leucotrienos, prostaglandinas, fator de agregação plaquetária e componentes do complemento (BOUMPAS et al., 1993).

Em tilápias do Nilo tratados com dexametasona mediante vacinação e desafio com *Aeromonas hydrophila*, observou-se diminuição da contagem celular no exsudato com 6 horas de evolução da resposta inflamatória, sendo este efeito supressor observado principalmente no número de granulócitos, caracterizando a ação antiinflamatória do glicocorticóide na fase aguda da formação dos anguínas e liberação de enzimas pro-inflamatórias, diminuindo a permeabilidade vascular e migração de leucócitos para o foco lesado, no entanto animais tratados com dexametasona e vacinados 48 horas após desafio com *Aeromonas hydrophila* apresentaram quadro de leucocitose correspondente ao aumento de linfócitos, neutrófilos e monócitos (MORAES et al., 2011), este efeito de aumento do número de leucócitos no foco lesado sugerem a diminuição da biodisponibilidade da dexametasona no organismo e consequentemente diminuição da atividade anti-inflamatória (SMITH et al., 2007).

3.5 *Aeromonas hydrophila*

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

Esta bactéria faz parte da microbiota dos peixes (BARJA & ESTEVES, 1988), sendo considerada oportunista, se manifestam em hospedeiros debilitados ou infectados por outros patógenos (DOOLEY & TRUST, 1988; MERINO et al., 1995). Nestes casos, o estresse, principalmente provocado por condições ambientais e fisiológicas adversas, é considerado um fator predisponente ao aparecimento da doença causada por bactéria (MERINO et al., 1995).

Os fatores de risco predisponentes incluem alterações bruscas de temperatura, elevadas densidades de estocagem, poluição orgânica, hipóxia, entre outros. As aeromonas móveis geralmente invadem feridas na pele, comumente causadas por infecções por fungos ou ectoparasitos (NOGA,1986).

Os sinais clínicos característicos da aeromonose são a septicemia hemorrágica, petéquias distribuídas por toda a superfície corporal do animal, anemia, corrosão de nadadeira, ulcerações oculares, eritrodermatite, escamas protusas, exoftalmia e distensão da cavidade celomática por ascite (AUSTIN & AUSTIN, 1999).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, aeromonose é considerada uma doença de veiculação hídrica para os seres humanos, apresentado grande importância para a saúde pública (MERINO et al., 1995). Em seres humanos, esta bactéria pode causar febre, dor abdominal, vômito, angúinea, meningite, endocardite, septicemia e inflamação do tecido conjuntivo, além de infecções respiratórias e intestinais, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (JANDA & ABBOTT, 1998). Segundo o órgão regulamentador americano FDA (2012), a aeromonose pode causar quadro séptico principalmente em pessoas com quadro de cirrose, leucemia, carcinoma, que recebam tratamento com medicamentos imunossupressivos ou quimioterápicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Peixes e acondicionamento

Para a realização deste estudo foram utilizadas 130 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Gift, masculinizadas com peso médio de $130 \pm 25\text{g}$, oriundos da mesma desova, acondicionadas em 13 tanques com 2000L de água cada (figura 1), portanto mantendo a densidade durante o estudo de $0,65 \text{ kg m}^{-3}$. Os tanques foram abastecidos com água corrente de superfície proveniente de nascentes, com vazão de 1 L min^{-1} . Após o transporte, os peixes foram aclimatados durante 30 dias para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltassem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos

em peixes de NaCl na concentração de $6,0 \text{ gL}^{-1}$ (CARNEIRO & URBINATI, 2001). Os animais receberam ração comercial peletizada Socil® (42% de proteína bruta e 4000 kcal de energia bruta kg). O arraçoamento dos peixes foi realizado duas vezes ao dia, alimentados pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa dos tanques.



Figura.1- Tanque para acondicionamento dos peixes.

Parâmetros físicos e químicos da água foram aferidos entre as 07:00 as 08:00 para as variáveis temperatura($^{\circ}\text{C}$) e concentração de oxigênio dissolvido(a.L^{-1}) utilizando a sonda YSI, modelo 55 e o potencial hidrogeniônico (pH) e a condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) utilizando a sonda YSI, modelo 63. Os resultados mantiveram constante ao longo do período experimental (tabela 1) e estão de acordo com o conforto para desempenho de tilápias (SIMPAÚBA-TAVARES,1995).

Tabela 1- Valores médios e respectivos desvios padrão da qualidade de água.

Parâmetro	Período				
	Abril	Maio			
	Aclimação	0HPI ¹	6HPI	24HPI	48HPI
Potencial hidrogeniônico (pH)	$6,3 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$89 \pm 2,3$	$90,0 \pm 1,5$	$90,6 \pm 2,2$	$91,0 \pm 2,0$	$90,8 \pm 1,5$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$26 \pm 1,8$	$25,3 \pm 0,3$	$25,2 \pm 0,8$	$25,2 \pm 0,8$	$25,0 \pm 0,5$
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	$5,3 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,5$	$5,8 \pm 0,6$	$5,8 \pm 1,0$	$6,0 \pm 0,5$
¹ Horas após inoculação (HPI)					

Os protocolos de pesquisa e tratamento dos animais foram de acordo com os princípios e recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Jaboticabal/SP, com processo n°: 01040/13.

4.2 Delineamento experimental

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 13 caixas com capacidade de 2500L de água cada, constituindo quatro tratamentos: CG = com CCl₄ e com glicocorticoide; CN = com CCl₄ e sem glicocorticoide; NG = sem CCl₄ e com glicocorticoide; NN = sem CCl₄ e sem glicocorticoide. Sendo amostrados 10 animais por tratamento em três períodos, isto é: seis, 24 e 48 horas após desafio bacteriano, para a avaliação da resposta no tempo, constituindo 12 grupos experimentais. O 13° grupo foi composto de peixes não submetidos a nenhuma tipo manipulação, constituindo os valores de referência para o estudo denominado PF = Padrão Fisiológico (tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição das tilápias nos tratamentos.

Grupo	Tratamento	HPI ¹			
		0	6	24	48
CG	Inoculado ² + com tetracloreto de carbono + com glicocorticóide	-	N= 10	N= 10	N= 10
CN	Inoculado + com tetracloreto de carbono + sem glicocorticóide	-	N= 10	N= 10	N= 10
NG	Inoculado + sem tetracloreto de carbono + com glicocorticóide	-	N= 10	N= 10	N= 10
NN	Inoculado + sem tetracloreto de carbono + sem glicocorticóide	-	N= 10	N= 10	N= 10
PF	Padrão fisiológico ³	N=10	-	-	-

¹ HPI: horas após inoculação

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

³ Não sofre nenhum tipo de manipulação antes da coleta dos dados.

Para todas as manipulações, os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 (para tratamento e desafio) e 1:500 (para eutanásia). Inicialmente, dilui-se a benzocaína álcool 98% (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (Matushima, 1988). Após o manuseio experimental, os animais foram retornados as caixas com fluxo de água contínuo e aeração.

4.3 Isolamento da bactéria do gênero *Aeromonas hydrophila*

A cepa de *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 realizadas culturas das cepas com posterior plaqueamento seletivo em placas contendo agar vermelho de fenol-amido-ampicilina e agar 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*, 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 e que apresentaram forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas, foram repicadas em agar triplice-açúcar-ferro (TSI) (SAAD et al., 1995). Após incubação a 28°C por 24 horas, culturas apresentando reação ácida, tanto na base como no bisel, com ou sem formação de gás, foram novamente repicadas em agar 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 com as características de motilidade, resistência ao agente vibriostático e oxidase e catalase positivas, foram considerados como de *Aeromonas* sp.

Para confirmação da espécie como *Aeromonas hydrophila*, foi feita extração do DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene 16S rDNA e sequenciamento do produto de PCR.

As sequências obtidas foram visualizadas e manipuladas no programa Sequencer 5.0 (Gene Codes Corporation), Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – Crebio (UNESP Jaboticabal, SP)

Com a ferramenta BLASTn ([ang://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), o fragmento foi comparado com as sequências depositadas no GenBank ([ang://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)), admitindo-se concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade da sequência. O resultado do sequenciamento confirmou a espécie como *Aeromonas hydrophila* subespécie *dhakensis* (figura 2):

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Aeromonas punctata strain ATCC 15468 16S ribosomal RNA, partial sequence	1508	1508	94%	0.0	99%	NR_029252.1
Aeromonas hydrophila subsp. dhakensis strain : LMG 19562 16S ribosomal RNA, complete sequence	1507	1507	94%	0.0	99%	NR_042155.1
Aeromonas enteropneustes strain DSM 6394 16S ribosomal RNA, complete sequence	1471	1471	94%	0.0	99%	NR_044846.1
Aeromonas salmonicida subsp. poftnehtica strain 34met 16S ribosomal RNA, partial sequence	1427	1427	94%	0.0	98%	NR_025001.1
Aeromonas molluscorum strain R43 16S ribosomal RNA, partial sequence	1427	1427	94%	0.0	98%	NR_025002.1
Aeromonas salmonicida strain JCM7873 16S ribosomal RNA, complete sequence	1427	1427	94%	0.0	98%	NR_040829.1
Aeromonas popoffii strain LMG 317541 16S ribosomal RNA, partial sequence	1427	1427	94%	0.0	98%	NR_025317.1
Aeromonas hydrophila strain B59F 16S ribosomal RNA, partial sequence	1424	1424	94%	0.0	97%	NR_043005.1

Figura 2- Comparação de sequência genética obtida por PCR no GenBank.

4.4 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 centrífuga 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 (BOZZO et al., 2007).

Para verificação da eficácia de indução do processo inflamatório na bexiga natatória, fez-se um pré-ensaio inoculando 1 mL do inóculo de *Aeromonas hydrophila*

($6,0 \times 10^6$ UFC). Em 48 horas após o inoculação coletou-se o conteúdo formado na bexiga natatória para análise em microscopia, com a confirmação da dose de 1mL como efetiva para indução de aerocistite sem comprometimento vital pelo período de 48 horas. Neste sentido foi injetado 1 mL do inóculo de *Aeromonas hydrophila* a 1 cm do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa estéril de 1ml, para atingir a bexiga natatória anterior. 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.

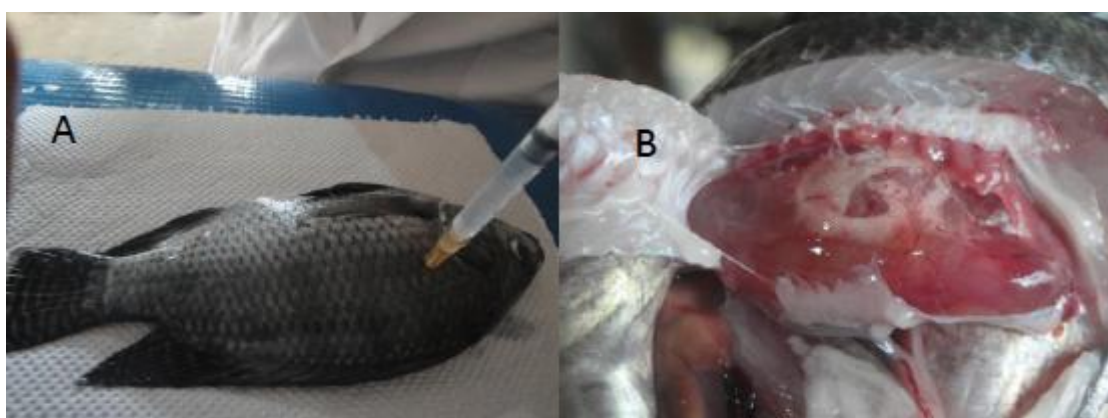


Figura. 3- A: Inoculação de *Aeromonas hydrophila* na região dorso lateral esquerdo, ao final do opérculo; B: aerocistite acentuada.

4.6 Administração do tetracloreto de carbono (CCl_4)

Para determinação da dose de tetracloreto de carbono foram realizados pré ensaios com distintas doses, vias de administração e marcas de tetracloreto de carbono, analisadas em diferentes períodos (tabela 3). O resultado eficaz do pré-ensaio correspondeu a marca MERCK na dose única de $0,5 \text{ mL kg}^{-1}$, homogeneizado com azeite de oliva na proporção de 1:1, v:v, administrado por via intracelomática(IC) no momento do desafio(figura 3). Portanto, realizou-se a administração de CCl_4 nos grupos CG e CN nas condições descritas. Os demais grupos foram submetidos à aplicação de solução fisiológica estéril em mesmo volume e local para padronização do estímulo de estresse de captura e manipulação.

Tabela 3 - Pré-ensaios com tetracloreto de carbono para indução de lesão hepática transitória, disposta cronologicamente.

N ¹	Dose	Marca	Óleo ²	Via ³	Avaliação ⁴	AST/ALT ⁵	Histopatológico ⁶	Sobrevida ⁷	Lesão ⁸
5	2 mL	Synth	não	IC	24	alto	*	não	sim
5	2 mL	Synth	não	IM	24	alto	*	não	sim
5	0,5 mL	Dinamica	sim	IC	48, 72 e 7dias	padrão	*	sim	não
5	0,5 mL	Dinamica	não	IC	48, 72 e 7dias	padrão	*	sim	não
5	0,5 mL	Dinamica	sim	SC	48, 72 e 7dias	padrão	HE	sim	sim
5	0,5 mL	Dinamica	não	SC	48, 72 e 7dias	padrão	HE	sim	sim
3	1 mL	Dinamica	sim	IC	48, 72	padrão	HE	sim	não
3	1 mL	Dinamica	não	IC	48, 73	padrão	HE	sim	não
3	3 x 0,5	Synth	não	IC	24, 48	*	HE	não	sim
3	3 X 0,5	Synth	não	IC	24, 49	*	HE	não	sim
3	3 x 0,5	Dinamica	sim	IC	24, 50	*	HE	não	sim
3	3 X 0,5	Dinamica	não	IC	24, 51	*	HE	não	sim
3	1 mL	Dinamica	sim	IC	6, 24, 48	*	sudamblack -	sim	não
3	0,5 mL	Dinamica	sim	IC	6, 24, 48	*	sudamblack -	sim	não
3	0,5 mL	synth	sim	IC	6, 24, 48	*	sudamblack -	sim	não
3	0,5 mL	Merck	sim	IC	6, 24, 48	*	sudamblack +	sim	não

1 Número de animais por período de avaliação

2 Homogenização com azeite de oliva na proporção de 1:1

3 Via de administração do tetracloreto de carbono.

4 Tempo decorrido após administração da última dose para coleta de dados do grupo.

5 Dosagem das enzimas séricas AST e ALT

6 Realização de histológico para verificação de formação de esteatose; HE: coloração de hematoxilina-Eosina;

Sudan Black: coloração específica para gordura.

