

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**LEVAMISOL E DEXAMETASONA NA INFLAMAÇÃO
CRÔNICA POR CORPO ESTRANHO EM PACU (*Piaractus
mesopotamicus*)**

Thalita Regina Petrillo
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Julho de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**LEVAMISOL E DEXAMETASONA NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA POR
CORPO ESTRANHO EM PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

Thalita Regina Petrillo

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo

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

JABOTICABAL- SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2012

Petrillo, Thalita Regina
P495 Levamisol e dexametasona na inflamação crônica por
corpo estranho em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) /
Thalita Regina Petrillo. – – Jaboticabal, 2012
x, 67 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
2012

Orientador: Flávio Ruas de Moraes
Co-orientador: Marco Antonio de Andrade Belo
Banca examinadora: Rogério Salvador, Mauricio
Laterça Martins
Bibliografia

1. Inflamação. 2. Teleósteo. 3. Imunoestimulante. 4.
Glicorticóide. 5. Hematologia I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-02:639.31



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

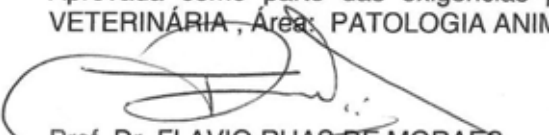
TÍTULO: LEVAMISOL E DEXAMETASONA NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA POR CORPO ESTRANHO EM PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

AUTORA: THALITA REGINA PETRILLO

ORIENTADOR: Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

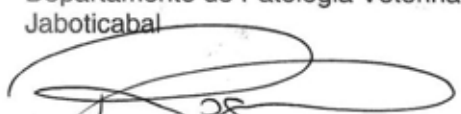
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

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



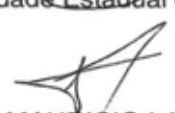
Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

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



Prof. Dr. ROGERIO SALVADOR

Universidade Estadual do Norte do Paraná / Bandeirantes/PR



Prof. Dr. MAURICIO LATERCA MARTINS

Universidade Federal de Santa Catarina / Florianópolis/SC

Data da realização: 27 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THALITA REGINA PETRILLO- Natural de São Paulo – SP, nascida em 19 de novembro de 1982, graduada em Medicina Veterinária em 2009, na Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Descalvado – SP. Durante a graduação fez parte da equipe de Desenvolvimento de pesquisas com Fisiopatologia da Inflamação- Laboratório de Farmacologia e Toxicologia animal- UNICASTELO, Bolsa de Iniciação Científica para o desenvolvimento do projeto “Estudo da produção de anticorpos anti *Neospora caninum* em cães imunizados com vacina comercial e tratados com compostos imunomoduladores” – 2009 - Universidade Camilo Castelo Branco. Orientador: Marco Antonio de Andrade Belo, fez estágios em diversas áreas do conhecimento, dentre elas, na área de Farmacologia, Clínica Médica e Cirúrgica e Patologia. Monografia realizada sob orientação do Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo, com o trabalho intitulado “Avaliação da atividade imunossupressora e a segurança clínica do tratamento com prednisolona, administrado via oral, em cães”. Em março de 2010 ingressou no programa de pós-graduação em medicina veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP Campus de Jaboticabal, Grande área: Ciências Agrárias / Área: Medicina Veterinária / Subárea: Patologia Animal sob a orientação do Professor Titular, Dr. Flávio Ruas de Moraes, Co-orientador: Dr. Marco Antonio de Andrade Belo.

Manifesto 52

*Toda a humanidade foi dividida
Desde, o princípio da existência,
Separados por línguas e culturas
Cada indivíduo com sua carência.*

*O saber de toda a raça humana
Foi repartido em varias ciências
Tornando os mestres e doutores
prisioneiros da sua sapiência.*

*A fé, há tempos vai sendo dizimada
por aqueles que camuflam a verdade
que são os bons atos e amor ao próximo,
ingredientes que salvarão a humanidade.*

*Em consequência, seres humanos matam
movidos por interesses estúpidos e fúteis
por causas mal resolvidas e
outras paixões inúteis.*

*E assim...caminhando vai a humanidade
poucos enxergando a verdadeira razão
do papel que cada um de nós representa,
na grande e infinita espiral da evolução.*

*Porem, apesar de tantas as desgraças
que observamos nos arredores do mundo
há motivos para conservar a esperança,
pois, existe pureza no coração da criança,
cabe a nós mantê-la viva, fomentá-la,*

*Ainda existem jovens escolhendo uma profissão
para melhorar suas vidas mas, também colaborar,
com o saber contribuir oferecendo uma solução.*

*Sempre existirão mestres dispostos a contribuir
quando os discípulos, seu conhecimento buscarão
o saber acadêmico e sua vivencia vão compartilhar,
assim o conhecimento adquirido jamais será em vão.*

*Resistirão os poetas com sua poesia a espalhar
Palavras de força para que nossa luta continue.
Pois, como nos diz um grandioso dito popular:
“não há bem que perdure e nem o mal que perpetue”.*

Valter Montani

AGRADECIMENTOS

Corro o risco de não dar conta desse 'muitíssimo obrigado' como é merecido, porque será difícil exprimir a beleza que foi esse movimento de energias e impulsos que foram chegando.

As minhas primeiras palavras de agradecimento são para meus pais, Antonio Marcos e Marcia Regina. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes pudéssemos realizar os nossos. Sem o amor, carinho e todo o apoio que sempre me deram ao longo dos anos possivelmente não estaria aqui.

Aos meus irmãos queridos Thassia Nathalia e Tarcio Marcos, que me incentivaram, a correr atrás dos meus objetivos sendo além de irmãos amigos, agradeço de coração.

Ao meu orientador Prof^o. Doutor Flávio Ruas de Moraes, pelo empenho, paciência e credibilidade, obrigada por tudo, ao Prof^o. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo meu co-orientador, que pelos seus conselhos e espírito de interajuda me permitiram a concretização do trabalho.

Aos meus companheiros de pesquisa e trabalho Gustavo, Hurzana, Wilson, Marcelo, Fernando, Ed Jhonny e Alessandra que me ajudaram muito durante a execução desse trabalho. O resultado desse estudo foi possível apenas pela cooperação e pelo esforço de todos.

Em especial Gustavo e Hurzana sem vocês seriam impossível, agradeço de coração, falo não só do carinho, do respeito e acima de tudo a verdadeira, que não cobra nada, que não tem valor material, mais que é capaz de enriquecer a alma de quem está próximo, mudando toda uma trajetória de vida, a amizade.

De qualquer forma, todos os que realizam um trabalho de pesquisa sabem que não o fazem sozinhos.

Todos vocês são co-autores deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
SUMARY.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Inflamação.....	2
2.1.1 Considerações gerais.....	2
2.1.2 Inflamação crônica em peixes teleósteos.....	6
2.1.3 Gigantócitos e granulomas em peixes.....	9
2.2 Efeitos dos corticosteróides em peixes teleósteos.....	11
2.2.1 Antiinflamatórios esteroidais.....	13
2.3 Efeitos do levamisol em peixes teleósteos.....	17
2.4 Hematologia em peixes teleósteos.....	18
3. OBJETIVO GERAL.....	22
3.1 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Peixes e acondicionamento.....	23
4.2 Manejo dos peixes.....	24
4.3 Monitoramento da qualidade de água.....	24
4.4 Delineamento experimental.....	25
4.5 Anestesia dos peixes.....	26
4.6 Administração dos fármacos.....	27
4.7 Implante das lamínulas de vidro.....	28
4.8 Análise hematológica.....	28
4.9 Eutanásia, colheita, fixação e coloração das lamínulas.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Inflamação tipo corpo estranho.....	32
5.2 Estudo eritrocitário.....	34

6. Discussão.....	39
6.1 Efeito do levamisol e dexametasona no perfil hematológico.....	39
6.2 Estudo da cinética de macrófagos sobre a resposta inflamatória.....	46
7. Conclusões.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AGD	Amoebic Gill Disease
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CGE	Células granulocísticas especiais
CL	Controle
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CV	Coeficiente de variação
DEXA	Dexametasona
DL	Decilitro
DPI	Dias após implante
D2	Dexametasona 2mg/kg
D2+L25	Dexametasona 2 mg/kg e levamisol 25mg/kg
D2+L50	Dexametasona 2mg/kg e levamisol 50mg/kg
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERIT	Eritrócito
FGF	Fatores de angiogênese
GC	Glicocorticóide
HE	Hematoxilina eosina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HG	Hemoglobina
Htc	Hematócrito
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgD	Imunoglobulina D
IgM	Imunoglobulina M
IgT	Imunoglobulina T