7 Capacidade de sobreviver durante o período analisado.

8 Formação de lesão no local da aplicação.

* Não realizado o procedimento

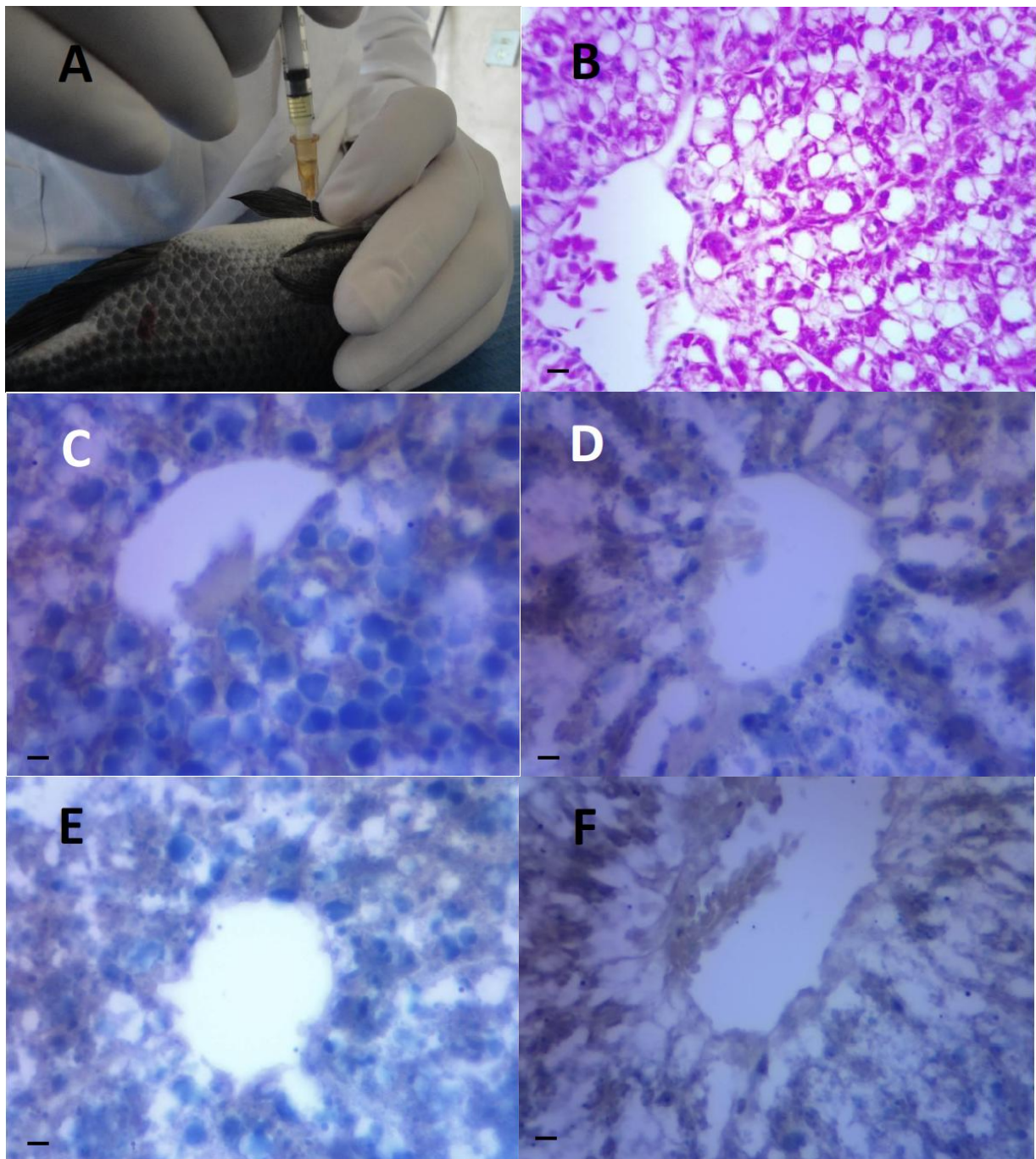


Figura 4- A: Administração de CCl_4 via IP; Fotomicrografias: B: Histopatológico de fígado de tilápias 6 horas após receberem CCl_4 , MERCK®, via celomática (IC); coloração HE; C :Histopatológico de fígado de tilápias 6 horas após receberem CCl_4 , MERCK®, IC; D: Histopatológico de fígado de tilápias 24 horas após receberem CCl_4 , MERCK®, IC; E: Histopatológico de fígado de tilápias 48 horas após receberem CCl_4 , MERCK®, IC; F: Histopatológico de fígado de tilápias sem nenhum tratamento. Barra= 10 μm . Coloração Sudan Black.

4.7 Administração de dexametasona

A administração da dexametasona (Cortvet[®]) foi realizada no momento da inoculação bacteriana, nos grupos CG e NG, via intramuscular na região dorso-lateral esquerdo na concentração de 0,2% na dose de 2mg/kg de peso vivo, segundo Moraes et al. (2011). Os demais grupos foram submetidos à aplicação de solução fisiológica estéril em mesmo local e volume administrado de dexametasona para padronização do estímulo de estresse de captura e manipulação.



Figura 5- Fotografia da administração de dexametasona via intramuscular na região dorso-lateral esquerdo.

4.8 Avaliação do exsudato inflamatório induzido na 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 gelada de PBS, contendo EDTA a 0,09%, à esquerda do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa estéril de 1mL para atingir a bexiga natatória anterior.

Em seguida, realizou-se a necropsia. Com auxílio de instrumentos cirúrgicos, expôs a bexiga natatória, e recolheu-se o volume total do exsudato com pipeta Pasteur estéril e descartável, o volume recolhido foi transferido para tubo falcon e mantidos posteriormente em temperatura de refrigeração. A solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada a 1000 rpm por cinco minutos em centrífuga clínica. O sobrenadante foi

desprezado, o sedimento total ressuspensionado 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. 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 granulócitos realizou-se a extensão de uma gota do sedimento total ressuspensionado em lâmina histológica. Nesta lâmina previamente foi feita uma extensão de soro de tilápia. Após fixou-se em álcool metílico, por um minuto e posterior coloração. 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 acumulados no foco inflamatório.

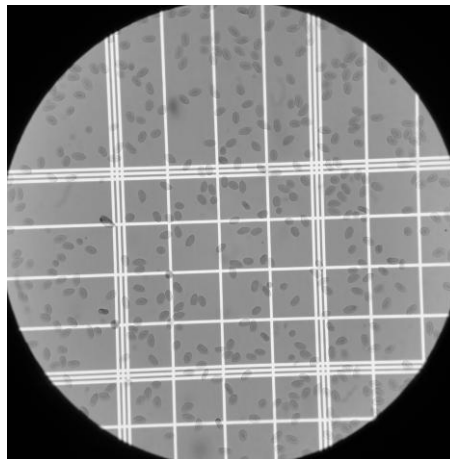


Figura 6- Fotomicrografia de uma alíquota de exsudato
em câmara de Neubauer

4.9 Avaliação do eritrograma, contagem total e diferencial de leucócitos

Foram colhidas amostras de sangue com anticoagulante heparina por punção de vaso caudal às 6, 24 e 48 horas após desafio bacteriano. Para a determinação da contagem de eritrócitos e leucócitos totais em câmara de Neubauer utilizou-se a solução de Natt e Herrick (1952) com diluente na proporção de 1 :100. Os eritrócitos foram quantificados nos cinco quadrantes secundários em diagonal do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 5000. Para 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 do diferencial de leucócitos no sangue realizou-se em extensões anguínas a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia com May-Grünwald-Giensa-Wright (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003)

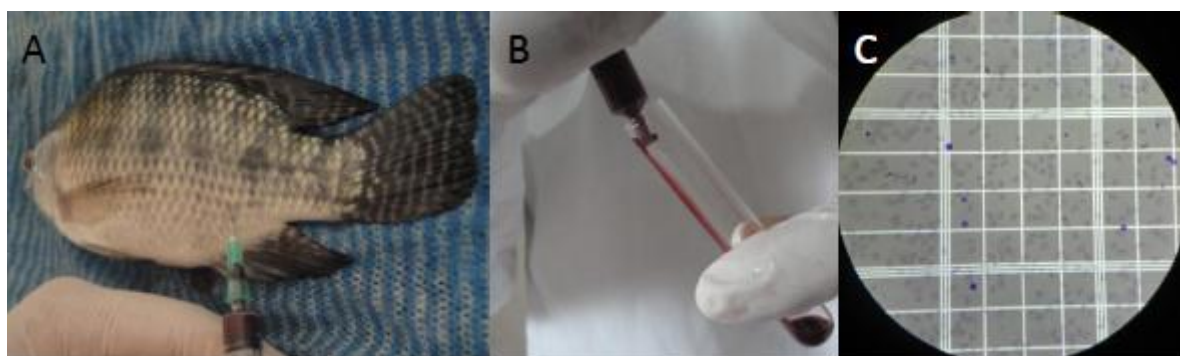


Figura 7- A: punção de vaso caudal; B: separação de alíquota para obtenção de soro; C: contagem de células sanguíneas em câmara de Neubauer.

4.10 Bioquímica sérica

Uma alíquota do sangue sem anticoagulante foi destinada a obtenção de soro para determinação das dosagens bioquímicas de AST (aspartato aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), colesterol, triglicerídeos, proteínas totais e albumina que foram determinadas enzimática e colorimetricamente em analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest – BIOPLUS®). A glicose foi dosada com sangue total imediatamente após punção do vaso no aparelho Accu-Chek Performa- ROCHE Diagnóstica®.

4.11 Avaliação de índice somático

Logo após punção do sangue foi realizado a necropsia, com coleta de fragmento de fígado, rim porção cranial e porção caudal e baço para determinação do índice somático, através da proporção entre peso do órgão (PO) e peso corporal (PC)

expressos como índice somático hepático, renal cranial, renal caudal e esplênico, calculado pela fórmula: Índice somático (IS) = PO X 100/PC.

4.12 Estudo histopatológico

Para o estudo histopatológico amostras da região cranial do fígado e baço foram coletadas de todos os animais. Estes fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e após 24 horas os mesmos foram transferidos para o álcool a 70%. No laboratório de histopatologia mãe do Dep. Patologia Animal – UNESP/Jaboticabal – SP, os tecidos foram emblocados em parafina e cortados em espessura de 5µm para confecção das lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE). A leitura foi realizada em aumento de 400 x em microscopia luz para determinação de possíveis alterações patológicas.

4.13 Análises estatística

Os dados foram analisados estatisticamente em um delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 2X2X3. A comparação entre os diferentes tratamentos foi determinada utilizando o procedimento GLM (General Linear Model) (SAS, 2001). Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram estimadas com base no teste T de acordo com Snedecor e Cochran (1974).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do acúmulo celular na aerocistite

Os valores médios de contagem celular na bexiga de tilápias inoculadas com *A. hydrophila* estão apresentados na Tabela 4. Ressalta-se que os peixes sem aerocistite bacteriana pertencentes ao grupo padrão fisiológico foram excluídos desta análise, pois não apresentavam acúmulo celular na bexiga natatória.

Tabela 4- Contagem diferencial celular de exsudato inflamatório proveniente aerocistite de tilápias do Nilo nos tratamentos¹.

HPI ²	Tratamento ³	Total Celulas	Trombócito		Granulócito		Linfócitos		Macrófago
6	NN	924562 ± 148484	A b	65758 ± 7545	A b	830798 ± 122792	A b	28005 ± 940	A b
	CG	1945012 ± 382255	A b	313250 ± 61462	A a	1572217 ± 303566	A b	30392 ± 6790	A a
	CN	1607680 ± 215827	A b	425070 ± 68507	A b	1148484 ± 159682	A c	34126 ± 5303	A b
	NG	754653 ± 112611	A b	62734 ± 10529	A b	651453 ± 64176	A b	40466 ± 3017	A a
24	NN	9118632 ± 1298083	A a	581328 ± 97258	A a	8059736 ± 1349801	B a	214421 ± 50222	A b
	CG	16033195 ± 2352539	A a	533634 ± 67634	A b	15032368 ± 1807229	A a	254770 ± 26343	A a
	CN	8721190 ± 1883411	A b	164842 ± 14496	A b	8206249 ± 1795951	B b	239831 ± 40091	A b
	NG	10901899 ± 2845794	A b	396321 ± 44139	A ab	10394579 ± 2837884	AB a	111000 ± 13272	A a
48	NN	12313524 ± 2291874	B a	1000703 ± 199195	B a	9916843 ± 1826807	A a	1109286 ± 199743	A a
	CG	15091788 ± 2153219	A a	1749279 ± 274909	A a	11698196 ± 1807894	A a	584628 ± 52442	B a
	CN	18131291 ± 2971630	A a	1566992 ± 218876	A a	14133147 ± 2138292	A a	1325654 ± 295504	A a
	NG	12623659 ± 1785070	AB a	832856 ± 65331	B a	10705065 ± 1727496	A a	328493 ± 58948	B a
F Value		4,51	10,57		5,74		7,01		8,28
Pr > F ⁵		<,0001	<,0001		<,0001		<,0001		<,0001
C. V. ⁵		83,91	68,89		68,72		97,16		105,48

¹ Médias (n= 10) seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste *Student* a 5 %. Letras maiúsculas fazem comparação entre tratamentos e minúscula entre o mesmo tratamento ao longo do tempo.

² HPI: horas após indução de aerocistite.

³ NN - grupo induzido aerocistite ; CG- grupo induzido aerocistite e tratado com CCL₄ e glicocorticóide; CN - grupo induzido aerocistite e tratado com CCL₄ e NG- grupo induzido aerocistite e tratado com glicocorticóide.

⁴ P>F :probabilidade de significância de F; CV:Coeficiente de variação.

No estudo comparativo entre tratamentos (Tabela 4), notou-se no tempo de 48 HPI maior acúmulo de células totais nos peixes dos grupos tratados com CCl_4 em relação às tilápias do grupo NN. Animais dos grupos NN e CG apresentaram aumento no acúmulo celular a partir do tempo de 24 HPI, enquanto que nos peixes dos grupos CN e NG, o aumento nas contagens ocorreu mais tardiamente com 48 HPI.

As maiores contagens de trombócitos ocorreram tardiamente (48 HPI), sendo estes resultados mais expressivos em animais tratados com CCl_4 (Tabela 4). Nos peixes pertencentes ao grupo NG ocorreu aumento progressivo do acúmulo de trombócitos na bexiga natatória.

No estudo comparativo entre os tratamentos para o acúmulo de granulócitos (Tabela 4), observou-se maior número de granulócitos nos grupos que receberam glicocorticoide 24 HPI, destacando este efeito nos peixes do grupo CG. Ao longo do tempo, há aumento gradativo no acúmulo de granulócitos nos peixes intoxicados com CCl_4 e sem o glicocorticoide (grupo CN). Os peixes pertencentes aos demais grupos apresentaram aumento do acúmulo de granulócitos no tempo de 24 HPI, mantendo-se o mesmo padrão de acúmulo também no tempo de 48 HPI.

O estudo do acúmulo de linfócitos no foco inflamado demonstrou menores contagens em peixes que receberam o dexametasona 48 HPI (Tabela 4). Comparando os tratamentos no tempo, notou-se maior acúmulo de linfócitos 48 HPI em relação a 6 HPI e 24 HPI para as tilápias não tratadas com o glicocorticoide (grupos NN e CN)

No acúmulo de macrófagos 48 HPI, notou-se maiores contagens nos peixes intoxicados com CCl_4 em relação aos animais controles desafiados (grupo NN). A análise no tempo revelou que os peixes controles pertencentes ao grupo NN apresentaram um perfil de resposta diferente com aumento na contagem 24 HPI e mantendo o mesmo padrão de resposta com 48 HPI. Os peixes tratados com dexametasona e/ou intoxicados com CCl_4 (grupos CG, CN e NG) apresentaram uma resposta crescente, ocorrendo aumento do número de macrófagos mais tardiamente 48 HPI.

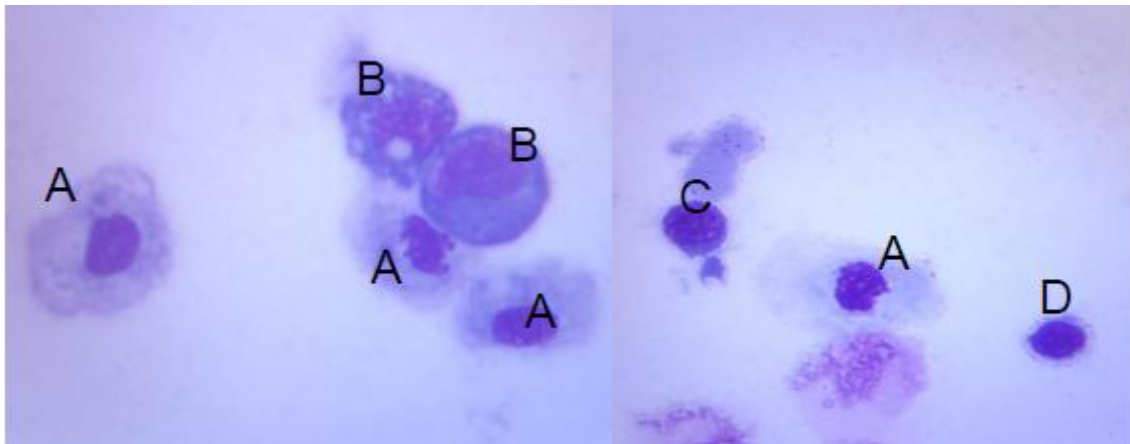


Figura 9- Células provenientes do exsudato: A- granulócito; B- macrófago; C- linfócito, D- trombócito

5.2 Avaliação do hemograma na aerocistite

5.2.1 Trombograma e leucograma

Na fase mais aguda do processo inflamatório (6 HPI), observou-se menor número de trombócitos em peixes que receberam CCl_4 em relação ao padrão fisiológico (Tabela 5). Com a evolução da reação inflamatória 24 HPI, as tilápias tratadas com dexametasona apresentaram menor número de trombócitos em relação ao PF.

No tempo de 48 HPI, observou-se menor número de trombócitos em peixes tratados com dexametasona e sem intoxicação por CCl_4 (grupo NG) em relação ao PF e as maiores contagens de trombócitos foram verificadas tardiamente em peixes somente inoculados com a bactéria e não tratados (grupo NN). Em relação ao perfil dos tratamentos ao longo do tempo, observou-se número significativamente ($P < 0,05$) menor de trombócitos no grupo NN na fase mais aguda (6 HPI) em relação aos tempos de 24 HPI e 48 HPI.

No estudo comparativo entre os tratamentos para análise de leucócitos totais (Tabela 5), notou-se em todos os tempos analisados diminuição significativa ($P < 0,05$) do número de leucócitos em peixes que receberam inóculo de *Aeromonas hydrophila* em relação aos peixes do grupo PF. Observou-se no tempo de 48 HPI um incremento no número de leucócitos nos peixes pertencentes ao grupo NG, portanto equiparando-se ao padrão fisiológico.

Tabela 5 - Resposta diferencial leucocitária observada em tilápias do Nilo nos tratamentos ¹.

HPI ² Tratamento ³	Trombócito		Leucócito		Neutrófilo		Linfócito		Monócito		Eosinófilo
			Total		Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	
6	PF	46069 ± 4107 ^{A a}	92931 ± 7265 ^{A a}	6 ± 1,05 ^{Ca}	6051 ± 1203 ^{Ba}	90 ± 1,42 ^{Aa}	83726 ± 6197 ^{Aa}	3 ± 1,42 ^{Ba}	3155 ± 641 ^{Aa}	0	
	NN	38674 ± 3323 ^{AB b}	64826 ± 3530 ^{BC a}	25 ± 2,72 ^{Bb}	16318 ± 2082 ^{AB b}	71 ± 2,29 ^{Ba}	46012 ± 2863 ^{Ba}	4 ± 0,68 ^{Bb}	2496 ± 471 ^{Aa}	0	
	CG	26042 ± 2407 ^{Ba}	48659 ± 5207 ^{Ca}	42 ± 2,72 ^{Ab}	20599 ± 2720 ^{Ab}	50 ± 3,07 ^{Ca}	24100 ± 3015 ^{Ca}	8 ± 0,85 ^{Ac}	3960 ± 584 ^{Ab}	0	
	CN	31327 ± 3434 ^{Ba}	53173 ± 9230 ^{BCa}	33 ± 4,52 ^{Bb}	18926 ± 5601 ^{Aa}	61 ± 4,27 ^{Ba}	31211 ± 4465 ^{Ca}	6 ± 0,82 ^{ABb}	3036 ± 749 ^{Aa}	0	
	NG	32831 ± 4245 ^{ABa}	70169 ± 8836 ^{Ba}	26 ± 2,14 ^{Bb}	17335 ± 2080 ^{ABa}	70 ± 2,00 ^{Ba}	49873 ± 7316 ^{Ba}	4 ± 0,63 ^{Ab}	2960 ± 487 ^{Aa}	0	
24	PF	46069 ± 4107 ^{Aa}	92931 ± 7265 ^{Aa}	6 ± 1,05 ^{Ca}	6051 ± 1203 ^{Ca}	90 ± 1,42 ^{Aa}	83726 ± 6197 ^{Aa}	3 ± 0,60 ^{Ba}	3155 ± 641 ^{Aa}	0	
	NN	52744 ± 9365 ^{Aa}	59033 ± 12649 ^{Bab}	47 ± 3,65 ^{Ba}	29714 ± 8461 ^{Aa}	47 ± 4,20 ^{Bb}	25103 ± 3317 ^{Bb}	6 ± 1,01 ^{Bab}	4216 ± 1797 ^{Aa}	0	
	CG	24375 ± 4974 ^{Ba}	43725 ± 10344 ^{BCa}	59 ± 4,81 ^{Aa}	27737 ± 8620 ^{ABa}	29 ± 4,70 ^{Cb}	11213 ± 2352 ^{Cb}	12 ± 1,43 ^{Ab}	4774 ± 779 ^{Aab}	0	
	CN	38891 ± 8581 ^{Aa}	36409 ± 8710 ^{Ca}	51 ± 4,11 ^{ABa}	19299 ± 4848 ^{ABa}	35 ± 3,97 ^{Cb}	12432 ± 3131 ^{BCb}	14 ± 1,37 ^{Aa}	4678 ± 1196 ^{Aa}	0	
	NG	22793 ± 3797 ^{Ba}	28207 ± 4894 ^{Cb}	60 ± 3,24 ^{Aa}	16869 ± 2937 ^{BCa}	28 ± 3,25 ^{Ca}	7725 ± 1676 ^{Cc}	12 ± 1,91 ^{Aa}	3612 ± 946 ^{Aa}	0	
48	PF	46069 ± 4107 ^{Ba}	92931 ± 7265 ^{Aa}	6 ± 1,05 ^{Da}	6051 ± 1203 ^{Ba}	90 ± 1,42 ^{Aa}	83726 ± 6197 ^{Aa}	3 ± 1,42 ^{Da}	3155 ± 641 ^{Ba}	0	
	NN	68283 ± 7862 ^{Aa}	43717 ± 3975 ^{BCb}	40 ± 4,04 ^{Aa}	17081 ± 1864 ^{ABb}	52 ± 5,06 ^{Cb}	23131 ± 3530 ^{BCb}	8 ± 2,62 ^{Ca}	3505 ± 1164 ^{Ba}	0	
	CG	37403 ± 7013 ^{BCa}	33897 ± 7311 ^{Ca}	30 ± 3,87 ^{Bc}	12103 ± 4983 ^{ABb}	49 ± 4,29 ^{Ca}	14732 ± 1813 ^{Cab}	21 ± 2,07 ^{Aa}	7063 ± 1703 ^{Aa}	0	
	CN	31326 ± 2388 ^{BCa}	37563 ± 6362 ^{Ca}	18 ± 4,01 ^{Cc}	5930 ± 1236 ^{Bb}	65 ± 5,77 ^{Ba}	26198 ± 6127 ^{BCa}	17 ± 2,76 ^{Ba}	5435 ± 621 ^{ABa}	0	
	NG	26432 ± 4220 ^{Ca}	59068 ± 8580 ^{ABa}	33 ± 4,91 ^{ABa}	20330 ± 4530 ^{Aa}	56 ± 5,84 ^{BCa}	33032 ± 5975 ^{Bb}	11 ± 1,79 ^{Ca}	5706 ± 991 ^{ABa}	0	
F Value		5,21	7,79	26,84	2,99	29,52	32,81	13,24	1,66	13,24	
Pr > F ⁴		<0,00	<0,00	<0,00	0	<0,00	<0,00	<0,00	0,07	<0,00	
C. V. ⁴		44,54	42,77	33,99	84,98	20,39	39,37	53,55	75,89	53,55	

¹ Médias (n= 10) seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste Student a 5 %. Letras maiúsculas fazem comparação entre tratamentos e minúscula mesmo

tratamento ao longo do tempo.

² HP1: horas após indução de aerocistite.

³ PF: grupo não recebeu nenhum tipo de manipulação; NN - grupo induzido aerocistite ; CG: grupo induzido aerocistite, tratado com CCL4 e glicocorticóide; CN - grupo induzido aerocistite e tratado com CCL4 e NG- grupo induzido aerocistite e tratado com glicocorticóide.

⁴ P>F :probabilidade de significância de F; CV: Coeficiente de variação.

Na comparação feita somente entre os peixes desafiados, constatou-se em peixes que somente receberam o tratamento com o glicocorticoide (grupo NG) aumento significativo no número de leucócitos 6 HPI em relação às tilápias tratadas com dexametasona e intoxicadas com CCl₄. No tempo de 24 HPI, ocorreu menores contagens de leucócitos em peixes dos grupos NG e CN em relação aos animais do grupo NN. Tardamente com 48 HPI, peixes que receberam CCl₄ apresentaram menores contagens de células em relação aos peixes do grupo NG. Ao longo do tempo ocorreu uma diminuição gradativa de leucócitos nos peixes somente inoculados com a bactéria (grupo NN). Enquanto peixes do grupo NG apresentaram menores valores médios na contagem de leucócitos totais 24 HPI em relação aos tempos de 6 e 48 HPI.

As contagens de neutrófilos revelaram aumento significativo ($P<0,05$) no número deste granulócito em peixes intoxicados com CCl₄ em comparação ao padrão fisiológico 6 HPI (Tabela 5). No tempo de 24 HPI, peixes dos grupos NN, CG e CN apresentaram aumento significativo ($P<0,05$) no número de neutrófilos em comparação ao padrão fisiológico. Na comparação entre os animais inoculados com *A. hydrophila*, os peixes do grupo NG apresentaram menores contagens deste granulócito em relação à NN (Tabela 5).

Com a evolução da reação inflamatória 48 HPI, observou-se aumento significativo ($P<0,05$) do número de neutrófilos nos peixes pertencentes à NG em relação ao padrão fisiológico. A análise da resposta inflamatória ao longo do tempo revelou que peixes do grupo NN apresentaram neutrofilia significativa 24 HPI em relação às fases de 6 HPI e 48 HPI. Efeito semelhante foi observado nos animais tratados com dexametasona e intoxicados com CCl₄ (grupo CG). Os peixes somente intoxicados com CCl₄ (grupo CN) apresentaram diminuição significativa ($P<0,05$) no número de neutrófilos 48 HPI em relação a 24 HPI e 6 HPI.

Todos os peixes que receberam inóculo de *A. Hydrophila* apresentaram diminuição significativa ($P<0,05$) no número de linfócitos em relação ao PF em todos os períodos analisados (Tabela 5). Comparando-se somente os peixes que receberam inóculo bacteriano, observou-se menores valores médios nas contagens de linfócitos em animais intoxicados com CCl₄ em relação a NN e NG para o tempo de 6 HPI. No entanto, para o tempo de 24 HPI, esta resposta foi constatada em peixes tratados com

dexametasona. Tardiamente com 48 HPI, os peixes do grupo CG apresentaram linfocitopenia significativa ($P<0,05$) em relação à NG. Ao longo do tempo, as tilápias do grupo NN apresentaram menor número de linfócitos nos tempos de 24 e 48 HPI em relação à fase mais aguda 6 HPI, efeito semelhante foi observado nos peixes do grupo CG. Tilápias somente intoxicadas com CCl_4 (grupo CN) apresentaram linfocitopenia significativa ($P<0,05$) 24 HPI, em relação aos tempos de 6 HPI e 48 HPI (Tabela 5). Os peixes do grupo NG apresentaram uma queda significativa ($P<0,05$) no número de linfócitos no sangue 24 HPI, ocorrendo recuperação 48 HPI, porém não chegando ao número de linfócitos encontrados em 6 HPI.

O número de monócitos diferiu entre os tratamentos somente no tempo de 48 HPI (Tabela 5). Observou-se aumento significativo ($P<0,05$) no número de monócitos em peixes tratados com dexametasona e intoxicados com CCl_4 (grupo CG) em relação aos peixes dos grupos NN e PF. A análise ao longo do tempo revelou que as tilápias pertencentes ao grupo CG apresentaram aumento gradativo na contagem de monócitos com a evolução da reação inflamatória.

5.2.2 Resposta eritrocitária

Não se observou alterações significativas ($P>0,05$) nas contagens de eritrócitos na fase mais aguda da reação inflamatória (Tabela 6). Com 24 HPI, a análise da série vermelha revelou aumento significativo ($P<0,05$) na contagem de eritrócitos de tilápias somente inoculadas com a bactéria (Grupo NN) e diminuição em animais tratados dexametasona e sem a intoxicação por CCl_4 (Grupo NG) quando comparados aos valores referenciais apresentados pelos peixes do grupo PF (Tabela 6). Com a evolução da resposta 48 HPI, ocorreu diminuição significativa ($P<0,05$) na contagem global de hemácias em peixes intoxicados com CCl_4 (Grupos CG e CN).

Peixes intoxicados CCl_4 apresentaram baixo valor de VCM em relação aos peixes dos grupos NG e NN 6 HPI (Tabela 6). Enquanto, tilápias tratadas com glicocorticoide e não intoxicadas (grupo NG) apresentaram aumento significativo ($P<0,05$) no VCM em relação ao padrão fisiológico.

Tilápias intoxicadas e tratadas com dexametasona (grupo CG) apresentaram menor quantidade circulante de hemoglobina 24 HPI, associado a diminuição no CHCM em relação ao padrão fisiológico e aos demais grupos com aerocistite (Tabela 6). Em relação aos peixes pertencentes ao grupo NG, notou-se menor contagem de eritrócitos acompanhado de VCM elevado quando comparados aos peixes dos grupos NN e PF. Animais inoculados com a bactéria e não tratados (Grupo NN) apresentaram maior número de eritrócitos circulantes, porém com menor VCM.

Tabela 6- Resposta sérica vermelha em tilápias do Nilo nos tratamentos¹.

HPI ²	Tratamento ³	Erit. ⁴ 10 ⁶	HT ⁴ %	Hb ⁴ g dL ⁻¹	VCM ⁴ fL	CHCM ⁴ g dL ⁻¹
6	PF	1,90 ± 0,08 A a	28,90 ± 1,04 AB a	7,71 ± 0,20 A a	154,11 ± 6,99 BC a	27,05 ± 1,35 AB a
	NN	1,72 ± 0,05 A b	27,44 ± 0,48 B b	7,09 ± 0,29 AB a	163,63 ± 4,12 AB ab	25,64 ± 1,44 AB a
	CG	1,89 ± 0,06 A a	24,14 ± 0,43 C b	7,05 ± 0,23 AB a	134,06 ± 4,97 D c	28,44 ± 1,53 A a
	CN	1,88 ± 0,06 A a	28,56 ± 0,81 AB a	6,89 ± 0,17 B b	144,49 ± 4,79 CD b	25,12 ± 0,84 BC a
	NG	1,78 ± 0,07 A ab	30,56 ± 1,04 A a	6,96 ± 0,26 B b	178,03 ± 9,47 A a	22,29 ± 1,11 C b
24	PF	1,90 ± 0,08 B a	28,90 ± 1,04 A a	7,71 ± 0,20 AB a	154,11 ± 6,99 BC a	27,05 ± 1,35 AB a
	NN	2,15 ± 0,08 A a	30,00 ± 0,68 A a	7,54 ± 0,22 B a	141,81 ± 6,41 C b	25,07 ± 0,77 B a
	CG	1,80 ± 0,09 BC a	28,10 ± 1,38 A a	6,05 ± 0,38 C b	159,96 ± 7,85 AB b	21,81 ± 0,91 C c
	CN	1,79 ± 0,07 BC a	30,33 ± 0,894 A a	7,69 ± 0,21 AB a	173,69 ± 6,39 A a	25,28 ± 0,62 B a
	NG	1,68 ± 0,07 C b	29,80 ± 1,18 A a	8,26 ± 0,35 A a	174,09 ± 7,15 A ab	28,37 ± 1,28 A a
48	PF	1,90 ± 0,08 A a	28,90 ± 1,04 BC a	7,71 ± 0,20 A a	154,11 ± 6,99 C a	27,05 ± 1,35 A a
	NN	1,83 ± 0,08 AB b	31,40 ± 0,60 A a	7,74 ± 0,16 A a	174,06 ± 5,80 AB a	24,73 ± 0,82 A a
	CG	1,46 ± 0,04 C a	26,90 ± 0,57 C a	6,79 ± 0,25 B a	189,18 ± 5,32 A a	25,31 ± 1,03 A b
	CN	1,67 ± 0,07 B b	29,80 ± 0,89 AB a	7,52 ± 0,32 A ab	180,86 ± 7,27 A a	25,12 ± 0,53 A a
	NG	1,94 ± 0,05 A a	30,60 ± 0,50 AB a	7,59 ± 0,25 A ab	158,40 ± 4,33 BC b	24,84 ± 0,80 A a
F Value		4,62	3,49	4,52	5,41	2,66
Pr > F ⁵		<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,002
C. V. ⁵		12,26	9,66	10,82	12,56	13,54

¹ Médias (n= 10) seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste *Student* a 5 %. Letras maiúsculas fazem comparação entre tratamentos e minúscula entre o mesmo tratamento ao longo do tempo.