IgZ	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Kg	Kilograma
L 25	Levamisol 25mg/kg
L 50	Levamisol 50mg/kg
LEV	Levamisol
LOG	Logaritmo
MG	Miligrama
ML	Mililitro
N	Numero
NGF	Fator de crescimento neuronal
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Pr	Probabilidade de significância
RPM	Rotação por minuto
TGF	Fator de crescimento transformante
TGF-alfa	Fator de transformação de crescimento alfa
TNF	Fator de necrose tumoral
VCM	Volume corpuscular médio
%L	Porcentagem
PEPAS	Leucócito granular positivo

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estrutura molecular básica dos glicocorticóides.....	14
Figura 2 Estrutura molecular da dexametasona.....	15
Figura 3 Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR).....	24
Figura 4 Banho com solução anestésica. A: Animais pré-anestesiados em solução aquosa de benzocaína (1:20.000); B: Animais anestesiados individualmente em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para o implante da lamínula.....	26
Figura 5 Administração dos fármacos (região latero-dorsal direita).....	28
Figura 6 Procedimento cirúrgico do implante da lamínula no tecido subcutâneo de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) A: Incisão dorso lateral esquerda para implante da lamínula; B: Divulsão do tecido subcutâneo; C: Implante da lamínula de vidroAdministração dos fármacos (região latero-dorsal direita)	29
Figura 7 Punção venosa caudal.....	31

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1	Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos experimentais.....	25
Tabela 2	Valores médios transformados em $\log(x+1)^1$, desvio padrão análise de variância ² das contagens de células presentes nas lamínulas dois, sete e quinze dias após o implante no tecido subcutâneo de pacus, submetidos aos diferentes tratamentos ³	33
Tabela 3	Valores médios ¹ e desvio padrão ² da contagem total de eritrócitos (Erit), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina (Hg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) do sangue de pacus submetidos aos diferentes tratamentos ³	35
Tabela 4	Valores médios ¹ e desvio padrão ² da contagem de leucócitos, trombócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos e LGPAS do sangue de pacus, submetidos aos diferentes tratamentos ³	37
Tabela 5	Valores médios ¹ e desvio padrão ² da contagem de neutrófilos, monócitos, linfócitos e CGE do sangue expressa em valores relativos de pacus submetidos aos diferentes tratamentos ³	38

LEVAMISOL E DEXAMETASONA NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA POR CORPO ESTRANHO EM PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

RESUMO - Este ensaio teve por objetivos avaliar o efeito da administração parenteral de dexametasona e fosfato de levamisol sobre a cinética de acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em lamínulas de vidro, implantadas no tecido subcutâneo de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), na tentativa de simular um estímulo estressante com imunossupressão e a possibilidade de compensá-la usando um imuoestimulante. Foram utilizados 147 peixes juvenis, distribuídos aleatoriamente em vinte e uma caixas de água plásticas de 250 L, contendo sete animais cada, constituindo os tratamentos: NV = não tratado; CL = controle; L 25 = levamisol (25 mg/kg), L 50 = levamisol (50 mg/kg), D2 = dexametasona (2 mg/kg), D2+L25 = dexametasona (2 mg/kg + levamisol 25 mg/kg), D2+L50 = dexametasona (2 mg/kg + levamisol 50 mg/kg). Os pacus foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (1:10000 v/v) e submetidos ao implante de lamínulas de vidro esterilizadas no tecido subcutâneo, quando administrou-se, por via intra-muscular, os fármacos de acordo com cada tratamento. Decorridos dois, sete e 15 dias pós-implante (DPI) os peixes foram novamente anestesiados para coleta de sangue e eutanasiados (solução alcoólica de benzocaína, 1:500 v/v) para a retirada das lamínulas. O sangue destinou-se aos exames hematológicos e as lamínulas à avaliação da cinética do acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos. Os resultados foram analisados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade e demonstraram que ao longo do período experimental observou-se redução do número de eritrócitos e taxa de hemoglobina associadas ao aumento do volume corpuscular médio, quadro que sugere ligeira anemia macrocítica. Na avaliação da cinética de acúmulo celular sobre a lamínula, as maiores contagens de macrófagos isolados ocorreram sete dias após o implante em todos os grupos, associadas à maior formação de células poliariontes independentemente do número de núcleos. A dexametasona (2,0 mg/kg) inibiu o acúmulo de macrófagos na lamínula sete dias após o implante. Quando as drogas foram associadas este efeito desapareceu. O fosfato de levamisol na concentração de 25 mg/Kg, administrado por via intramuscular, demonstrou ação sobre o perfil hematológico

no 15º dia. A associação dos fármacos não interferiu significativamente na série eritrocitária e leucocitária de qualquer dos tratamentos e tempos estudados.

Palavras-chave: glicocorticóide, granulomatosa, hematologia, imunoestimulante, inflamação

**LEVAMISOL AND DEXAMETHASONE IN CHRONIC INFLAMMATION BY
FOREIN BODY IN PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

SUMMARY - The aim of this study was to investigate the effect of parenteral administration of dexamethasone and levamisole phosphate on the kinetics of accumulation of macrophages and formation of giant cells in glass cover slips implanted in subcutaneous tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) to simulate a stressful stimulus with immunosuppression and the possibility to compensate for it using an immunostimulant. We used 147 juvenile fish, randomly divided in twenty-one plastic water tanks of 250 L, containing seven animals each: NV = not treated, and CL = control, L25 = levamisole (25 mg / kg), L 50 = levamisole (50 mg / kg), D2 = dexamethasone (2 mg / kg), D2 + L25 = dexamethasone (2 mg / kg + levamisole 25 mg / kg), D2 + L50 = dexamethasone (2 mg / kg + levamisole 50 mg / kg). Fish were anesthetized with an alcoholic solution of benzocaine (1:10,000 v / v), implanted with sterile glass cover slips at subcutaneous tissue and were administered intra-muscular drugs, according of each treatment. After two, seven and 15 days post-implantation (DPI) fish were anesthetized for blood collection and euthanized (alcoholic solution of benzocaine, 1:500 v / v) to remove the glass cover slips. The blood was used for hematological tests and the glass cover slips to assess the kinetics of accumulation of macrophages and formation of giant cells. Statistical analyses were performed using 5% Tukey test and was observed reduction in the number of erythrocytes and hemoglobin associated with increase of mean corpuscular volume, suggesting slight macrocytic anemia. Kinetic evaluation of cell accumulation on glass cover slip, the highest number of isolated macrophages occurred at seven days after implantation in all groups, associated with increased formation of polycariontes cells regardless of the number of cores. The dexamethasone (2.0 mg / kg) inhibited the accumulation of macrophages in the glass cover slip seven days after implantation. When the drugs were associated, this effect disappeared. The levamisole phosphate at concentration of 25 mg / kg, administered intramuscularly, has been shown acting on the hematological profile at 15th day. The combination of drugs did not interfere significantly in erythrocyte and leukocyte number in any of the treatments.

Keywords: glucocorticoid, granulomatous, hematology, immunostimulant, inflammation

I. INTRODUÇÃO

A aquicultura, como atividade econômica, apresenta notável crescimento nos últimos anos, tanto no Brasil como no mundo (SCORVO-FILHO, 2004). Como em todo sistema intensivo de produção, a piscicultura não está livre de obstáculos que limitam sua produtividade. Os peixes são criados em altas densidades de estocagem, alimentados com ração de qualidade questionável e manejo muitas vezes inadequado, criando uma porta de entrada para epidemias e subsequentes perdas econômicas (MARTINS, 1998).

Nas últimas décadas, intensificou-se o estudo de substâncias que, favorecem de alguma forma a resposta dos mecanismos de defesa (MORAES & MORAES, 2009). Dentre estas, se destacam o fosfato de levamisol, a vitamina C e a vitamina E (SAKAI, 1999). Genericamente denominados de imunoestimulantes, estas substâncias apontam perspectivas promissoras para o manejo sanitário, pois além de atuar como coadjuvantes na quimioterapia podem ser usadas na profilaxia.

O levamisol é um *levo* - isômero do tetramisol. O composto foi utilizado pela primeira vez em 1966, como anti-helmíntico de amplo espectro, e é utilizado com segurança na medicina e medicina veterinária (FINDLAY & MUNDAY, 2000a).

Entretanto, desde a década de 70 se discute a atividade imunoestimulante deste fármaco, associando-o a dietas, banhos ou vacinas como adjuvante. Os resultados sugerem elevação do número de neutrófilos, aumento da atividade fagocítica (SIWICKI, 1987), aumento da atividade e capacidade de fagócitos (FINDLAY & MUNDAY, 2000b), diminuição das lesões causadas por AGD "Amoebic Gill Disease" (FINDLAY & MUNDAY, 2000a) e aumento de peso e crescimento (LI *et al.*, 2004).

A inflamação divide-se em aguda e crônica, onde a inflamação crônica se caracteriza por maior duração (dias, meses ou anos) e predomínio de células mononucleares e proliferação de tecido conjuntivo e vasos (KUMAR *et al.*, 2004). Os granulomas classificam-se em: "granulomas por corpo estranho" e "granulomas imunes ou epitelióides" (TIZARD *et al.*, 2002).

Dentre os diversos protocolos experimentais empregados para elucidação da fisiopatologia da inflamação, inclui-se o implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de peixes que induz a resposta inflamatória crônica tipo corpo estranho, apresentando acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos (PETRIC *et al.*, 2003a, b; BELO *et al.* 2005; BELO *et al.*, 2007). Estes formam-se pela fusão das membranas de macrófagos e são dependentes do recrutamento de monócitos do sangue e da taxa de renovação do granuloma (RYAN & SPECTOR, 1970). No entanto, de acordo com Belo *et al.* (2005; 2007) elevados níveis de cortisol circulantes suprimem significativamente a migração de macrófagos em pacus e tilápias, respectivamente.

Decorrente de sua função e da sua posição filogenética, a utilização de peixes, como modelo experimental, traz contribuições relevantes para a área da patologia comparada. Além disso, o conhecimento dos principais fatores, que direta ou indiretamente afetam a homeostase, ligados ao manejo é fundamental para a exploração econômica de qualquer espécie de peixe (CLAUDIANO, 2011).

II - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFLAMAÇÃO

2.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Inflamação (derivada de *inflammátio* que em latim significa incêndio) é a resposta dos tecidos à agressão química, física ou biológica. Assim, o organismo quando atingido por um estímulo lesivo desencadeia alterações da microcirculação na área afetada e em tecidos adjacentes de forma a diluir, destruir ou circunscrever o agente lesivo (GARCIA-LEME, 1989; KUMAR *et al.* 2004).

A inflamação e a cicatrização são fenômenos complexos em função dos diferentes mecanismos de ação de substâncias farmacologicamente ativas liberadas, sintetizadas ou neoformadas no processo, bem como pelos vários moduladores e pela dinâmica da participação de estruturas vasculares, celulares e teciduais (MORAES & MORAES, 2009). Como resposta protetora do organismo o seu ponto de início determina, em última instância, os limites entre a total resistência à infecção ou a instalação da injúria (PRADHAN *et al.*, 2008). Esta apesar de estereotipada é altamente complexa em função de seus mecanismos de controle que envolve substâncias farmacologicamente ativas, como eicosanóides derivados do ácido araquidônico, citocinas autacóides, com efeito, autócrino, parácrino e endócrino, além de hormônios importantes como a insulina e os corticosteróides endógenos (GARCIA-LEME, 1989).

Cornelius Celsus, no início da era Cristã, enunciou os quatros sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dolor (dor) e, posteriormente, Rodolf Virchow acrescentou a estes um quinto, o *functio laesa*, que indica perda de função da área afetada pela injúria, adicionado no final do século XIX (RYAN & MAJNO, 1977; TAUBER & CHERNYAK 1991).

Sendo assim, a inflamação é definida como uma reação às agressões por agentes biológicos, físicos e químicos (KUMAR *et al.*, 2004). Uma das suas principais características é a mobilização adequada e em tempo hábil, de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado onde se acumulam (GARCIA-LEME, 1989).

A teoria da fagocitose elaborada por Metchnikoff, em 1883, trouxe o conceito de que a fagocitose seria principal elemento da inflamação para eliminação do agente agressor. Este fenômeno seria, então, uma reação do organismo contra os agentes nocivos, observado tanto em vertebrados como em invertebrados. Por desempenhar papel relevante na sobrevivência dos indivíduos frente à agressão, a inflamação pode ser observada em todos os seres vivos, desde os mais primitivos, tornando-se, no entanto, mais complexa à medida que se evolui na escala filogenética. Entretanto, a ação isolada do fenômeno inflamatório não se revela eficiente durante a agressão específica. Neste caso, a ação da resposta imune específica reforça e amplia ao máximo a sua eficácia (PERSON, 1992).

A imunidade inata ou não específica é a inflamação dirigida contra agentes antigênicos. A imunidade específica é representada por reações mediadas pela produção de imunoglobulinas (Ig), sendo a molécula tetramérica similar à IgM de mamíferos e necessita de sensibilização prévia (SCAPIGLIATI; ROMANO; ABELLI, 1999). As células que participam da reação inflamatória foram classificadas por Spector (1980), da seguinte forma: células endoteliais, células próprias do tecido (mastócitos, fibroblastos e macrófagos fixos) e células migratórias (leucócitos sanguíneos).

Nos peixes, alguns relatos demonstram a existência de mais três imunoglobulinas, sendo elas, a IgD (HIRONO *et al.*, 2003), IgZ (DANILOVA *et al.*, 2005) e a IgT (HANSEN; LANDIS; PHILLIPS, 2005). A IgM existe sob duas formas alternadas, uma como receptor de membrana para antígenos de superfície de células B e outra como proteína solúvel, secretada como componente de fluídos corporais (LITMAN; ANDERSON; RAST, 1999).

O primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes foi a fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais (METCHNIKOFF, 1893). Posteriormente, alguns autores (SUZUKI, 1986; JENKINS & KLESIUS, 1998; MATUSHIMA & MARIANO, 1996) tentaram caracterizar as células presentes na inflamação induzida por vários tipos de flogógenos em diversas espécies de peixes, tempos de observação e modelos experimentais. Matushima & Mariano (1996) verificaram que a injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias *Oreochromis niloticus* induz reação inflamatória caracterizada por congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando-se o mesmo modelo experimental em *Piaractus mesopotamicus* em que se colheu 53,7% a 83,6% de trombócitos seis horas depois da injeção de carragenina (MARTINS, 2000; MARTINS *et al.*, 2006). Nesse caso, o macrófago foi o segundo tipo celular predominante no foco inflamatório.

Os monócitos circulantes são recrutados para a área de inflamação, aderem ao endotélio vascular e emigram para o tecido, transformando-se em macrófagos teciduais, que serão ativados. Tal ativação pode ocorrer por via não imunitária através de

endotoxina, fibronectina e mediadores químicos ou através da via imunitária, com a presença de células T ativadas, que produzem citocinas, sendo a principal delas o interferon gama (IFN- γ). A ativação macrocitária causa lesão tecidual, devido à produção de metabólitos tóxicos de oxigênio, proteases, fatores quimiotáticos dos neutrófilos, fatores de coagulação, metabólitos do ácido araquidônico e óxido nítrico. A fibrose depende da produção de fatores de crescimento (PDGF, TGF, TGF- α), citocinas fibrinogênicas, fatores de angiogênese (FGF) e collagenases de remodelamento por macrófagos. (GUYTON, 1976).

O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é um dos principais eventos do processo inflamatório. A mobilização adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado é uma das etapas fundamentais da reação e se traduz na primeira ação de defesa do organismo e na principal característica do fenômeno (MORAES & MORAES, 2009).

Os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares recrutados pelos sítios de lesão celular desempenham papel fundamental no processo inflamatório mediante a liberação de substâncias solúveis de regulação da fase aguda denominados de citocinas, destacando-se inicialmente a liberação de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator α de necrose tumoral (TNF- α) (CARVALHO; LEMONIA, 1998).

Uma série de substâncias endógenas, também denominadas de mediadores, são produzidas por leucócitos, células endoteliais e plaquetas, por mastócitos e por células do sistema nervoso periférico. Entre tais substâncias podemos incluir principalmente a bradicinina, serotonina, produtos da cascata do ácido araquidônico, adenosina, histamina, neuropeptídeos como a substância P e citocinas liberadas pelas células imunes, destacando-se como mais importantes a interleucina-1b (IL-1b), (TNF- α) e fator de crescimento neuronal (NGF) (CARVALHO; LEMONIA, 1998).

A fase aguda da inflamação é caracterizada por vasodilatação arteriolar, capilar e vênular, aumento de permeabilidade vascular acompanhada de formação de edema; aumento da viscosidade sanguínea e marginação leucocitária; diapedese, quimiotaxia; acúmulo de leucócitos, particularmente neutrófilos, no foco lesado e fagocitose por

células competentes. Nessa fase, o fenômeno é de caráter exsudativo (MORAES & MORAES, 2009).