² HPI: horas após indução de aerocistite.

³ PF: grupo não recebeu nenhum tipo de manipulação; NN - grupo induzido aerocistite ; CG: grupo induzido aerocistite, tratado com CCL4 e glicocorticóide; CN - grupo induzido aerocistite e tratado com CCL4 e NG- grupo induzido aerocistite e tratado com glicocorticóide.

⁴ Erit.:eritrócitos; HT:hematócrito; Hb:hemoglobina; VCM:volume corpuscular médio e CHCM:concentração de hemoglobina corpuscular média.

⁵ Pr>F :probabilidade de significância de F; CV:Coeficiente de variação.

Na análise mais tardia com 48 HPI, os peixes pertencentes ao grupo CG apresentaram menores valores de hemoglobina circulantes, associado a diminuição dos valores de hematócrito e aumento do VCM em relação aos peixes do PF e grupo NG (Tabela 6). Os peixes pertencentes ao grupo CN também apresentaram menor número de eritrócitos circulantes e com aumento do VCM em relação ao PF e ao grupo NG. Os peixes do grupo NN apresentaram VCM aumentado (Tabela 6).

Em relação aos tratamentos ao longo do tempo, notou-se aumento gradativo do VCM e diminuição no CHCM em peixes tratados com dexametasona e intoxicados com CCl_4 (grupo CG). Nos peixes do grupo CN, verificou-se aumento do VCM e hemoglobina 24 HPI em relação a 6 HPI. Para os peixes do grupo NG foi notado uma diminuição progressiva do valor de VCM ao longo do tempo. Observou-se maior número de eritrócitos com valor de VCM baixo em peixes somente inoculados com a bactéria (grupo NN) 24 HPI.

5.3 Avaliação bioquímica

Para avaliação bioquímica ocorreu aumento significativo ($P < 0,05$) na concentração de proteína total em peixes intoxicados com CCl_4 na fase mais aguda 6 HPI (Tabela 7). No tempo de 24 HPI, ocorreu diminuição significativa ($P < 0,05$) na concentração de proteína total nos peixes dos grupos pertencentes aos tratamentos com dexametasona em relação aos peixes do grupo NN. Com a evolução da resposta em 48 HPI, tilápias pertencentes ao grupo NG apresentaram maior concentração de proteína total em relação a CG. Comparando os tratamentos ao longo do tempo, notou-se uma diminuição gradativa nos níveis de proteína total em animais intoxicados com tetracloreto de carbono (grupo CN). Enquanto, tilápias dos grupos NG e NN apresentaram aumento dos valores circulantes com o passar do tempo.

Os níveis circulantes de albumina aumentaram significativamente ($P < 0,05$) em tilápias intoxicadas com CCl_4 6 HPI. No entanto, observou-se aumento sérico desta proteína em animais controle inoculado (grupo NN) em relação aos demais grupos que receberam o inóculo de *A. hydrophila* 24 HPI (Tabela 7). Com a evolução da resposta inflamatória 48 HPI foi notado maior concentração nos peixes tratados com dexametasona (grupo NG). A análise dos tratamentos ao longo do tempo demonstrou menores concentrações de albumina nos peixes intoxicados com o CCl_4 (grupos CG, CN) nos tempos de 24 e 48 HPI.

A subtração dos valores de proteína total e da albumina sérica indica aproximadamente a concentração de globulinas circulantes. O estudo deste grupo de proteínas revelou diminuição significativa ($P < 0,05$) em tilápias tratadas e intoxicadas

com CCl₄ 24 e 48 HPI (Tabela 7). Animais controles inoculados com *A. hydrophila* (grupo NN) apresentaram diminuição de globulinas somente 24 HPI. A análise ao longo do tempo mostrou que o grupo CG e NN apresentaram reduções significativas (P<0,05) na concentração das globulinas entre 24 e 48. HPI.

Tabela 7 - Resposta bioquímica-sérico em tilápias do Nilo por tratamento¹.

HPI ²	Tratamento ³	Proteína Total g dL ⁻¹	Albumina g dL ⁻¹	Globulinas g dL ⁻¹	AST ⁴ U/L
6	PF	3,31 ± 0,07 AB a	0,65 ± 0,04 B a	2,67 ± 0,06 A a	48 ± 9,19 C a
	NN	2,99 ± 0,12 B b	0,66 ± 0,03 B ab	2,32 ± 0,13 BC b	46 ± 8,33 C a
	CG	3,12 ± 0,07 B a	0,94 ± 0,07 A a	2,19 ± 0 C ab	294 ± 59,27 A a
	CN	3,56 ± 0,10 A a	0,96 ± 0,08 A a	2,59 ± 0,02 AB a	312 ± 33,89 A a
	NG	3,16 ± 0,12 B b	0,58 ± 0,05 B a	2,58 ± 0,12 AB ab	174 ± 19,09 B a
24	PF	3,31 ± 0,07 AB a	0,65 ± 0,04 AB a	2,67 ± 0,06 A a	48 ± 9,19 AB a
	NN	3,43 ± 0,16 A a	0,76 ± 0,05 A a	2,67 ± 0,17 A a	26 ± 5,54 B a
	CG	3,06 ± 0,12 BC a	0,62 ± 0,04 B b	2,44 ± 0,09 A a	82 ± 17,99 A b
	CN	3,10 ± 0,17 ABC b	0,60 ± 0,04 B b	2,50 ± 0,14 A a	90 ± 32,50 A b
	NG	2,95 ± 0,12 C b	0,61 ± 0,03 B b	2,34 ± 0,11 A b	29 ± 2,42 B b
48	PF	3,31 ± 0,07 AB a	0,65 ± 0,04 B a	2,67 ± 0,06 AB a	48 ± 9,19 A a
	NN	3,04 ± 0,16 BC a	0,62 ± 0,06 B b	2,42 ± 0,12 B ab	29 ± 2,44 A a
	CG	2,77 ± 0,13 C a	0,69 ± 0,02 AB b	2,08 ± 0,14 C b	20 ± 2,89 A b
	CN	3,01 ± 0,11 BC b	0,68 ± 0,03 AB b	2,34 ± 0,10 BC a	24 ± 1,76 A c
	NG	3,66 ± 0,21 A a	0,79 ± 0,06 A b	2,87 ± 0,17 A a	28 ± 7,88 A b
F Value		3,21	5,72	2,90	16,95
Pr > F ⁵		0,00	<,0001	0,00	<,0001
C. V. ⁵		11,16	18,72	13,21	69,63

¹ Médias (n= 10) seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste *Student* a 5 %.

Letras maiúsculas fazem comparação entre tratamentos e minúscula entre o mesmo tratamento ao longo do tempo.

² HPI: horas após indução de aerocistite.

³ PF: grupo não recebeu nenhum tipo de manipulação; NN: grupo induzido aerocistite ; CG: grupo induzido aerocistite, tratado com CCl₄ e glicocorticóide; CN - grupo induzido aerocistite e tratado com CCL₄ e NG- grupo induzido aerocistite e tratado com glicocorticóide.

⁴ AST: aspartato aminotransferase.

⁵ Pr>F :probabilidade de significância de F; CV:Coeficiente de variação.

A atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST) sérico aumentou em animais tratados com dexametasona e maior em animais intoxicados com CCl₄ na fase aguda 6 HPI (Tabela 7). No tempo de 24 HPI, observou-se redução gradativa na atividade sérica de AST nos animais intoxicados com o tetracloreto (grupos CN e CG), porém seus valores continuaram estatisticamente superiores aos observados nos peixes dos grupos sem a administração do toxicante (grupo NG e NN). Com a evolução da reação inflamatória 48HPI, os valores de AST voltaram aos níveis basais em todos os tratamentos (Tabela 7). Por outro lado, animais tratados com dexametasona (grupos NG e CG) apresentaram redução gradativa da atividade enzimática de AST ao longo do tempo.

Tabela 8 - Resposta bioquímica-sérico em tilápias do Nilo por tratamento¹.

HPI ²	Tratamento ³	Colesterol mg dL ⁻¹	Triglicerídeos mg dL ⁻¹	FA ⁴ U/L	Glicose mg dL ⁻¹
6	PF	111 ± 8,32 ^{B a}	187 ± 17,52 ^{A a}	29 ± 2,40 ^{AB a}	34 ± 1,94 ^{C a}
	NN	66 ± 3,57 ^{C b}	127 ± 17,31 ^{BC a}	20 ± 2,14 ^{BC ab}	46 ± 2,14 ^{C a}
	CG	75 ± 11,84 ^{C c}	91 ± 8,64 ^{C b}	34 ± 8,90 ^{A a}	146 ± 7,79 ^{A a}
	CN	186 ± 17,26 ^{A a}	103 ± 11,14 ^{BC ab}	11 ± 4,35 ^{C a}	118 ± 4,96 ^{B a}
	NG	65 ± 2,86 ^{C c}	155 ± 28,88 ^{AB a}	22 ± 2,09 ^{B a}	48 ± 2,71 ^{C a}
24	PF	111 ± 8,32 ^{A a}	187 ± 17,52 ^{AB a}	29 ± 2,40 ^{A a}	34 ± 1,94 ^{B a}
	NN	97 ± 6,21 ^{A a}	68 ± 11,28 ^{C a}	10 ± 2,51 ^{C b}	53 ± 6,55 ^{B a}
	CG	111 ± 9,10 ^{A b}	259 ± 55,01 ^{A a}	19 ± 4,08 ^{BC b}	114 ± 22,03 ^{A b}
	CN	119 ± 11,81 ^{A b}	165 ± 32,14 ^{B a}	15 ± 1,95 ^{BC a}	137 ± 19,63 ^{A a}
	NG	98 ± 10,77 ^{A b}	91 ± 15,79 ^{C b}	25 ± 3,67 ^{AB a}	43 ± 2,86 ^{B a}
48	PF	111 ± 8,32 ^{B a}	187 ± 17,52 ^{A a}	29 ± 2,40 ^{A a}	34 ± 1,94 ^{B a}
	NN	117 ± 7,68 ^{B a}	86 ± 17,99 ^{B a}	21 ± 6,18 ^{AB a}	33 ± 1,86 ^{B a}
	CG	147 ± 10,25 ^{A a}	90 ± 15,23 ^{B b}	22 ± 3,39 ^{AB b}	70 ± 18,61 ^{A c}
	CN	163 ± 4,94 ^{A a}	74 ± 14,20 ^{B b}	16 ± 2,14 ^{B a}	57 ± 4,43 ^{AB b}
	NG	158 ± 8,13 ^{A a}	182 ± 22,80 ^{A a}	21 ± 3,13 ^{AB a}	29 ± 1,43 ^{B a}
F Value		14,05	5,21	2,86	17,84
Pr > F ⁵		<,0001	<,0001	0,00	<,00
C. V. ⁵		22,64	48,55	52,10	46,22

¹ Médias (n= 10) seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste *Student* a 5 %.

Letras maiúsculas fazem comparação entre tratamentos e minúscula entre o mesmo tratamento ao longo do tempo.

² HPI: horas após indução de aerocistite.

³ PF: grupo não recebeu nenhum tipo de manipulação; NN: grupo induzido aerocistite ; CG: grupo induzido aerocistite, tratado com CCl₄ e glicocorticoide; CN - grupo induzido aerocistite e tratado com CCl₄ e

NG- grupo induzido aerocistite e tratado com glicocorticoide.

⁴ AST: aspartato aminotransferase.

⁵ Pr>F :probabilidade de significância de F; CV:Coeficiente de variação.

A concentração de colesterol sérico aumentou significativamente (P<0,05) em animais somente intoxicados com CCl₄ (CN) e diminui nos demais grupos em relação ao padrão fisiológico na fase aguda 6 HPI (Tabela 8). Tardamente com 48 HPI, peixes dos grupos tratados com glicocorticoide e/ou intoxicados com CCl₄ (Grupos CG, CN e NG) apresentaram aumento nos níveis séricos deste lipídio quando comparado aos animais controles (grupos NN e PF). Análise da resposta de colesterol sérico ao longo do tempo demonstrou que animais tratados com dexametasona e intoxicados com tetracloreto (grupo CG) apresentaram aumento gradativo (P<0,05) deste lipídio. Tilápias intoxicadas com CCl₄ (grupo CN) apresentaram menor concentração sérica de colesterol no tempo de 24 HPI.

No estudo comparativo dos valores séricos de triglicerídeos (Tabela 8), observou-se diminuição significativa (P<0,05) deste lipídio em animais intoxicados com

CCl_4 (grupos CG e CN) 6 HPI. Enquanto, em peixes tratados sem o tetracloreto (grupos NG e NN), foi observado diminuição significativa dos valores séricos apenas com 24 HPI, notando uma maior concentração sérica nos peixes do grupo CG. O estudo da concentração de triglicerídeos ao longo do tempo demonstrou aumento significativo nos valores séricos deste lipídio em animais intoxicados com tetracloreto 24 HPI. Por outro lado, animais do grupo NG apresentaram menores concentrações no tempo de 24 HPI.

A atividade enzimática sérica da fosfatase alcalina (FA) aumentou significativamente em animais tratados com dexametasona e intoxicados com tetracloreto de carbono 6 HPI (Tabela 8). Porém, ressalta-se que peixes submetidos somente a intoxicação por CCl_4 apresentaram níveis séricos inferiores ao padrão fisiológico. Níveis menores de FA foram observados em tilápias que não receberam glicocorticoides 24 HPI. Tardamente (48 HPI), animais intoxicados com CCl_4 (grupo CN) apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) na atividade sérica desta enzima. De modo geral, em todos os tempos analisados, os peixes intoxicados com tetracloreto (grupo CN) apresentaram menores valores de atividade sérica para FA em relação a PF. A análise ao longo do tempo revelou que os animais do grupo CG apresentaram maior atividade para FA no tempo de 6 HPI.

A concentração de glicose aumento significativamente ($P < 0,05$) em animais tratados com tetracloreto 6 HPI. Sendo estes resultados mais expressivos nas tilápias que receberam simultaneamente CCl_4 e Dexametasona (Tabela 8). Este mesmo perfil de resposta foi observado 24 HPI e 48 HPI, porém em tilápias intoxicadas com tetracloreto (grupo CN) os valores glicêmicos se normalizaram no tempo de 48 HPI quando comparado ao padrão fisiológico. A análise ao longo do tempo revelou que tilápias do grupo CG apresentaram diminuição gradativa ($P < 0,05$) entre os três períodos avaliados, enquanto os animais do grupo CN apresentaram perfil de resposta semelhante com diminuição significativa ($P < 0,05$) no tempo de 48 HPI (Tabela 8).

5.4 Estudo do índice hepático, esplênico e renal somático.

Na avaliação somática determinada pela relação entre o peso do órgão e peso do animal (Tabela 9), observou-se aumento no índice hepatossomático IHS em peixes

intoxicados com tetracloreto e tratados com dexametasona (grupo CG), porém estes achados não diferiram estatisticamente ($P>0.05$) quando comparados ao padrão fisiológico nos tempos de 6 e 24 HPI. Por outro lado, estes resultados diferiram estatisticamente ($P<0.05$) em relação aos peixes tratados somente com dexametasona (grupo NG) 24 HPI A análise ao longo do tempo demonstrou que peixes tratados com dexametasona (grupos CG e NG) não apresentaram variações significativas entre os períodos estudados, enquanto tilápias intoxicadas com tetracloreto (grupo CN) apresentaram diminuição gradativa ($P<0,05$) entre os tempos de 6, 24 e 48 HPI.

Tabela 9 - Valores médios $\pm$ erro padrão dos índices somático hepático, renal e esplênico¹.