A quimiotaxia de leucócitos envolve um rígido mecanismo de regulação de adesão destas células ao endotélio e subsequente migração trans-endotelial. Esta interação adesiva com o endotélio constitui um processo dinâmico envolvendo a ativação tanto do endotélio quanto dos leucócitos, resultando na liberação de um grande número de moléculas de adesão, incluindo as selectinas e integrinas, fatores quimiotáticos conhecidos como quimiocinas, óxido nítrico e receptores de adesão (CARVALHO; LEMONIA, 1998).

2.1.2 INFLAMAÇÃO CRÔNICA EM PEIXES TELEÓSTEOS

Quando acontece a fase aguda da inflamação e o agente agressor persiste nos tecidos, a reação se cronifica e passa a apresentar caráter proliferativo, com acúmulo de leucócitos mononucleares, tais como macrófagos e seus derivados epitelióides e polícariontes, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, fibras colágenas, além de angiogênese e, na dependência do agente causal, polimorfonucleares como os eosinófilos (GARCIA-LEME, 1989; HARKNESS, 1981).

Pode ser a continuação de uma reação aguda, mas, muitas vezes, acontece de maneira insidiosa, como uma reação pouco intensa e, frequentemente, assintomática. Os macrófagos ativados secretam vários mediadores da inflamação, os quais, se não controlados, podem levar à destruição tecidual e fibrose características desse tipo de inflamação (GUYTON, 1976).

Este quadro pode sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal e do nível de especificidade da resposta. Todavia, é estereotipado e altamente complexo em função dos seus mecanismos de regulação envolvendo mediadores químicos autócrinos e moduladores diversos de ação autócrina, parácrina e endócrina (GARCIA-LEME, 1989).

A inflamação crônica é caracterizada por inflamação ativa com infiltração de células mononucleares, destruição tecidual e tentativa de reparação dos danos. Outra característica é a formação de granulomas, que pode ser composto de várias células, como macrófagos, células epitelióides, macrófagos poliariontes, linfócitos, fibroblastos e granulócitos (GAUTHIER, 2004). Os granulomas classificam-se em granulomas por corpo estranho e granulomas imunes ou epitelióides (TIZARD *et al.*, 2002).

As células envolvidas na resposta inflamatória crônica de teleósteos possuem morfologia semelhante às células epitelióides de mamíferos, envolvendo alta atividade metabólica, fagossomos, interdigitações entre células adjacentes e formação de granulomas epitelióides (NOGA; DYKSTRA; WRIGTH, 1989).

A presença de macrófagos no tecido cronicamente inflamado é garantida pelo recrutamento de monócitos no sangue, proliferação local de macrófagos e imobilização local dos macrófagos, sendo o primeiro mecanismo o mais importante (ROBINS & COTRAN, 2004).

A inflamação granulomatosa constitui o substrato morfológico de várias doenças infecciosas, e, em peixes, é descrita na infecção por flavobactérias (KLLUGE, 1965), na tuberculose em *Pleuronectes platessa* (TIMUR *et al.*, 1997a); na infecção por *Edwardisiella tarda* (MIYAZAKI & KAIGE, 1985); no parasitismo por *Pseudoterranova decipiens* em trutas *Oncorhynchus mykiss* e *Gadus morhua* (RAMAKRSHNA & BURT, 1991); por *Mycrosporidium* sp na musculatura esquelética de *Trisopterus esmarkii* (PUSLFORD & MATHEUS, 1991); e pela inoculação de BCG em *Oreochromis niloticus* (MATUSHIMA, 1994).

A característica morfológica básica da inflamação granulomatosa é a ocorrência de células epitelióides e a disposição concêntrica da lesão total. De acordo com os agentes que os induzem, os granulomas podem ser divididos em duas grandes categorias: o primeiro tipo é causado por substâncias destituídas de atividade antigênica e incapazes de suscitar resposta imune. São designados como granulomas tipo corpo estranho, suas propriedades químicas são capazes de gerar uma reação que pouco difere na evolução, dinâmica, duração, severidade e involução daqueles provocados por agentes infecciosos. O espectro da resposta varia entre quiescente e

discreto, como os induzidos por bentonita e carragenina, ou vigoroso a severo, como os provocados por sílica ou parede celular de estreptococos. A segunda categoria de granulomas são aqueles formados por agentes dotados de propriedades antigênicas específicas. Entre eles incluem-se bactérias, fungos, vírus, protozoários e alguns metais como o zircônio e o berílio. Todos esses agentes, apesar da sua diversidade, tem uma propriedade em comum que é o fato de serem de difícil degradação (MARIANO, 1995).

Substâncias inertes também induzem o desenvolvimento de inflamação crônica, não imune, como na injeção de sílica no tecido muscular de *Gadus morthua* e *Carassios. auratus* que provoca lesão proliferativa, constituída por macrófagos, linfócitos e marcada fibroplasia (JANSSON & WAALER, 1967), pela injeção de carragenina em *P. platessa* (TIMUR *et al.*, 1997), pelo implante de tecido ósseo de desmineralizado de *Anguilla anguilla* em tecido muscular de *Scyliorhinus canicula* (PEINGNOU-DEVILLE *et al.*, 1989); pelo implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* (PETRIC *et al.*, 2003a, b).

O implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) induz adesão e acúmulo de macrófagos formando os gigantócitos policariontes. Seu número aumenta progressivamente, assim como o número de núcleos por célula. Inicialmente, formam-se os gigantócitos tipo corpo estranho que evoluem mais tardiamente para o tipo Langhans, com núcleos periféricos. Esses predominam na lamínula após 14 dias e a seguir ocorre à formação de cápsula conectiva (PETRIC *et al.*, 2003a, b, BELO *et al.*, 2005).

Petric *et al.* (2003a) implantaram lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* para estudar a cinética do desenvolvimento de granuloma do tipo corpo estranho. Depois de três dias de implante observaram-se muitos macrófagos aderidos à lamínula e raros gigantócitos binucleados. Depois de sete dias, havia maior número de macrófagos isolados e era perceptível sua maior organização e havia predomínio de células gigantes do tipo corpo estranho.

Nesse tempo, além dos gigantócitos do tipo corpo estranho, estavam presentes outras células cujos núcleos estavam dispostos na periferia do citoplasma conferindo aspecto de “coroa”. Essas células foram classificadas como do tipo Langhans. Nas

observações realizadas após 14 dias, o número de gigantócitos do tipo Langhans era maior que os do tipo corpo estranho e a quantidade de macrófagos isolados havia se estabilizado.

Aos 30 dias após o implante, não era possível individualizar as células gigante, graças à intensa proliferação fibroblástica formando uma cápsula constituída também por fibrócitos, colágeno, células mononucleares e neovasos. Aos 45 dias não mais se observou a presença de gigantócitos, mas sim de cápsula conectiva hialina, com predomínio colagenoso, redução do número de vasos neoformados e da celularidade. Esses resultados foram confirmados por Brum (2003) e Belo *et al.* (2005).

2.1.3 GIGANTÓCITOS E GRANULOMAS EM PEIXES

Em granulomas tipo corpo estranho formam-se macrófagos policariontes pela fusão da membrana celular de macrófagos (GILLMAN & WRIGHT, 1966; MARIANO & SPECTOR, 1974). Em estudo *in vitro*, MCNALLY & ANDERSON (1995) demonstraram a formação de células gigantes pela fusão de macrófagos derivados de monócitos humanos após indução com as interleucinas 3 e 4 (IL-3 e IL-4, respectivamente). Em estudo subsequente, McNally & Anderson (1996) constataram que a fusão dos macrófagos necessita de receptores de manose (MR) que são altamente estimulados pela IL-4. Recentemente, estes autores observaram a participação do retículo endoplasmático dos macrófagos durante o processo de fusão celular, após aproximação destas estruturas aos receptores de manose. Tal mecanismo de acoplamento apresenta características semelhantes às observadas no processo de fagocitose (MCNALLY & ANDERSON, 1996).

Autores avaliaram, *in vivo*, o acúmulo de macrófagos e a formação de células gigantes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de mamíferos (RYAN & SPECTOR, 1970; MARIANO & SPECTOR, 1974; BIRMAN & MARIANO, 1985). Graças ao recrutamento de novos macrófagos ao processo inflamatório inicia-se a

fusão celular e formação de células policariontes, denominadas de células gigantes tipo corpo estranho, em que os núcleos são encontrados aleatoriamente no citoplasma, evoluem para células do tipo Langhans, em que os núcleos estão dispostos na periferia da célula, conferindo a ela o aspecto de “coroa” (MARIANO & SPECTOR, 1974).