HPI ²	Tratamento ³	IHS ⁴		IES ⁴		INS ⁴		INScaudal ⁴		INScranial ⁴	
		%		%		%		%		%	
6	PF	3,43 $\pm$ 0,21	A a	0,15 $\pm$ 0,02	A a	0,57 $\pm$ 0,02	BC a	0,27 $\pm$ 0,02	BC a	0,31 $\pm$ 0,01	A a
	NN	3,67 $\pm$ 0,15	A a	0,12 $\pm$ 0,01	AB ab	0,63 $\pm$ 0,02	AB a	0,32 $\pm$ 0,02	B a	0,31 $\pm$ 0,02	A a
	CG	3,93 $\pm$ 0,10	A a	0,10 $\pm$ 0,01	B a	0,55 $\pm$ 0,01	C a	0,26 $\pm$ 0,01	C b	0,29 $\pm$ 0,01	A a
	CN	3,67 $\pm$ 0,17	A a	0,11 $\pm$ 0,01	AB a	0,63 $\pm$ 0,03	AB a	0,38 $\pm$ 0,03	A a	0,28 $\pm$ 0,01	A a
	NG	3,75 $\pm$ 0,19	A a	0,11 $\pm$ 0,01	AB a	0,66 $\pm$ 0,03	A a	0,31 $\pm$ 0,01	B a	0,32 $\pm$ 0,03	A a
24	PF	3,43 $\pm$ 0,21	AB a	0,15 $\pm$ 0,02	A a	0,57 $\pm$ 0,02	AB a	0,27 $\pm$ 0,02	B a	0,31 $\pm$ 0,01	AB a
	NN	3,93 $\pm$ 0,23	A a	0,15 $\pm$ 0,02	A a	0,61 $\pm$ 0,03	A a	0,33 $\pm$ 0,02	A a	0,33 $\pm$ 0,02	A a
	CG	3,89 $\pm$ 0,11	A a	0,09 $\pm$ 0,01	B a	0,54 $\pm$ 0,03	AB a	0,26 $\pm$ 0,01	B b	0,30 $\pm$ 0,02	AB a
	CN	3,40 $\pm$ 0,26	AB ab	0,09 $\pm$ 0,01	B a	0,54 $\pm$ 0,02	B b	0,29 $\pm$ 0,01	AB b	0,27 $\pm$ 0,02	B a
	NG	3,19 $\pm$ 0,22	B a	0,12 $\pm$ 0,01	AB a	0,59 $\pm$ 0,02	AB a	0,30 $\pm$ 0,01	AB a	0,29 $\pm$ 0,01	AB a
48	PF	3,43 $\pm$ 0,21	A a	0,15 $\pm$ 0,02	A a	0,57 $\pm$ 0,02	B a	0,27 $\pm$ 0,02	B a	0,31 $\pm$ 0,01	AB a
	NN	2,89 $\pm$ 0,22	A b	0,09 $\pm$ 0,01	B b	0,65 $\pm$ 0,02	A a	0,34 $\pm$ 0,02	A a	0,32 $\pm$ 0,01	AB a
	CG	3,38 $\pm$ 0,23	A a	0,09 $\pm$ 0,01	B a	0,57 $\pm$ 0,03	B a	0,32 $\pm$ 0,02	AB a	0,28 $\pm$ 0,01	B a
	CN	2,99 $\pm$ 0,22	A b	0,11 $\pm$ 0,01	AB a	0,58 $\pm$ 0,03	AB ab	0,30 $\pm$ 0,03	AB b	0,29 $\pm$ 0,02	AB a
	NG	3,30 $\pm$ 0,25	A a	0,11 $\pm$ 0,01	AB a	0,64 $\pm$ 0,02	A a	0,33 $\pm$ 0,02	A a	0,33 $\pm$ 0,02	A a
F Value		2,23		2,38		2,36		2,98		1,07	
Pr > F ⁵		0,0097		0,0063		0,0061		0		0,3928	
C. V. ⁵		18,63		39,32		13,24		18,83		17,71	

¹ Médias (n= 10) seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste *Student* a 5 %. Letras maiúsculas fazem comparação entre tratamentos e minúscula entre o mesmo tratamento ao longo do tempo.

² HPI: horas após indução de aerocistite.

³ PF: grupo não recebeu nenhum tipo de manipulação; NN - grupo induzido aerocistite ; CG: grupo induzido aerocistite, tratado com CCL4 e glicocorticóide; CN - grupo induzido aerocistite e tratado com CCL4 e NG- grupo induzido aerocistitee tratado com glicocorticóide.

⁴ IHS: índice hepatossomático; IES: índice esplenossomático; INS: índice nefrossomático;

INScranial: índice nefrossomático porção cranial e INScaudal: índice nefrossomático porção caudal.

⁵ Pr>F :probabilidade de significância de F; CV:Coeficiente de variação.

O estudo do índice esplenossomático (IES) mostrou diminuição ($P<0,05$) do baço de tilápias tratadas com dexametasona e intoxicadas com CCl₄ quando comparadas aos animais do padrão fisiológico na fase aguda da resposta (6 HPI).

Observou-se uma diminuição do IES para os peixes intoxicados com tetracloreto (grupos CG e CN) em relação aos animais controles (grupo PF) e inoculados com a bactéria (grupo NN) 24 HPI. Em 48 HPI notou-se que os peixes do grupo NN e CG apresentaram diminuição ($P<0,05$) do IES em relação aos animais do grupo PF.

Tilápias do grupo CG apresentaram menores índices nefrossomáticos (INS) em relação aos grupos inoculados 6 HPI (Tabela 9). Com a evolução da reação inflamatória 24 HPI, os animais intoxicados com tetracloreto (grupo CN) apresentaram diminuição ($P<0,05$) do INS em relação aos peixes somente inoculados *A. hydrophila* (grupo NN). No tempo de 48 HPI, os peixes do grupo NG e NN apresentaram maiores valores somáticos renais em relação aos peixes dos grupos CG e PF (Tabela 9).

Para o rim foi realizada a análise separada da porção cranial e caudal. Os peixes intoxicados com tetracloreto (grupo CN) apresentaram aumento significativo no INS Caudal em relação aos peixes dos demais grupos 6 HPI (Tabela 9). Resultados semelhantes foram observados em peixes apenas inoculados com a bactéria (grupo NN) quando comparado ao padrão fisiológico 24 e 48 HPI. Tardamente com 48 HPI, animais tratados com dexametasona (grupo NG) demonstraram aumento significativo neste parâmetro. O estudo somático do rim cranial ou cefálico não revelou alterações ($P>0,05$) entre o padrão fisiológico e os diferentes grupos experimentais (Tabela 8). No entanto, peixes intoxicados com CCl_4 apresentaram diminuição significativa ($P<0,05$) no INS Cranial 24 HPI para o grupo CN e 48 HPI para o grupo CG.

5.5 Avaliação do histopatológico

Na análise histopatológica de tilápias na vigência de aerocistite induzida por *A. hydrophila* (Figura 10). No padrão fisiológico, a bexiga é revestida por tecido epitelial simples com tecido conjuntivo internamente (Matushima & Mariano, 1996).

Alterações observadas em relação ao padrão fisiológico consistiram em perda de células na camada epitelial, lado parietal da bexiga natatória e evidente acúmulo de células inflamatória nos peixes dos grupos CG CN, NG e NN em 48 HPI. Na avaliação interna da bexiga, tilápias do grupo CG e CN apresentaram elevado número de células inflamatória em relação ao grupo NG. O grupo somente com dexametasona, por sua

vez, apresentou maior número de células e tecido conjuntivo desorganizado em relação aos peixes do grupo NN (Figura 10).

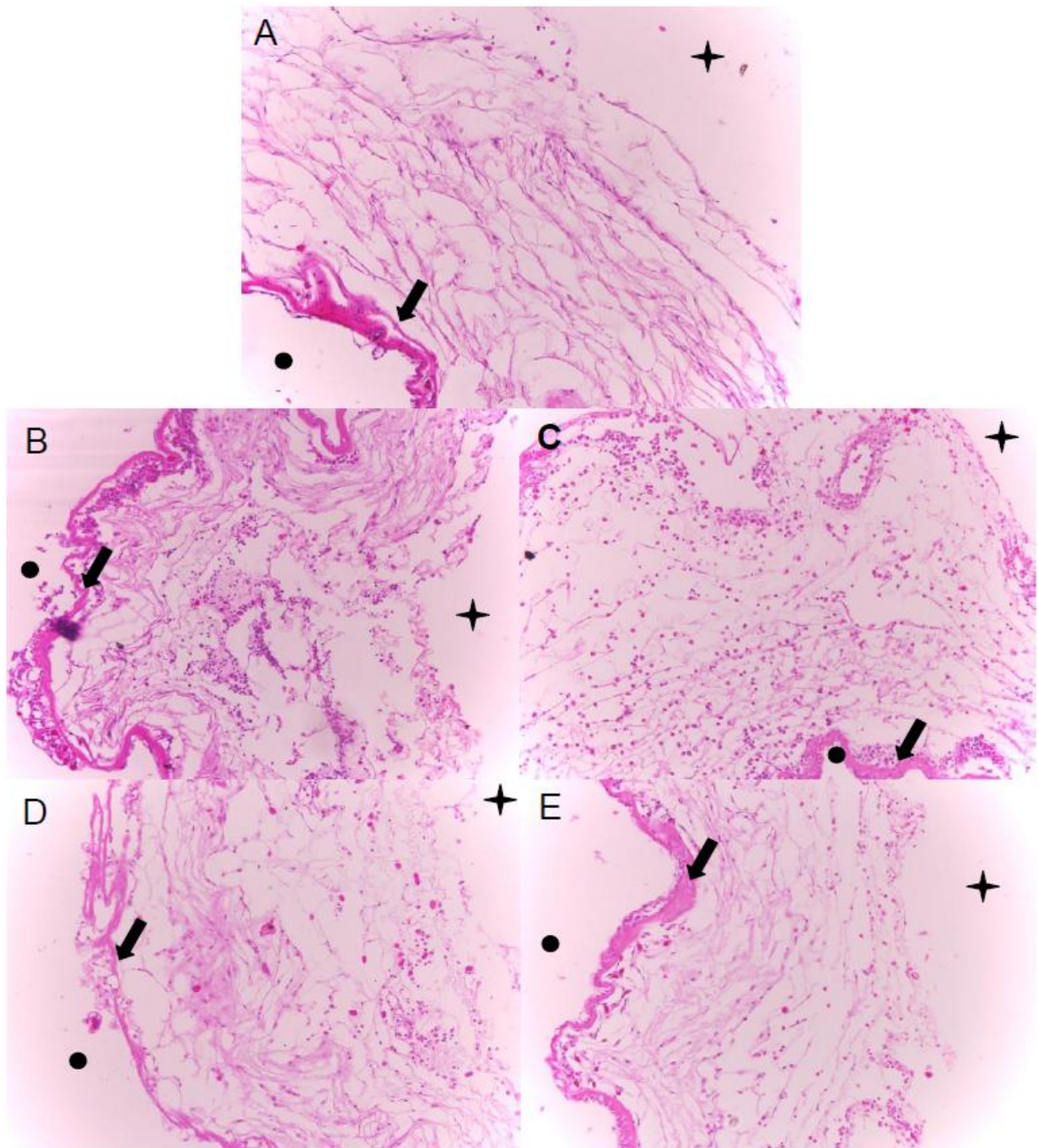


Figura 10- Fotomicrografia da bexiga natatória: A - grupo PF; B - grupo CG, 48 HPI; C – grupo CN, 48 HPI; D - grupo CN, 48 HPI; E - grupo NG, 48 HPI; F – grupo NN, 48 HPI. Cruz: serosa parietal, Bolinha: serosa interna, seta: camada epitelial. Coloração HE. 400X.

Na histologia hepática no tempo de 6 HPI, peixes do PF apresentaram hepatócitos com formato poligonal e arranjo codornal, núcleos evidentes centralizados,

sinusóides bem delimitados entre os hepatócitos e com confluência para veia central (Roberts, 2012). Os peixes intoxicados por CCl₄ apresentaram hepatócitos com vacuolização intensa citoplasmática, deslocamento severo do citoesqueleto e núcleo próximo ao sinusóides e evidente congestão na região centrolobular do parênquima hepático (Figura 11).

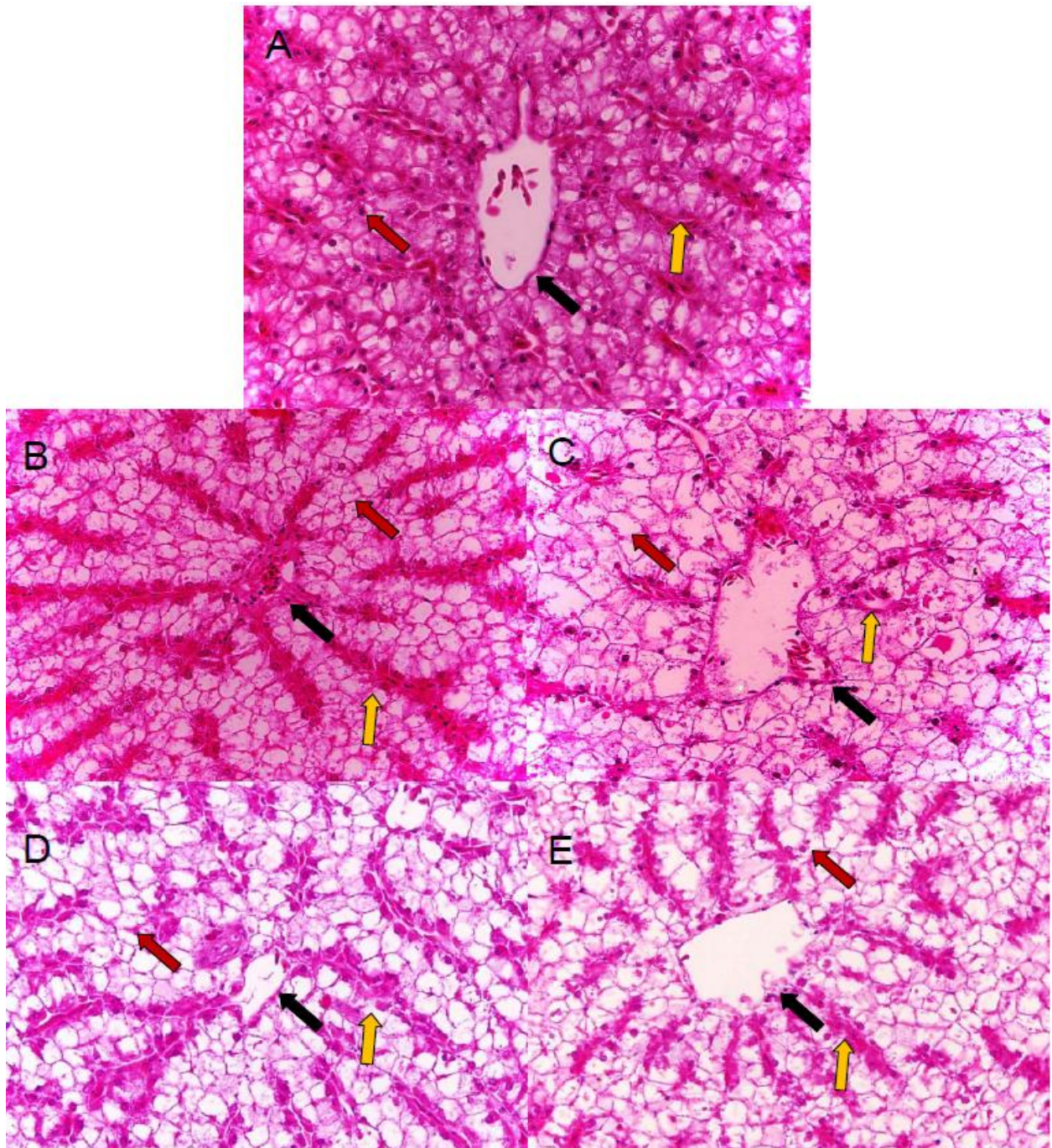


Figura 11- Fotomicrografia do fígado 6 horas após indução da aerocistite infecciosa: A- grupo PF; B- grupo CN 6 HPI; C - grupo CG 6 HPI; D- grupo NG 6 HPI; E- grupo NN 6 HPI. Hepatócito (seta vermelha), veia central (seta preta), sinusóide (seta amarela). Coloração HE. 400X.