A taxa de migração de macrófagos para a lamínula de vidro implantada depende da natureza da reação inflamatória e do tecido conectivo que a envolve. Conforme demonstrado por Birman & Mariano (1985), a inoculação de BCG vivo no local do implante da lamínula, causa drástica redução na formação de células gigantes, redução do número de núcleos/célula gigante e bloqueio na transformação de célula tipo corpo estranho para célula tipo Langhans. Este fenômeno pode ser explicado pela indução do processo inflamatório provocado pelo BCG vivo ser de alta renovação. O contrário ocorre com a inoculação de carragenina, pois esta substância induz a formação de granuloma de baixa renovação.

Miyazaki & Kaige (1985) estudaram a resposta inflamatória granulomatosa em tilápias do nilo, *O. niloticus*, infectadas naturalmente por *Edwardsiella tarda*. No estudo histopatológico dos peixes foi observada multiplicação deste patógeno no interior dos macrófagos. Estes autores relataram a diminuição significativa no número de bactérias presentes nos granulomas com a evolução do processo inflamatório. A formação de células gigantes tipo corpo estranho e de Langhans foi observada em nódulos presentes no tecido conjuntivo de *Pleuronectes platessa*, ocorrendo em áreas adjacentes ao parasitismo por *Ichthyophonus hoferi* e *Jarrela glandicephalus*, respectivamente (TIMUR & TIMUR, 1984; EIRAS & REGO, 1989).

Matushima (1994) avaliando o processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação intramuscular de BCG em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) detectou a presença de raras células gigantes tipo corpo estranho três dias após a inoculação do BCG, que apareceram com maior frequência aos sete dias. Após 21 dias, estas já possuíam maior organização e, aos 33 dias células gigantes do tipo corpo estranho já podiam ser encontradas englobando grumos de BCG. Estas células também podiam ser encontradas em locais mais distantes formando “ninhos” de células inflamatórias junto com linfócitos, fibroblastos e macrófagos.

Em pacus jovens, *P. mesopotamicus*, ocorre o início da formação de células policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo, após três dias do estímulo exercido pelo corpo estranho. A suplementação da dieta dos peixes com 100, 200 ou 500 mg de vitamina C/Kg de ração induz aumento no número de macrófagos policariontes e no número de núcleos dos gigantócitos formados e acelera a transformação de células do tipo corpo estranho em células de Langhans (PETRIC *et al.*, 2003 a, b). Efeito semelhante foi observado por Belo *et al.* (2005) que verificaram efeitos benéficos na suplementação dietética com vitamina E sobre a formação dos macrófagos policariontes em pacus mantidos em alta densidade de estocagem, havendo aumento significativo destes em grupos tratados com 450 mg de vitamina E/Kg de ração na dieta.

Em contrapartida, autores estudaram *in vitro* a formação de gigantócitos em culturas de macrófagos, obtidos do rim cefálico de diferentes espécies de peixe (COUSO *et al.*, 2002). Na análise comparativa entre os resultados observados no processo evolutivo de diferenciação e fusão dos macrófagos, verificou-se o início da formação de células gigantes com 24 horas em *S. aurata* (COUSO *et al.*, 2002), dois a três dias em *Cyprinus carpio* (BAYNE, 1986) e depois de uma semana em *O. mykiss* (SECOMBES, 1985).

2.2 EFEITOS DOS CORTICOSTERÓIDES EM PEIXES TELEÓSTEOS

O envolvimento do hipotálamo e da glândula pituitária no controle da secreção de corticosteróides em teleósteos foi descrita por Sumpter *et al.* (1994). Os principais moduladores químicos envolvidos neste processo são o hormônio liberador da corticotropina (CRH) e o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). A produção de corticosteróides é localizada nas células interrenais presentes no rim cefálico, sendo o cortisol o principal corticosteróide produzido por peixes teleósteos (WENDELAAR BONGA, 1997).

O cortisol apresenta amplo espectro de atividade em peixes teleósteos, combinando funções mineralocorticóides, comparáveis à apresentada pela aldosterona em vertebrados terrestres, e glicocorticóide. Portanto, este corticosteróide participa na regulação do equilíbrio hidromineral, no metabolismo energético, além de suprimir o sistema imunológico e a capacidade reprodutiva dos animais (WENDELAAR BONGA, 1997). Tal fato ressalta a importância do estudo e caracterização das alterações fisiológicas relacionadas ao aumento da secreção de cortisol, como ocorre no estresse e das consequências da liberação deste esteróide sobre respostas orgânicas.

As respostas fisiológicas induzidas pelo estresse apresentam efeitos severos sobre os mecanismos de defesa dos peixes, causando imunossupressão com diminuição da resistência orgânica e predispondo-os ao ataque de agentes patogênicos (BARTON & IWAMA, 1991).

Em geral os teleósteos submetidos ao estresse agudo ou crônico apresentam rápido aumento dos níveis sanguíneos, seguida de redução no número de linfócitos circulantes. A diminuição sanguínea de linfócitos e monócitos pode ser resultante do extravasamento destas células para os tecidos, afetando as funções dos linfócitos B e T circulantes. Tal fato está frequentemente associada com a diminuição da resistência a patógenos oportunistas (WENDELAAR BONGA, 1997).

Elevadas concentrações de cortisol plasmático estão à susceptibilidade aos organismos patogênicos, resultante da redução dos níveis circulantes de linfócitos e da produção de anticorpos, além da diminuição da atividade fagocítica de leucócitos (MONTERO *et al.* 1999). Após a administração exógena de cortisol, ocorre aumento dos níveis circulantes de neutrófilos, no entanto, verifica-se inibição da migração destas células para as lesões inflamatórias (BARTON & IWAMA, 1991). A migração, atividade fagocítica e capacidade respiratória de macrófagos foram diminuídas em peixes com elevados níveis de cortisol circulante (MONTERO *et al.*, 1999; ORTUNÕ *et al.*, 2001). BELO (2005; 2007) verificaram efeito depressor da atividade corticosteróide sobre o recrutamento e acúmulo de macrófagos e na formação de gigantócitos em resposta inflamatória induzida por corpo estranho em pacus e tilápias, respectivamente. Os mecanismos de supressão imunológica induzidos pelo cortisol em peixes não estão

completamente esclarecidos, mas evidências sugerem que o cortisol pode atuar inibindo a liberação de citocinas que são necessárias para a diferenciação de linfócitos e seus precursores (KAATARI & TRIPP, 1987).

2.2.1 ANTIINFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIIS

Os corticosteróides são hormônios secretados pela região cortical das glândulas supra-renais. Os glicocorticóides (GC), que são os esteróides-alvos desta revisão, são produzidos pela zona fasciculada, estão envolvidos em diversas funções fisiológicas e também na adaptação a situações de estresse. São drogas amplamente usadas em decorrência de seus efeitos imunossupressivos e antiinflamatórios no tratamento de muitas doenças reumáticas, além de outras doenças inflamatórias (ANTI *et al.*, 2008). O hipotálamo sintetiza o CRH (hormônio liberador de corticotrofina), que estimula a hipófise a secretar ACTH. Este hormônio, por conseguinte, induz a zona fasciculada do córtex adrenal a sintetizar cortisona (CARDOZO *et al.*, 2007).

Os GC podem ser classificados de acordo com sua meia vida, sua potência e a duração de suas ações (ANTI *et al.*, 2008), tendo a capacidade virtual de inibir todos os componentes envolvidos no processo inflamatório. Provocam neutrofilia, linfopenia, inibem a fagocitose dos macrófagos, antagonizam a ação vasodilatadora das bradicininas e prostaglandina, estabilizam as membranas, particularmente a dos lisossomos, impedindo o extravasamento de enzimas líticas no local da lesão (DAMIANI *et al.*, 1984)

A estrutura molecular básica dos glicocorticóides (GC) é o ciclopentanoperidrofenantreno, derivado do colesterol que consiste de três anéis hexano e um anel pentano (Figura1). Todos os GC, naturais e sintéticos, são variações dessa estrutura básica e precisam, para ter efeito, de um grupo 11-hidroxilo. Variantes dessa estrutura levam às diferenças na potência, meia vida, metabolismo e efeitos mineralocorticóides (CARDOZO *et al.*, 2007).

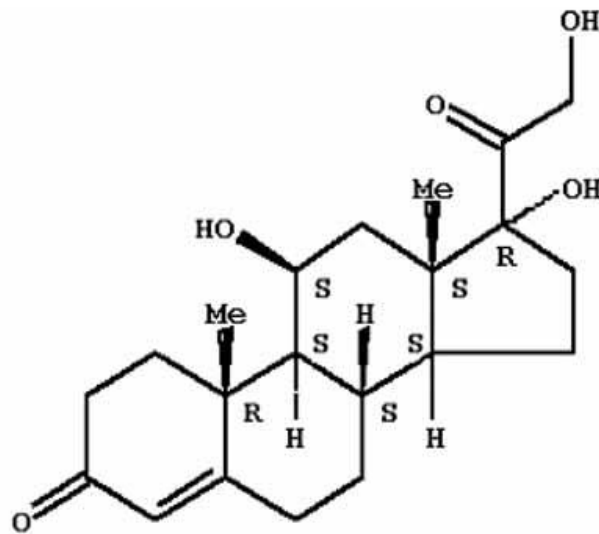


Figura 1. Estrutura Molecular do básica dos glicocorticóides (CARDOZO *et al.*, 2007).

Os glicocorticóides sintéticos são produzidos a partir do ácido cólico bovino ou de plantas das famílias *Lalaceae* e *Discoriaceae* (ACEROLD, 1976). Dentre os glicocorticóides sintéticos estão: a prednisona, a prednisolona, a triamcinolona e a dexametasona (DAMINANI, 2001)

A dexametasona (Figura 2) possui amplo espectro de ação sendo potente antiinflamatório e imunossupressor, uma vez que seu efeito leva à inibição da produção de várias citocinas. Diferente de outros análogos, este fármaco apresenta propriedades mineralocorticóides reduzidas. É cerca de vinte e cinco a trinta vezes mais potente que seu análogo natural, o cortisol. Seus efeitos são mediados em sua maioria por receptores celulares de glicocorticóides que são amplamente distribuídos (PARFITT *et al.*, 1999).

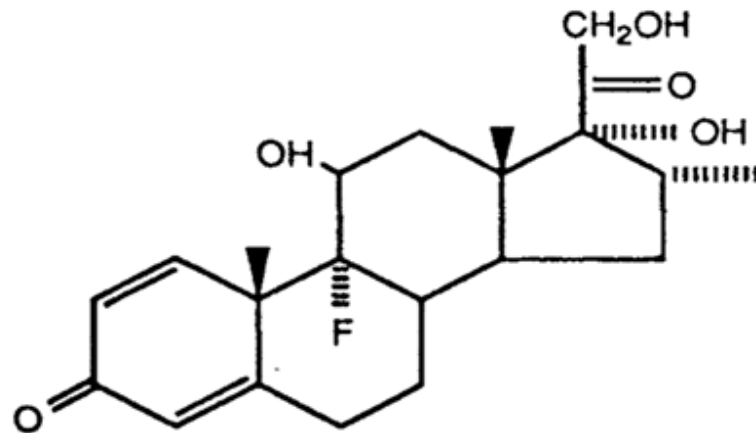


Figura 2: Estrutura molecular da dexametasona (SARLIS et al. 1999).

A dexametasona age sobre vasos sanguíneos, diversos mediadores, precursores e tipos celulares inflamatórios e tem atividade marcante sobre o sistema imunológico. Com relação a sua ação antiinflamatória e imunossupressora pode-se destacar seu profundo efeito sobre a concentração, a distribuição e a função dos leucócitos periféricos, bem como de seus efeitos supressores sobre a produção de citocinas e de outros mediadores lipídicos e glicolipídicos da inflamação. Dentre as ações desta droga pode-se destacar a diminuição do número de leucócitos na área inflamada, associada à diminuição da liberação de monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos e ao aumento da liberação de neutrófilos; à 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 sistema complemento (BOUMPAS *et al.*, 1993).

Ao entrar na corrente sanguínea, o cortisol liga-se às proteínas plasmáticas, principalmente albumina, formando complexos não covalentes, com força de ligação

fraca. Além dessa ligação fraca com albumina há proteínas que se ligam mais especificamente ao cortisol. As preparações não esterificadas têm absorção mais lenta e vida média mais prolongada, de cerca de quatro horas quando usadas por via intramuscular (DAMIANI *et al.*, 1984). O mecanismo fundamental que promove a transativação ou a transrepressão gênica inicia-se com o hormônio, que é lipofílico, cruzando a membrana citoplasmática da célula-alvo por difusão passiva.

Ao chegar às células-alvo, o cortisol atravessa a membrana citoplasmática e liga-se a receptores citosólicos. Esse processo provoca acúmulo do hormônio no interior das células-alvo, pois, enquanto em outras células entra e sai livremente. Naquelas as proteínas receptoras desviam o equilíbrio para o interior das células. O passo seguinte é a entrada desse complexo receptor-hormônio para o interior do núcleo. Uma vez que o complexo receptor-hormônio liga-se à cromatina, uma RNA polimerase liga-se a uma região específica do DNA, chamado sítio de iniciação e é sintetizado um RNA mensageiro que transporta o código responsável por uma síntese protéica em nível ribossomal. O efeito final do hormônio esteróide dependerá, então, da síntese que foi iniciada naquela célula-alvo particular. (DAMIANI *et al.*, 1984).

O metabolismo da dexametasona é principalmente hepático, com a conversão final do esteróide a um composto hidrossolúvel menos ativo, que será então eliminado na bile. Parte é reabsorvido no intestino formando um ciclo entero-hepático de esteróides (DAMIANI *et al.*, 1984).

Uma das mais importantes ações fisiológicas dos GC é a resposta a agressões às quais qualquer organismo vivo está exposto constantemente. Quando administra-se um GC exógeno com intuito de obter ação antiinflamatória e/ou imunossupressora, amplifica-se, em última análise, seus mecanismos de ação fisiológicos (ANTI *et al.*, 2008).

2.3 EFEITOS DO LEVAMISOL EM PEIXES TELEÓSTEOS

O levamisol é um anti-helmíntico utilizado no tratamento de infecções por nematódeos em animais seu efeito imunoestimulante em peixes foi descrito em diferentes concentrações e de variadas formas de administração, tais como dietas, banhos ou como coadjuvantes em vacinas (SAKAI, 1999).

A elevação do número de neutrófilos em carpas foi demonstrada por Siwicki (1987). Segundo este autor, a atividade do levamisol depende da dosagem utilizada e, neste estudo, o levamisol na concentração de 5mg/kg de peso vivo apresentou melhores resultados.

Findlay & Munday (2000) observaram aumento do índice de fagocitose em salmões do Atlântico "*Salmo salar* L." submetidos a banhos de levamisol hidrocloreídrico a 2,5 mg/l. Findlay *et al.* (2000) verificaram aumento da resposta imune inespecífica, funções fagocíticas e diminuição de lesões causadas pelo desafio com AGD "*Amoebic Gill Disease*".

Mulero *et al.*, (1998b) observaram que o uso do levamisol *in vitro* não interferiu significativamente na migração e na produção de derivados do oxigênio por fagócitos em *Sparus aurata* L., principalmente quando este composto farmacológico foi usado em concentrações maiores ou iguais a 10 ng/mL por 48 horas.

Quanto à atividade citotóxica das células fagocíticas, Cuesta *et al.* (2002) demonstraram que estas sofrem pequeno aumento quando a ação do levamisol foi *in vitro*. Por outro lado, quando este imidazotiazol foi testado *in vivo* ocorreu aumento da atividade citotóxica, principalmente com a dosagem de 300 mg/kg.

S. aurata alimentados com ração suplementada com imidazotiazol apresentaram concentrações de imunoglobulina do tipo M quatro vezes maiores quando comparados com o grupo controle, além dos títulos de anticorpos permanecerem detectáveis até oito semanas após o desafio (Cuesta *et al.*, 2004).

Entretanto, Morrison *et al.* (2001) demonstraram a ocorrência de alterações histopatológicas em *Salmo salar* L., submetidos à vacinação contra *Vibrio anguillarum*,

utilizando o levamisol como adjuvante. Observaram alterações na estrutura das guelras em animais tratados com banhos e injeção intra-peritoneal de levamisol, tais como, fusão lamelar e descamação multifocal do epitélio, edema no tecido lamelar, aumento do comprimento da lamela em peixes expostos ao levamisol, além de necrose na base da lamela em peixes que sofreram injeção intra-peritoneal com vacina contendo este imidazotiazol como adjuvante.

Por outro lado, Mulero *et al.* (1998a) verificaram que *S. aurata* L. alimentados com ração suplementada com 125, 250 e 500 mg/kg de levamisol tiveram aumento de tamanho e ganho de peso em relação ao grupo controle. Sendo que a dosagem de 125 mg/kg teve o melhor resultado.