Em peixes intoxicados por CCl_4 e tratados com dexametasona destacou-se a vacuolização intensa no citoplasma com núcleos na periferia da célula e perda do citoesqueleto. Nas tilápias do grupos NG e NN, observou-se discreta vacuolização dos hepatócitos em relação ao grupo PF (Figura 11).

No estudo histopatológico do baço, observou-se no padrão fisiológico relação proporcional alta entre polpa vermelha (eritrócitos) e polpa branca. Os peixes intoxicados com CCl_4 (Figura 13), no tempo de 24 HPI e NN e CG (Figura 12), no tempo de 48 apresentam poucos eritrócitos no parenquima esplênico em comparação ao PF, corroborando com os achados do IES e confirmando a presença de contração esplênica.

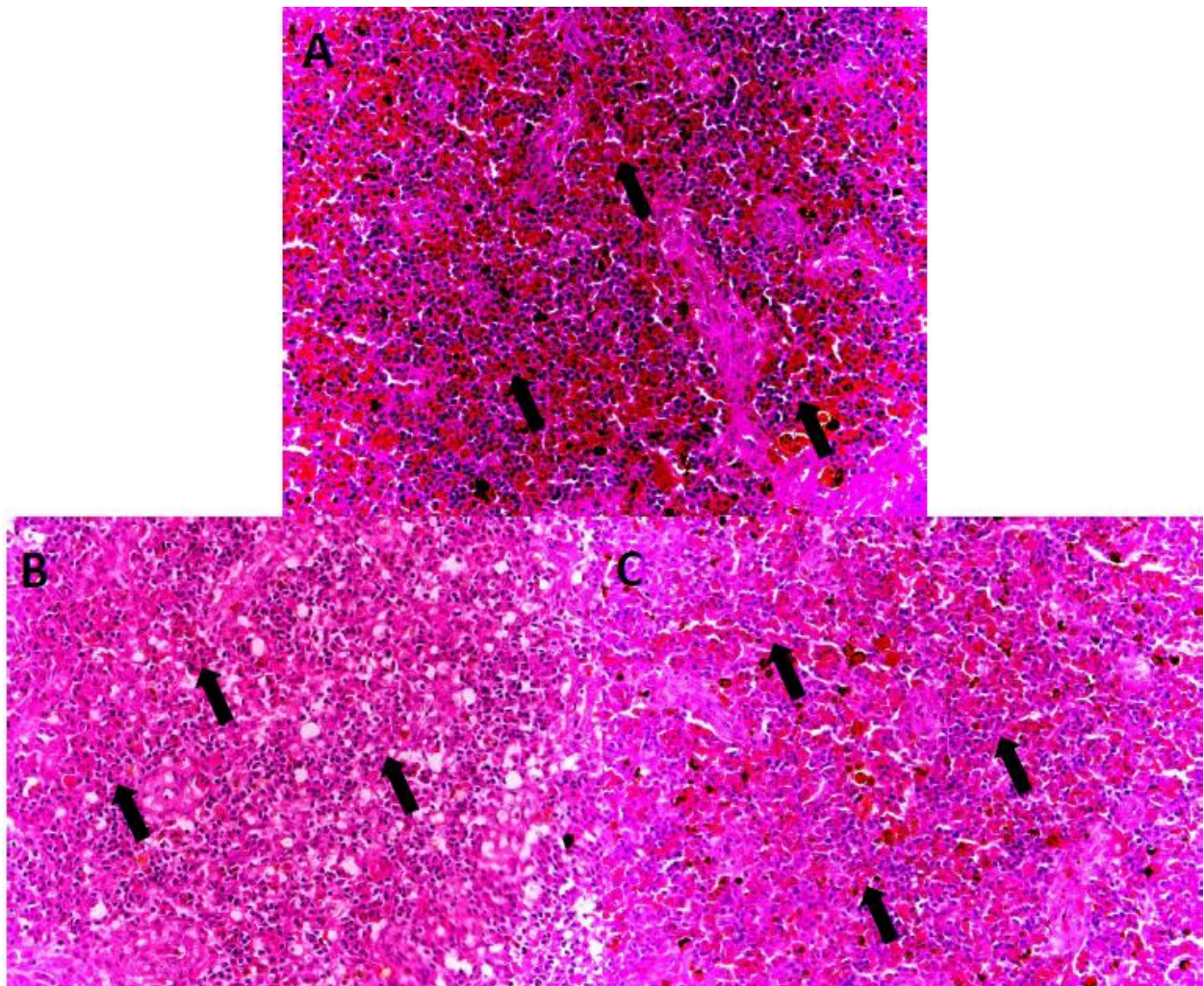


Figura 12 - Fotomicrografia esplênica, 48 HPI: A - grupo PF; B – grupo NN; C - grupo CG. Eritrócitos (setas preta). Coloração HE. 400x.

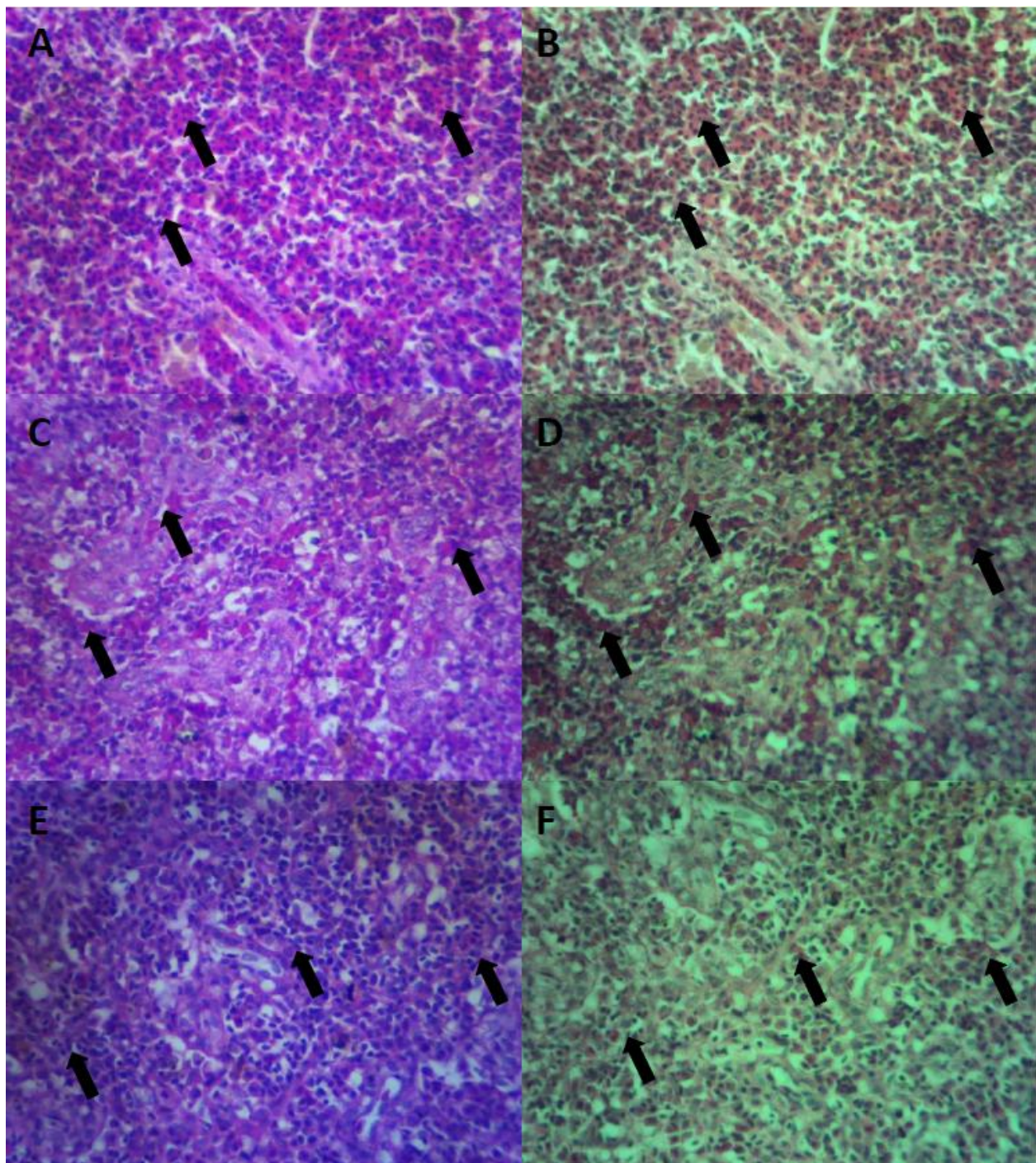


Figura 13 - Fotomicrografia esplênica, 24 HPI: A e B - grupo PF; C e D - grupo NN; E e F - grupo CG. Eritrócitos (seta preta). Imagens B, D e F foram submetidos à leitura por uso de filtro verde para melhor destaque de eritrócitos. Coloração HE. 400x.

6. DISCUSSÃO

O estudo da aerocistite induzida por *A. hydrophila* em tilápias do Nilo demonstrou elevado acúmulo celular no foco inflamatório nos três períodos analisados (6, 24 e 48 HPI), diferentemente de outros estudos que utilizaram este mesmo modelo experimental e verificaram pico de acúmulo celular com 24 HPI e queda com 48 HPI (REQUE et al., 2010; CLAUDIANO et al., 2013; CASTRO et al., 2014). A diferença observada possivelmente se atribui ao tipo de estímulo inflamatório empregado, tendo em vista que estes autores empregaram bacterinas em seus estudos e não o patógeno vivo como na presente investigação.

O estímulo da bacterina parece ser mais facilmente debelado pelo organismo que demonstra uma recuperação marcada pela diminuição da migração celular para o foco inflamado com 48 HPI. Enquanto que o estímulo exercido pela bactéria viva perdura por mais tempo, pois o microrganismo oferece maior trabalho celular ao sistema de defesa do hospedeiro, necessitando de um aporte celular maior e por um período de tempo mais longo (KUMAR et al., 2010). O hemograma das tilápias revelou diminuição do número de trombócitos, leucócitos totais e linfócitos em peixes que foram submetidos à indução de aerocistite em relação ao padrão fisiológico, sugerindo que esta perda seja resultante da migração celular para o foco inflamatório (KUMAR et al., 2010).

A intoxicação com tetracloreto de carbono e o tratamento com dexametasona influenciaram o comportamento de acúmulo celular no foco inflamado. Tilápias intoxicadas com CCl_4 apresentaram aumento do acúmulo celular tardiamente associado a diminuição no número global de leucócitos circulantes, demonstrando claramente a relação entre a atividade celular no foco inflamado e o seu recrutamento do compartimento sanguíneo. Enquanto que tilápias tratadas com dexametasona apresentaram aumento no número de leucócitos circulantes na fase mais aguda, possivelmente resultante da atividade deste glicocorticoide sobre mecanismos de permeabilidade vascular e diapedese (SPINOSA et al., 2011).

Diferentemente dos peixes intoxicados com CCl_4 , o acúmulo celular no sítio da inflamação de peixes tratados com dexametasona ocorreu também na fase mais tardia,

porém associado ao aumento no número de leucócitos no sangue. Outros estudos demonstraram claramente o efeito glicocorticoide do cortisol sobre o acúmulo celular durante a reação inflamatória diminuindo o recrutamento de macrófagos e formação de gigantócitos durante resposta crônica em pacu (BELO et al., 2005; BELO et al., 2012) e suprimindo o acúmulo de células inflamatórias durante resposta aguda de tilápias (CASTRO et al., 2014).

A diferença no perfil de resposta observado entre tilápias tratadas com dexametasona ou CCl_4 é resultado dos efeitos lesivos no tecido hepático de peixes intoxicados. De acordo com Belo et al. (2012), ocorre acúmulo de células inflamatórias no tecido hepático lesionado resultante da peroxidação lipídica na membrana celular do hepatócito causada pela produção de radicais livres na metabolização do CCl_4 . As alterações histopatológicas observadas no tecido hepático e o aumento da atividade sérica de AST no estudo bioquímico das tilápias intoxicadas com CCl_4 corroboram a hipótese de que a lesão no tecido hepático se processava ao mesmo tempo e concorria com inflamação induzida na bexiga natatória, resultando nas alterações observadas no estudo celular.

A resposta inflamatória em peixes tratados com CCl_4 mostrou-se mais intensa decorrente do transtorno hepático, portanto, sendo proporcional ao aumento da intensidade do estímulo inflamatório causado pela ação do CCl_4 (GARCIA LEME, 1989). Inclusive tilápias submetidas à associação com ambos os compostos apresentaram mudança neste comportamento e o pico de acúmulo celular antecipou e ocorreu com 24 horas, resultado provavelmente do efeito do estímulo exercido por ambas as drogas e da ação da dexametasona sobre os processos de permeabilidade vascular e diapedese.

Outro aspecto relevante atenta-se ao predomínio de granulócitos no foco inflamatório das tilápias em todos os tempos estudados, demonstrando assim neste teleósteo o importante papel destas células na reação inflamatória aguda, que apresenta marcada migração principalmente de neutrófilos para o sítio inflamado (KATZENBACK e BELOSEVIC, 2009).

O estudo leucocitário das tilápias demonstrou aumento no número de neutrófilos em peixes intoxicados com tetracloreto na fase mais aguda (6 e 24 HPI), porém estas

contagens caíram na fase mais tardia (48 HPI), inversamente ao observado no exsudato que apresentou aumento gradativo entre os períodos analisados. Quando se associou dexametasona ao CCl₄, ocorreu neutrofilia e pico de acúmulo de granulócitos no foco inflamado com 24 horas, demonstrando em ambos os casos o mesmo perfil de resposta observado na contagem total de leucócitos e no acúmulo celular no exsudato, confirmando a importante participação dos neutrófilos na resposta inflamatória aguda de tilápias (KATZENBACK e BELOSEVIC, 2009).

Os neutrófilos correspondem a 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. Durante a fase aguda da inflamação, principalmente em casos de infecção bacteriana, ocorre recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório e aumento na sua produção (HOCHBERG et al., 2003).

Em nosso estudo demonstramos a predominância de neutrófilos na aerocistite bacteriana em conformidade ao estudo de Endo et al., (1997), o qual induziu inflamação por *E. coli* em tilápias do Nilo. Fenômeno decorrente da presença de lipopolissacarídeos na membrana externa (LPS) e endotoxinas, descritos como potentes quimiotáticos 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.

Segundo Tavares-Dias et al.(2008) e Passantino et al. (2010), os trombócitos nos peixes teleósteos possuem papel importante na defesa orgânica, auxiliando principalmente mecanismos imunes inatos, além de participarem efetivamente do processo de coagulação sanguínea. As tilápias intoxicadas com CCl₄ revelaram exsudação com elevado acúmulo de trombócitos na fase mais tardia (48 HPI), ao passo que o tratamento com dexametasona resultou em aumento gradativo entre os períodos observados. Paralelamente, o hemograma das tilápias apresentou trombocitopenia na fase mais aguda (6 HPI) em animais intoxicados com CCl₄ devido a

diminuição da formação dos fatores de coagulação (ICHINOSE & DAVIE, 1994) decorrentes do comprometimento hepático provocado pelo CCl₄. Com a evolução do processo infeccioso, os animais intoxicados apresentaram anemia macrocítica-normocrômica, possivelmente resultante da ação hemolítica da *A. hydrophila*.

Por outro lado, tilápias tratadas com dexametasona apresentaram trombocitopenia mais tardiamente (24 HPI) resultante do bloqueio dos mecanismos de permeabilidade vascular que retardaram esta resposta. Os eventos vasculares influenciados pelos glicocorticoides incluem a estabilização da integridade microvascular, por meio de eventos indiretos como supressão da síntese de agentes trombogênicos (SPINOSA et al., 2011). Os peixes tratados somente com dexametasona apresentaram diminuição no número de trombócitos na fase mais tardia da resposta inflamatória, provavelmente decorrente do aumento da permeabilidade vascular acompanhada da estabilização da formação de agentes trombogênicos.

Animais controles não tratados e inoculados com *A. hydrophila* apresentaram trombocitose na fase mais tardia (48 HPI). Tais achados sugerem que as alterações hemorrágicas e a ação hemolítica decorrentes da patogênese desta bacteriose (JANDA & ABBOTT, 2010) tenham resultado em estímulo para a produção de trombócitos, aumentando significativamente sua população no compartimento plasmático e no exsudato.

O estudo do acúmulo de linfócitos no exsudato revelou aumento gradativo no número de células durante os períodos analisados, sendo estes achados fortemente influenciados pelo tratamento com dexametasona, principalmente na fase mais tardia com 48 HPI. No hemograma, tilápias inoculadas com *A. hydrophila* apresentaram diminuição significativa de linfócitos durante todo o período experimental. No entanto, na fase mais aguda do processo inflamatório, a intoxicação com CCl₄ suprimiu com mais intensidade o número circulante de linfócitos provavelmente decorrente da condição de estresse provocada pela ação aguda do CCl₄. Os animais tratados apenas com dexametasona apresentaram linfopenia mais tardiamente com 24 e 48 HPI.

Na literatura, inúmeras investigações demonstraram a atividade supressora dos glicocorticoides sobre a população de linfócitos circulantes. TORT (2011) descreveu a importante relação entre os elevados níveis de cortisol endógeno e a imunossupressão

de mecanismos de defesa em peixes teleósteos. E segundo este autor, a população de linfócitos sofre variações significativas durante o estresse em virtude das elevadas concentrações de glicocorticoides. Outra hipótese para as alterações no número de linfócitos circulantes refere-se ao fato de que a linfopenia atribuída ao uso de glicocorticóides seja resultado da redistribuição dos linfócitos para os órgãos linfáticos, de alterações nas moléculas de adesão (BOUMPAS, 1993) e eventualmente apoptose celular (CIDLOWSKI, 1996). E a amplificação linfocitária sofre alteração pela diminuição da expressão e síntese de IL-2 (AMANO et al., 1993; KITAJIMA et al., 1996).

Assim como em mamíferos, estudos com peixes teleósteos tem demonstrado que a migração de macrófagos para o foco inflamatório ocorre tardiamente (BELO et al., 2005 e 2012; REQUE et al., 2010; CLAUDIANO et al., 2013; CASTRO et al., 2014). O gradativo no acúmulo destas células presentes no exsudato entre os períodos analisados. Porém, a intoxicação com CCl₄ influenciou significativamente a migração de macrófagos em tilápias com aerocistite induzida por *A. hydrophila*.

Estes resultados foram mais expressivos em tilápias submetidas à associação com dexametasona, inclusive nestes animais ocorreu na fase tardia correlação entre o aumento de macrófagos no exsudato e a marcada monocitose no hemograma. De acordo com SAKABE et al. (2013), os macrófagos nos tecidos são resultados da diapedese e diferenciação de monócitos circulantes, e a taxa de renovação destas células no sítio inflamado depende do tipo e da intensidade do estímulo, contribuindo para a ativação de mecanismos quimiotáticos para síntese e recrutamento. SPINOSA et al. (2011) discutiram o efeito dos glicocorticoides na apresentação de antígenos aos receptores de membrana dos monócitos fagocitários, fato que poderia estar relacionado aos achados destes estudo, com aumento de monócitos no sangue associado ao acúmulo de macrófagos no foco da inflamação.

Fez parte dos objetos deste estudo induzir uma hepatotoxicidade transitória, devido à elevada capacidade de regeneração do fígado (KUMAR et al., 2010), pois o fato de debilitar as funções hepáticas de forma transitória permitiria compreender melhor a importância da participação hepática durante o curso da inflamação aguda. O estudo histopatológico e as provas bioquímicas séricas demonstraram o efeito agudo

da intoxicação com dose única de CCl_4 com o pico de atividade enzimática de AST em 6 horas, diminuindo gradativamente, inclusive alcançando valores basais com 48 horas. As alterações histopatológicas mais severas na região centrolobular do parênquima hepático foram também observadas com 6 HPI, com alteração da arquitetura celular e evidente diminuição da veia central e estase sanguínea.

Como resultado da intoxicação hepática transitória, ocorreu supressão da resposta imune inata observada na fase inicial de peixes intoxicados com CCl_4 , resultando em aumento tardio de células inflamatórias no exsudato com marcado aumento de granulócitos, linfócitos, trombócitos e macrófagos. Para KUMAR et al. (2010), mediadores químicos da resposta inflamatória aguda apresentam diversas origens de pré-formação ou sintetização entre estas o fígado. Neste sentido, com a recuperação do transtorno hepático houve maior ação dos mediadores inflamatórios sobre as células e consequente migração para o foco lesado.

Outra hipótese que poderia justificar a migração tardia de células inflamatórias em animais intoxicados com tetracloreto seria a imunocompetência das tilápias na fase inicial da reação inflamatória, pois devido o comprometimento hepático o sistema de defesa destes animais não teria sido tão eficiente para debelar a infecção bacteriana, necessitando de um incremento desta resposta na fase tardia associado à recuperação das funções do fígado (ABBAS et al., 2008).

Analisando a resposta eritrocitária, notou-se nos peixes do grupo somente inoculado com *A. hydrophila* (24 HPI) um maior número de eritrócitos, acompanhado de diminuição do VCM, confirmando um quadro de microcitose, sendo este efeito não mais observado no período de 48 HPI para todos os tratamentos efeito provavelmente decorrente da ação hemolítica da *A. hydrophila*. No entanto, peixes intoxicados com CCl_4 apresentaram quadro de microcitose com diminuição dos níveis circulantes de hemoglobina e nos valores de CHCM na fase mais aguda com 6HPI. A microcitose representa uma evidência morfológica de capacidade diminuída dos precursores das hemácias na produção de hemoglobina podendo ser resultante de ferro Insuficiente.

Neste sentido, o fígado é responsável pela filtragem e armazenamento de sangue e ferro (GUYTON & HALL, 2011). O transtorno temporário e agudo causado pelo CCl_4 pode ter influenciado nas funções de armazenagem e filtragem do ferro e

consequentemente acarretado a microcitose temporária. O ferro é transportado no plasma pela transferrina (Tf), uma glicoproteína de 80 KDa sintetizada e secretada pelo fígado, que possui dois sítios homólogos com alta afinidade pelo Fe^{3+} . Além de solubilizar o ferro, a Tf atenua sua reatividade e facilita a sua liberação para as células (PONKA et al., 1998).

O hemograma revelou aumento do VCM na fase tardia (48HPI) em animais intoxicados com CCl_4 e somente inoculados com a bactéria. O VCM alto indica eritrócitos jovens provavelmente recrutados da medula óssea devido ao efeito hemolítico da *A. hydrophila* (JANDA & ABBOTT, 2010), ressalta-se nesta análise que os peixes intoxicados com CCl_4 apresentavam também diminuição do número de hemácias, caracterizando um quadro de anemia macrocítica-normocrômica. Entre as causas descritas na literatura para ocorrência desta patologia em mamíferos, destacam-se as doenças hepáticas (THARLL, 2007), sugerindo a hipótese de que os transtornos hepáticos induzidos pelo CCl_4 , conjuntamente com a infecção por *A. hydrophila* tenham resultado nestas alterações hematológicas. Os peixes tratados somente com dexametasona apresentaram alterações hematológicas semelhantes com 24 HPI, possivelmente resultado da ação patogênica da bactéria associada a atividade mineralocorticoide deste esteróide.

Em todos os peixes tratados com dexametasona e/ou intoxicados com CCl_4 , observou-se diminuição nos valores somáticos esplênicos quando comparados com o padrão fisiológico, sendo estes resultados mais significativos em peixes tratados com ambas as drogas. Inclusive, o estudo histopatológico do baço demonstrou uma diminuição no número de hemácias presentes no estroma esplênico destes animais. Segundo GUYTON & HALL (2011), o baço é o maior reservatório de sangue para disponibilização em condições emergenciais. Os resultados do estudo de IES corroboram as alterações hematológicas observadas, pois em condições de estresse os elevados níveis de catecolaminas atuam sobre os receptores alfa-adrenérgicos presentes na cápsula esplênica, resultando na contração deste órgão e liberação das hemácias armazenadas para a circulação sistêmica (BELO et al., 2013).

Em peixes inoculados com *A. hydrophila* observou-se aumento no IHS 6 HPI. Porém no estudo comparativo entre os tratamentos não ficou evidente a participação

do tetracloreto nesta análise. Rikans et al. (1994) também não observou diferença na relação peso do fígado / peso do corpo em Ratos tratados com CCl₄ em uma dose de 1 mg kg⁻¹. Geralmente a alteração no volume do fígado da-se em processos crônicos (KUMAR et al., 2010).

A intoxicação com CCl₄ resultou em aumento na atividade enzimática de AST, na concentração de proteínas total, glicose, triglicerídeos e colesterol na fase inicial do processo inflamatório. O pico de AST ocorreu no tempo de 6 HPI, decrescendo 24 HPI e com 48HPI retornou aos valores basais. O AST é uma enzima indicadora sensível de dano hepático, particularmente quando há uma lesão aguda, portanto quando temos uma lesão hepática há extravasamento da enzima para o plasma (THRALL et al., 2007). Vários autores descrevem o aumento plasmático de AST em peixes submetidos ao tratamento com CCl₄ como Ribergh & Lipsky (1997) em culturas primárias de hepatócitos de truta arco-íris e Chen et al. (2004); Racicot et al. (1975); Statham et al. (1978) em *Oncorhynchus mykiss*.

A fosfatase alcalina é produzida em diversos órgãos, destaca-se como fonte o fígado. Apresenta como diferencial ser uma enzima de indução, ou seja, necessita de agente indutor para ser produzida pelas células (THRALL et al., 2007). Neste estudo, os peixes que receberam somente CCl₄ apresentaram menor concentração de FA em relação ao PF, fato pode ser resultante do menor número de hepatócitos para indução de produção da enzima devido a degeneração gordurosa e lesão de hepatócitos.

O mesmo não é observado no grupo que recebeu concomitantemente glicocorticóide. Em cães, observa-se pela ação do glicocorticóide o aumento discreto de enzimas de extravasamento como observado neste estudo na fase mais aguda pelo aumento AST e aumento também da enzima da fosfatase alcalina por indução de síntese pelo glicocorticóides nos hepatócitos (SHAIHBAZKIA et al., 2010; THRALL et al., 2007).

A concentração de albumina diminuiu nos peixes intoxicados com CCl₄ nos tempos de 24 HPI em relação 6 HPI. A albumina é uma proteína de fase aguda, produzida pelo fígado (ECKERSALL, 2008). Gabay & Kushner (1999) verificaram durante o curso da inflamação um diminuição sérica por consumo desta proteína. Esta característica exacerbou-se mais nos grupos com transtorno hepático devido à

diminuição da síntese de albumina. Na fase mais tardia é notada uma recuperação provavelmente decorrente recuperação de síntese da albumina pelo fígado. FOLMAR (1993) também notou diminuição na concentração plasmática de albumina em estudo com CCl₄ em peixes teleósteos.

Peixes tratados somente com glicocorticóide na fase mais tardia analisada apresentaram maior concentração de proteína total e globulinas em relação aos demais peixes que receberam inóculo de *A. hydrophila*. Com a passagem do efeito antiinflamatório da dexametasona, todos os efeitos da inflamação que foram retardados são recompensados assim como a sintetização de proteínas da fase aguda pelo fígado (BOUMPAS et al., 1993).

No comparativo entre tratamentos no tempo de 6 HPI, a concentração de glicose mostrou-se aumentada em relação aos demais grupos que receberam CCl₄. Sendo maior nos peixes que receberam simultaneamente CCl₄ e Dexa, mantendo efeito semelhante 24 e 48 HPI. Em situação de transtorno hepático pode haver menor absorção hepática da glicose, tornando totalmente disponível no sangue (THARLL et al., 2007). A interação com o glicocorticóide resultou em aumento plasmático maior. O glicocorticóide estimula a liberação das catecolaminas na corrente sanguínea levando a maior disponibilização de glicose para o organismo através de glicogenólise hepática e gliconeogenese à partir de aminoácidos de origem muscular e ácidos graxos do tecido adiposo (BRIERRE et al., 2004).

A concentração de triglicerídeos diminuiu nos peixes intoxicados com CCl₄ na fase inicial da avaliação. Este incidente decorreu possivelmente do maior acúmulo de triglicerídeos no fígado (degeneração gordurosa), advindos do transtorno hepático como resultado do uso do CCl₄. Com a alteração das funções hepáticas, tornou-se o processo de distribuição de lipídios falho consequentemente houve diminuição na concentração plasmática (FISCHER-NIELSEN et al., 1991; WATERFIELD et al., 1991; LEE et al., 2011).

Estudo realizado em ratos como modelo de indução de transtorno hepático por CCl₄ revelou redução de triglicérides e colesterol plasmáticos. Diante deste resultado estudou-se expressão de apolipoproteínas: A ApoA responsável por HDL e a ApoB responsável por LDL e triglicérides. Obtendo a expressão aumentada de ApoB hepática

com 4 ou 8 horas após exposição ao CCl₄, não havendo alteração de ApoA1. No plasma, a expressão de ApoB foi diminuída após a injeção de CCl₄, enquanto o nível de ApoA1 não foi afetada. A diminuição da expressão de ApoB no plasma foi consistente com uma redução nos triglicérides do plasma em 4 e 8 h (LEE et al., 2011), demonstrando que uma dose única de CCl₄ pode diminuir plasma ApoB e transitoriamente acumular triglicerídeos hepáticos e colesterol no fígado.

Em relação ao colesterol observa-se que ele é encontrado em grande concentração nas membranas plasmáticas (CHARLTON-MENYS & DURRINGTON, 2007). Em nosso estudo na fase inicial houve maior concentração de colesterol apenas no grupo CN, fato sugere que este colesterol seja proveniente da lise das membranas plasmática dos hepatócitos, o fato não ocorre no grupo CG devido à ação de glicogenólise e de diminuição da permeabilidade vascular pelo glicocorticoide (BOUMPAS, 1993).

No entanto, na fase mais tardia 48 HPI novamente ocorreu aumento do colesterol plasmático no grupo com CCl₄. Os triacilgliceróis representam a principal forma de lípidios no organismo animal, sendo transportados entre os tecidos, nas lipoproteínas, e estocados como reserva energética no tecido adiposo. As lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL) transportam os triacilglicerol para os tecidos extra hepáticos onde ocorre hidrólise mediante ação das lipoproteínas lipase. Formando como resíduo lipoproteínas de densidade intermediária, que por ação das lipoproteína lipase origina o LDL (lipoproteínas de baixa densidade), segundo Reece et al. (2006).

O HDL (lipoproteínas de alta densidade) são provenientes do fígado e na sua maioria de origem intestinal. Após tornar-se maduro também há necessidade de endocitose hepática. Neste sentido, com transtorno hepático há alteração da remoção plasmática de LDL e HDL plasmático, portanto havendo acúmulo do colesterol (REECE et al., 2006), correlação muito semelhantemente foi descrita em teleósteos (MOMMSEN et al., 1999).

Peixes que receberam somente glicocorticóide apresentaram aumento progressivo da concentração sérica de colesterol. Atendo-se na fase mais tardia para a maior concentração de triglicerídeos nestes animais em relação aos peixes também desafiados. Segundo estudos, os glicocorticoides são fármacos com potente ação no

metabolismo intermediário equiparando seus efeitos com ações hormonais do cortisol, preparando o organismo para situação de estresse. Fisiologicamente ambos promovem maior disponibilidade de energia para o corpo, através de mobilizações rápidas de reservas hepáticas (glicogenólise), ocorrendo hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia(MOMMSEN et al. , 1999; WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON & IWAMA, 1991). No entanto, ações persistentes de estresse resultam em diminuição das reservas de glicogênio hepático, dessa forma usando fontes de energias alternativas, tais como mobilização de gordura corporal (lipólise) e proteínas musculares convertidas em glicose no fígado (BARTON & IWAMA, 1991).