Em concordância com este estudo, Li *et al.* (2006) observam o aumento do ganho de peso de híbridos *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, alimentados com dieta suplementada com 100, 250 e 500mg de levamisol/kg de ração quando comparados ao grupo controle não suplementado com o levamisol. Os peixes submetidos à dieta com concentração de 100 mg/kg tiveram aumento na eficiência nutricional, aproximadamente em 10% quando comparados ao grupo controle. Em contrapartida, foi constatada a supressão do crescimento e deficiência nutricional do mesmo híbrido juvenil quando alimentados com dietas contendo 1000 mg de levamisol/ kg de ração (LI *et al.* 2004).

2.4 HEMATOLOGIA EM PEIXES TELEÓSTEOS

Hematologia é o estudo do sangue ou da soma de conhecimentos sobre o sangue, e grande parte das informações consiste em medidas e valores de parâmetros em condições orgânicas normais e anormais (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA 2004), uma vez que o sangue é o fluido corporal mais conspícuo e acessível dos vertebrados (HOUSTON, 1997). A hematologia em peixes contribui para a compreensão da fisiologia comparativa, relação filogenética, condições alimentares e outros parâmetros

ecológicos (LARSSON, 1976). Os peixes são desprovidos de medula óssea e de linfonodos, assim os tecidos linfóide e mielóide estão geralmente, associados no mesmo órgão. No teleósteo o órgão responsável pela hematopoiese é a porção cefálica do rim (ROCHA; FLORES, 2001). Além da porção cefálica do rim, a hematopoiese também pode ser realizada no estroma esplênico e nos espaços periportais hepáticos, na submucosa intestinal e no timo (MATUSHIMA; MARIANO, 1996).

Várias teorias foram propostas nesses últimos anos sobre a origem e o desenvolvimento das células sanguíneas. Duthie (1939), Tavares Dias & Moraes (2004), propuseram que uma célula pluripotente, denominada grande hemoblasto linfóide, originaria os granulócitos por transformação direta, que após a divisão mitótica formaria os pequenos hemoblastos linfóides, os quais originariam os eritrócitos (hemácias ou células vermelhas), trombócitos e linfócitos (células brancas).

Os eritrócitos de peixes têm forma oval, com núcleo central acompanhando a forma da célula. São as células que contêm a hemoglobina - pigmento respiratório tendo como principal função transportar O_2 e parte do CO_2 do sangue (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas no sangue, porém em muitas espécies é comum a presença de eritrócitos imaturos no sangue periférico (RANZANI-PAIVA et al., 2004) sendo assim esses dados devem ser interpretados com cuidado, uma vez que há o equilíbrio entre os tipos de células. Trombócitos são células equivalentes a plaquetas em mamíferos, porém estruturalmente diferentes (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). Os trombócitos de peixes têm formas variadas, predominantemente elípticos, ocasionalmente arredondados, ovais ou fusiformes, de citoplasma hialino, com núcleo grande que acompanha o formato da célula. Agrupam-se frequentemente em dois ou mais (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004, TAVARES-DIAS et al, 2002).

Em peixes essas células possuem outras funções, entre elas, sugere-se que respondam a situações mórbidas, de modo semelhante à plaquetas em mamíferos (STOSKOPF, 1993), acredita-se que a funcionalidade desta célula em peixes, pode estar envolvida no processo de coagulação do sangue e também ligada a processos

inflamatórios (MARTINS *et al.*, 2003a) induzidos por diferentes flagogênos (TAVARES-DIAS, 2003).

Ranzani-Paiva & Silva-Souza (2004), salientam a facilidade de confundir trombócitos com leucócitos durante as contagens, pois, devido à sua fragilidade, os primeiros podem perder citoplasma durante o preparo das extensões ficando apenas o núcleo.

Os leucócitos são implicados nas defesas celulares e imunocelulares do organismo, sendo que seu significado fisiológico é parcialmente condicionado à capacidade de realizarem migração seletiva e diapedese (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

Linfócitos são as células mais numerosas na circulação sanguínea em diversas espécies de peixes teleósteos, neutrófilos, monócitos e basófilos são os leucócitos usualmente observados na circulação de peixes essa denominação é semelhante àquela utilizada em vertebrados terrestres (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Os monócitos são células grandes, normalmente são os maiores leucócitos do sangue periférico de peixes, a quantidade de monócitos no sangue pode variar conforme o sexo e ou o estágio de maturação gonadal, o aumento do número dessas células pode ser interpretado como uma reação do peixe frente a susceptibilidade de adquirir algumas enfermidades (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

Os neutrófilos são células arredondadas, chamadas de polimorfonucleares, devido à grande variação de formas de seu núcleo excêntrico (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

Os eosinófilos são relativamente pequenos variando de acordo com a quantidade e o tamanho de grânulos no citoplasma (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004, TAVARES-DIAS *et al.*, 2002a). Muitas vezes estão ausentes no sangue periférico dos peixes teleósteos, sendo mais abundante no tecido hematopoiético, submucosa intestinal, líquido peritoneal, mesentério e brânquias (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

Os basófilos são células menores que os neutrófilos (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004), a função dos basófilos de peixes não está definida e parece estar ligada

aos processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (ROBERTS, 1981). Até agora, esta célula não tem sido implicada em nenhum mecanismo de defesa conhecido em peixes (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

Células granulocíticas especiais (CGE) são células grandes, com contorno regular bem definido e núcleo pequeno (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004, TAVARES-DIAS *et al*, 2001). Além do tecido hematopoiético e sangue periférico, pode-se observar CGE na mucosa intestinal, em raspado peritoneal e nas brânquias dos peixes, não demonstrando propriedades de fagocitose (RIBEIRO, 1978 *apud* RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

Nos peixes teleósteos à semelhança de outros vertebrados e a análise dos padrões sanguíneos fornece subsídios para o auxílio no diagnóstico e no prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). As variáveis relativas à série vermelha dos peixes vêm sendo utilizadas no diagnóstico de processos anemiantes (MAHONEY & Mc NULTY, 1992; TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Peixes são submetidos a diversas influências ambientais que podem alterar o resultado de um hemograma. Sendo assim, vários métodos hematológicos podem ser usados como auxílio no diagnóstico de doenças. No entanto alguns fatores devem ser levados em conta como, por exemplo, a espécie do peixe, sexo, características físicas da água, dieta, idade do peixe, técnica de amostragem e contagem de células, técnicas de coloração (KLONTZ, 1994). Apesar de haver diversos trabalhos focados na hematologia de peixes pouco se conhecem sobre a fisiologia do pacu no que diz respeito às características hematológicas, mesmo sendo esta uma espécie de grande interesse para aquicultura (TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004).

III – OBJETIVO GERAL

Em resumo ao acima exposto, o presente trabalho pretende estudar a participação do fosfato de levamisol na resposta inflamatória crônica por corpo estranho, induzida pelo implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de pacu (*Piaractus mesophotamicus*), para avaliar a atividade de macrófagos, submetidos à atividade imunossupressora da dexametasona e seus efeitos sobre os parâmetros hematológicos.

Avaliar, a ação do fosfato de levamisol e a atividade imunossupressora da dexametasona na resposta inflamatória tipo corpo estranho em pacus (*Piaractus mesophotamicus*), a avaliação do acúmulo das células nas lamínulas, assim como o perfil hematológico na vigência dessas respostas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o perfil hematológico e a cinética do acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos policariontes em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo de pacus.

- Avaliar a atividade imunossupressora da administração parenteral de dexametasona sobre o acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em diferentes concentrações em pacus submetidos a inflamação crônica por corpo estranho;
- Avaliar a atividade imunoestimulante da administração parenteral do fosfato de levamisol sobre o acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em pacus submetidos a inflamação crônica por corpo estranho;

- Avaliar o efeito da administração parenteral de fosfato de levamisol e dexametasona sobre o acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos submetidos à inflamação crônica por corpo estranho;
- Avaliar o perfil hematológico em pacus submetidos à administração do sulfato de levamisol, da dexametasona e da sua associação na inflamação crônica.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na UNESP – Universidade Estadual Paulista, Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) (Figura3), Laboratório de Ictiopatologia e no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo, com aprovação pelo comitê de ética protocolo nº 023025/11.