7. CONCLUSÃO

Os resultados observados nesta investigação permitem extrair as seguintes inferências:

- A dose de 0,5 mL de CCl₄ via Intracelomática mostrou-se satisfatória na indução de lesão hepática transitória. Com formação de degeneração gordurosa acompanhada de aumento sérico da enzima AST, sendo estes transtornos recuperados ao longo do estudo
- A indução de aerocistite por *Aeromonas hydrophila* mostrou-se satisfatória pela cinética de acúmulo celular no foco inflamatório.
- O tratamento com dexametasona mimetizou ação do cortisol no organismo, retardando a resposta celular na reação inflamatória principalmente sobre os linfócitos e no metabolismo energético, caracterizando quadro de imunossupressão.
- O transtorno hepático acarretou diversas alterações reversíveis no mecanismo da resposta inflamatória como diminuição da síntese de proteínas e formação de degeneração gordurosa hepática bem com alteração do metabolismo energético apresentando muitas vezes efeito sinérgico quando associado à dexametasona, além de haver resultados sugestivos de diminuição da produção de fatores de

coagulação, mediadores químicos e inibição de receptores de membrana celular.

- Peixes com transtorno hepático e com aerocistite apresentaram resposta inflamatória mais intensa decorrente do estímulo inflamatório conjunto do CCl₄ e da bacteria *A. hydrophila*. Portanto havendo maior estímulo inflamatório haverá maior reação inflamatória.

8. CONSIDERAÇÃO FINAL

No contexto deste estudo salientamos a necessidade de atentar-se ao emprego indiscriminado de terapêuticos aquícolas e produtos químicos provenientes da atividade agrícola bem como despejos de esgotos industrial ou domiciliares. Todos estes atuam como xenobióticos ao metabolismo hepático. Como consequências causam transtorno na atividade hepática, comprometendo a resposta inflamatória e tornando os organismos aquáticos representado neste estudo pela espécie tilápia do Nilo, mais susceptíveis ao adoecimento. Este fato alerta há necessidade de regulamentação e fiscalização ambiental quanto ao uso de substâncias terapêuticas na aquicultura entre outros despejos químicos ao redor ou no meio aquático.

Neste sentido, com maximização da produção aquícola há necessidade fornecimento de ração industrial. Este não pode visar apenas o ganho de peso, mas também devem ser equilibrada nutricionalmente: Dietas ricas em lipídios ou mesmo com alta concentração proteica podem sobrecarregar a função hepática e comprometendo assim a resposta de defesa destes animais.

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; POBER, J. S.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2008. 580 p.

ALEXANDRINO, A. C.; OKUMURO, M. P. M.; BALDASSI, L.; ARAUJO, A. P.; KURODO, C. K.; ARAUJO, C. K.; WALKASA, Y. S. Ocorrência de *Aeromonas*

hydrophila em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intenso-relato de caso. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 111-117, 2000.

AMANO, Y.; LEE, S. W.; ALLISON, A. C. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin- 1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin- 6: Mediation by decreased mRNA stability. **Mol Pharmacol**, Bethesda, v. 43, n. 2, p. 176-82, 1993.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens**: disease of farmed and wild fish. 3. ed. Chichester: Springer Praxis, 1999. 459 p.

BARJA, J. L.; ESTEVES, A. T. **Patologia en acuicultura**: enfermidades bacterianas. [S.l.]: Caicyt, 1988. 550 p.

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.

BASU, S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation:eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. **Toxicology**, Amsterdam, v. 189, n. 1-2, p. 113-127, 2003.

BELO, M. A. A.; SOARES, V. E; SOUZA, L. M.; SOBREIRA, M. F. R.; CASOL, D. M. S.; TOMA, S. B. Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. **Exp.Toxicol. Pathol.**, Jena, v. 64, n. 3, p. 155-165, 2012a.

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

BELO, M. A. A.; SOUZA, L. M.; SOARES, V. E.; SOBREIRA, M. F. R.; CASOL, D. M. S.; TOMA, S. B. Tratamento hepatoprotetor favorece a resposta leucocitária de ratos wistar intoxicados por CCl₄. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba, v. 14, n. 2, p. 74-82, 2009.

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. 146-154, 2005.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas: curso básico atualizado de imunologia para o reumatologista. **Temas Reumatol. Clín.**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007.

BRIERRE, S.; KUMARI, R.; BEBOISBLANC, B.P. The endocrine system during sepsis **The Amer J Med. Sci.**, Philadelphia, v. 328, n. 4, p. 302-247, 2004.

BOOTH, N.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 997 p.

BOUMPAS, D. T.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L.; CUPPS, T. R.; BALOW, J. E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Ann. Intern. Méd.**, Charlottesville, v. 119, n. 12, p. 1198-1208, 1993.

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

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environ. Microbiol.**, Chichester, v. 8, n. 7, p. 1137–1144, 2006.

CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no rio Aquidauana, Mato Grosso do sul, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 200-205, 2008.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. **Aquac. Res.**, West Sussex, v. 32, n. 4, p. 297-304, 2001.

CASILLAS, E.; MYERS, M.; AMES, W. E. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 61–78, 1983.

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 carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae* **Fish & Shellfish Immunol.**, n. 36, p.284-290, 2014.

CENTER, S. A. Fisiopatologia, diagnóstico laboratorial, e afecções do fígado. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. 5. ed. São Paulo: Manole, 2004. v. 2, p. 1745-1816.

CHEN, C. Y.; WOOSTER, G. A.; BOWSER, P. R. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *vibrio vulnificus* or *streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 239, n. 1-4, p. 421-443, 2004.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P. N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. **Exp Physiol.**, West Sussex, v. 93, n. 1, p. 27-42, 2007.

CIDLOWSKI, J. A.; KING, K. L.; EVANS-STORMS, R. B. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in immune system. **Recent Prog Horm Res.**, Chavei Chase, v. 51, p. 457- 490, 1996.

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.

COLONNA, M.; PULENDRAN, B.; IWASAKI, A. Dendritic cells at the hostpathogen interface. **Nat. Immunol.**, New York, v. 7, n. 2, p. 117-120, 2006.

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

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155.

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.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm2006773.htm>

FISCHER-NIELSEN, A.; POULSEN, H. E.; HANSEN, B. A. CCl₄ cirrhosis in rats: irreversible histological changes and differentiated functional impairment. **J Hepatol**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 110-117, 1991.

FOLMAR, L. C. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: a bibliography and synopsis of selected effects. **Environ. Toxicol. Chem.**, Hoboken, v. 12, n. 2, p. 337–375, 1993.

FREUNDENBERG, M. A. The fate of lipopolysaccharides in rats: evidence from chemical alteration in the molecule. **Rev. Infect. Dis.**, Cary, v. 6, n. 4, p. 483-487, 1984.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver. **Physiology**, Bethesda, v. 88, n. 1, p. 125-172, 2008.

GABAY , C & KUSHNER, I, Acute fase protein and other sistemic responses to inflammation, **New Engl. J. Medic.**, v. 340, n. 6, p.448-454, 1999.

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

GINGERICH, W. H. Hepatic toxicology of fishes. In: WEBER, L. J. (Ed.). **Aquatic toxicology**. New York: Raven Press, 1982. p. 55–105.

GIRÓN-PÉREZ, M. I.; SANTERRE, A.; GONZALEZ-JAIME, F.; CASAS-SOLIS, J.; HERNANDÉZ-CORONADO, M.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; TAKEMURA, A.; ZAITSEVA, G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. **Fish Shellfish. Immunol.**, London, v. 23, n. 4, p. 760-769, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: 2011. 1176 p.

HINTON, D. E.; SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Toxic responses of the liver. In: SCHLENK, D.; BENSON, W. H. (Ed.). **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. London: Taylor & Francis, 2001. p. 224–268.

HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

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

ICHINOSE, A ; DAVIE, E.W. **The blood coagulation factors: Their cDNAs, genes, and expression** R.W. Colman, J. Hirsh, V.J. Marder, E.W. Salzman (Eds.), Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice 3 ed.), J.B. Lippincott Company, Philadelphia, p.. 19 – 54, 1994.

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

JANDA, J. M.; ABBOTT, J. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clin Microbiol Rev**, Washington, DC, v. 23, n. 1, p. 35–73, 2010.

JIA, R.; CAO, L.; XU, P.; JENEY, G.; GUOJUN, Y. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective and antioxidant effects of Astragalus polysaccharides against carbontetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) **Fish Physiol. Biochem.**, Dordrecht, v. 38, n. 3, p. 871-881, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/S10695-011-9575-z>>. Acesso em: 05 fev. 2014.

KANTER, M.; COSKUN, O.; BUDANCAMANAK, M. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbontetrachloride-treated rats. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 11, n. 42, p. 6684-6688, 2005.

KATZENBACK, B. A.; BELOSEVIC, M. Molecular and functional characterization of kitarin and kitarinase in the goldfish (*Carassius auratus* L.). **Dev Comp Immunol.**, Kidlington, v. 33, n. 11, p. 91-99, 2003.

KITAJIMA, T.; ARIIZUMI, K.; BERGSTRESSER, P. R. A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. **J Clin Invest.**, Ann Arbor, v. 98, n. 1, p. 142-147, 1996.

KONERI, R.; BALARAMAN, R.; FIRDOUS, K. M. V. Hepatoprotective effects of *Momordica Cymbalaria* Fenzl. against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. **Pharmacologyonline**, Salerno, v. 1, p. 365–374, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. ; ASTER, J. C. **Robbins & Contran Patologia Bases patológicas das doenças**. 8. ed. [S.n: s.l.], 2010. 1548 p.

LEE, C. Y.; PENG, W. H.; CHENG, H. Y.; CHEN, F. N.; LAI, M. T.; CHUI, T. H. Hepatoprotective effect of *Phyllanthus* in Taiwan on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. **Am. J. Chin. Med.**, Singapore, v. 34, n. 3, p. 471–482, 2006.

LEE, G. H.; BHANDARY, B.; LEE, E. M.; PARK, J. P.; JEONG, K. S.; KIM, I. K.; KIM, H. R.; CHAE, H. J. The roles of ER stress and P450 2E1 in CCl₄-induced steatosis. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, Kidlington, v. 43, n.10, p. 1469-1482, 2011.

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.

MATUSHIMA, E. R. **Cinética da reação inflamatória induzida pela carragenina na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo)**. 1988. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

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.**, Curitiba, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

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

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. V.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, Dordrecht, v. 9, n. 3, p. 211-268, 1999.

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*. **Rev. Ciênc. Agropec.**, [Santa Catarina, v. 12, p.1-3, 2011. Número especial]. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/815.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2013.

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

NOGA, E. J. The importance of *Lernaeus cruciatus* (LeSeuer) in the initiation of skin lesions in largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede) in the Chowan River, North Carolina. **J. Fish Dis.**, Oxford, v. 9, p. 295-302, 1986.

PARFITT, K.; SWEETMAN, S. C.; BLAKE, P. S.; PARSONS, A. V. Corticosteroids. In: PARFITT, K. **Martindale: the complete drug reference**. 32. ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. p. 1010-1051.

PASSANTINO L., CIANCIOTTA A., PATRUNO R., RIBAUD M. R., JIRILLO E., PASSANTINO G. F. Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine *candidiasis* *aquarium*. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** N.27, p. 345–356, 2005.

PAWA, S.; ALI, S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. **Bioch. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1688, n. 3, p. 210-222, 2004.

PONKA, P.; BEAUMONT, C.; RICHARDSON, D. R. Function and regulation of transferrin and ferritin. **Semin Hematol.**, v. 35, n. 1, p. 35-54, 1998.

POPOFF, M. III Genus *aeromonas* kluver and van Niel. In: DRIEG, N. R. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 545–548.

RACICOT, J. G.; GAUDET, M.; LERAY, C. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) with emphasis on their diagnostic use: study with CCl₄ toxicity and a case of *Aeromonas* infection. **J. Fish Biol.**, Chichester, v. 7, n. 6, p. 825–835, 1975.

REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. [Rio de Janeiro]: Guanabara, 2006. 926 p.

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

RIBERGH, C. M. I.; LIPSKY, M. M. Toxicity of chloroform and carbon tetrachloride in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 37, n. 1-2, p. 169–182, 1997.

RIKANS, L. E.; HORNBROOK, K. R.; CAI, Y. Carbon tetrachloride hepatotoxicity as a function of age in female Fischer 344 rats. **Mech. Ageing. Dev.**, Shannon, v. 76, n. 2-3, p. 89-99, 1994.

ROBERTS, R. J. **Fish pathology**. 4. ed. London: W. B. Saunders, 2012. 590 p.

SAAD, S. M. I.; IARIA, S. T.; FURLAMENTO, 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.

SAKABE, R.; MORAES, F.R.; BELO, M.A.A; PILARSKI, F.; MORAES, J. R.E. Kinetics of chronic inflammation in Nile tilapia fed n-3 and n-6 essential fatty acids **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.48, n.3, p.313-319, mar. 2013.

SAKAGUCHI, H.; HAMAGUCHI, A. Physiological changes in the serum and hepatopancreas of yellowtail injected with carbon tetrachloride. **Bull. Japn. Soc. Sci. Fish.**, Tokyo, v. 413, p. 283-390, 1975.

SAS (STATISTICAL ANALYSES SYSTEM). **SAS/STAT 2001**: users guide. Version 8 ed. Cary, 2001. 1CD-ROM.

SATO, A.; MAYER, W. E.; OVERATH, P.; KLEIN, J. Genes encoding putative natural killer cell C-type lectin receptors in teleostean fishes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 100, n. 13, p. 7779-7784, 2003.

SAUER, J. M.; WAALKES, M. P.; HOOSER, S. B.; KUESTERR, K.; MCQUEEN, C. A.; SIPES, I. G. Supression of Kupfer cell function preventes cadmium induced hepatocelular necrosis in the Sprague-Dawley rat. **Toxicology**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 155-164, 1997.

SHAIHBAZKIA, H. R.; SHARIFI, S.; SHAREGHI, B. Purification and kinetc study of bone and liver alkaline phosphatase isoenzyme in the dog. **Comp. Clin. Path.**, v. 19, n. 1, p. 81-84, 2010.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Limnologia aplicada à aquicultura. Boletim Técnico n. 1. Jaboticabal: FUNEP, 1995.

SMITH, E. M.; BURKE, A.; GARRRET, A. F. Autacóides derivados de lipídios :eicosanídes e fator de ativação das plaquetas. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. p. 585-589.

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

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. [Rio de Janeiro]: Guanabara, 2011. 918 p.

STATHAM, C. N.; CROFT, W. A.; LECH, J. J. Uptake, distribution, and effects of carbon tetrachloride in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Maryland Heights, v. 45, n. 1, p. 131–140, 1978.

SWAIN, P.; NAYAK, S.K.; NANDA, P.K.; DASH, S. Biological effect of bacterial lipopolysaccharide (entoxin) in fish: A review. **Fish Shellfish Immun.**, v.25. p.191-201, 2008.

TAVARES-DIAS, T., MORAES, F.R. & MARTINS, M.L. Hematological assessment in four brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, Brazil. **Bol. Inst. Pesc.**, São Paulo, n. 34, p.189-196, 2008.

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

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Devel. Comp. Immunol.**, v.35, p.1366-1375, 2011.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.

WATERFIELD, C. J.; TURTON, J. A.; SCALES, M. D.; TIMBRELL, J. A. Taurine, a possible urinary marker of liver damage: a study of taurine excretion in carbon tetrachloride-treated rats. **Arch Toxicol**, v. 65, n. 7, p. 548-555, 1991.

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

WOLKE, E. R.; MURCHELANO, R. A.; DICKSTEIN, C. D. J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates(MA) as fish health monitors. **Bull. Environ. Cont. Toxicol.**, New York, v. 35, n. 1, p. 222-227, 1985.

YIN, G.; CAO, L.; XU, P.; JENEY, G.; NAKAO, M. Hepatoprotective and antioxidant effects of Hibiscus sabdariffa extract against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in Cyprinus carpio. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, Heidelberg, v. 47, n. 1, p. 10–15, 2011.

YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M. S. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. **African J. Biotechnol.**, Victoria Island, v. 8, n. 25, p. 7313-7318, 2009.

ZUASTI, A.; JIMEMES-CERVANTES, C.; GARCIABORON, J. C. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Arch. Histol. Cytol.**, Nigata, v. 61, n. 4, p. 305-316, 1998.