4.1 PEIXES E ACONDICIONAMENTO

O experimento foi realizado durante os meses de outubro a novembro de 2011. Foram utilizados 147 pacus (*Piaractus mesopotamicus*), com peso médio de $200,71 \pm 26,73$ g e comprimento total médio de $18,27 \pm 1,60$ cm, oriundos da mesma desova. Os peixes foram acondicionados em 21 caixas de fibra, com capacidade de 200 L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano com vazão de 1 L/min,



Figura 3 – Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR). A: Laboratório de Ictiopatologia; B; Caixas

4.2 MANEJO DOS PEIXES

Após o transporte para os aquários, os peixes foram aclimatados durante 15 dias, para minimizar os efeitos do estresse, tempo necessário para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltem aos níveis basais (ROBERTSON *et al.*, 1988).

Durante a aclimação dos peixes e o experimento, receberam ração comercial peletizada pela manhã e a tarde (28% de proteína bruta e 4000 kcal de energia bruta kg^{-1}), correspondendo a 3% da biomassa.

4.3 MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ÁGUA

As caixas foram sifonadas semanalmente, e a qualidade da água determinada nos momentos da alimentação, sendo a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido medidos pelo aparelho YSI, modelo 55, e o potencial hidrogeniônico e a

condutividade elétrica pelo aparelho YSI, modelo 63. A média de concentração de oxigênio foi 5,03mg/L $\pm$ D.P, temperatura da água 29,47 °C $\pm$ D.P; potencial hidrogeniônico 7,66 pH e a condutividade elétrica de 117,96 $\pm$ D.P μ S/cm. Esses resultados revelaram que a água estava na faixa de conforto para a espécie dos peixes (BOYD, 1990).

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o estudo da resposta inflamatória crônica por corpo estranho, os peixes foram submetidos ao implante de lamínula de vidro no tecido subcutâneo, aplicação do fosfato de levamisol e/ou dexametasona via intramuscular (IM) de acordo com os respectivos tratamentos representados na Tabela 1. Foram avaliados sete animais por tratamento em três períodos de dois, sete e 15 dias após o implante das lamínulas de vidro e as aplicações de fosfato de levamisol e dexametasona. Os animais foram distribuídos em vinte e um aquários que constituíram as três repetições dos sete tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1- Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos experimentais.

Grupos experimentais (Número de peixes)	Dias Pós-implante		
	2(DPI)	7 (DPI)	15 (DPI)
NV = Naive	n=7	n=7	n=7
CL = Controle	n=7	n=7	n=7
L25 = Levamisol 25mg/kg	n=7	n=7	n=7
L50 = Levamisol 50mg/kg	n=7	n=7	n=7
D2 = Dexametasona 2mg/kg	n=7	n=7	n=7
D2+L25 = Levamisol 25mg/kg + dexametasona 2mg/kg	n=7	n=7	n=7
D2+L50 = Levamisol 50mg/kg + dexametasona 2mg/kg	n=7	n=7	n=7

NV: Animais não implantados com lamínulas

4.5 ANESTESIA DOS PEIXES

Inicialmente, os peixes foram pré-anestesiados (Figura 4) em solução aquosa de benzocaína (1:20.000) na própria caixa após a diminuição do nível da água e a verificação do plano anestésico, que foi atingido após permanência dos animais por dois a três minutos na mesma, verificado através da imobilidade do peixe no fundo da caixa. Em seguida os peixes foram anestesiados individualmente por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10. 000 para o implante da lamínula. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 70 % (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (WEDEMEYER, 1970; MATUSHIMA, 1988). Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados nas caixas com fluxo de água contínuo e aeração.

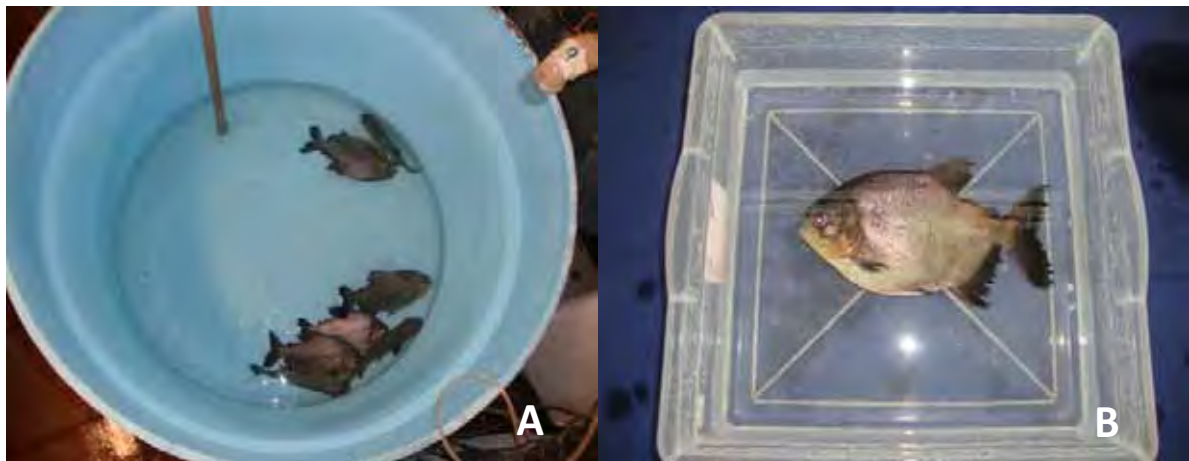


Figura 4 – Banho com solução anestésica. A: Animais pré-anestesiados em solução aquosa de benzocaína (1:20.000); B: Animais anestesiados individualmente em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para o implante da lamínula.

4.6 ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS

Previamente ao experimento foram testadas quatro doses de fosfato de levamisol (25; 50; 100 e 200 mg/kg) com base em PETRILLO *et al.* (2011) que avaliaram o perfil hematológico de pacus. Foi verificado que os que receberam 25 e 50 mg/kg apresentaram aumento das contagens de leucócitos totais, assim sendo, estas doses foram indicadas para o experimento propriamente dito.

Já a dose de dexametasona (2,0mg/kg) utilizada no presente ensaio foi previamente testada por Claudiano (2011).

Inicialmente os peixes foram pesados, as doses de cada fármaco calculadas e os peixes divididos aos acaso. Os dos tratamentos L25 e L50 receberam fosfato de levamisol, (IM), nas doses de 25 e 50 mg/kg.

Os do tratamento D2 receberam dexametasona a 0,2% (Azium, solução frasco 10ml, Intervet Schering-Plough), na dose de 2mg/kg,(IM).

Os pacus do tratamento D2+L25 receberam as doses de fosfato de levamisol 25mg/kg e 2,0 mg/kg de dexametasona, IM.

Os do tratamento D2+L50 receberam 50 mg/kg de fosfato de levamisol e dexametasona na dose de 2mg/kg, IM.

Todas as aplicações foram feitas na região dorsal-lateral direita (Figura 5), com seringa de 1 ml e agulha de 8mm.

O grupo considerado como padrão fisiológico NV (animais não implantados com lamínulas) não recebeu lamínulas e nem tratamento farmacológico, já aquele considerado com grupo controle, CL, que foram implantadas as lamínulas porem não foram administrados os fármacos.

Todos os animais receberam uma única dose tanto de fosfato de levamisol com de dexametasona, no mesmo momento do implante das lamínulas.



Figura 5 – Administração dos fármacos (região dorsolateral direita)

4.7 IMPLANTE DAS LAMÍNULAS DE VIDRO

Após anestesiados, os peixes foram submetidos ao implante da lamínula de vidro (0,9 mm de diâmetro, marca Cover Glass), no tecido subcutâneo na região latero-dorsal, atrás do opérculo esquerdo, próximo à inserção da nadadeira dorsal (PETRIC. M.C., 2000).

Com o auxílio de bisturi foram removidas as escamas na área do implante e realizada uma pequena incisão na região latero-dorsal (Figura 6A). O tecido subcutâneo foi divulsionado com tesoura cirúrgica (Figura 6B) e a lamínula esterilizada (álcool 70%), implantada entre a pele e o tecido muscular subjacente (Figura 6C). A seguir a pele foi suturada com pontos simples usando-se fio de náilon previamente esterilizado (PVPI a 10% / 1% de iodo ativo). Assim cada peixe teve a lamínula implantada atrás do opérculo esquerdo na altura do início da nadadeira dorsal. Após o manuseio cirúrgico, os animais

retornaram as caixas, aeradas com fluxo contínuo de água. O implante da lamínula foi realizado segundo as determinações de Petric *et al.* (2003a,b) e Belo (2005).

Para a prevenção de infecção por agentes oportunistas, foi feito banho de sal (10g/L), durante 15 minutos, repetindo este procedimento nos dois dias seguintes (banho de sal 1g/L).



Figura 6 – Procedimento cirúrgico do implante da lamínula no tecido subcutâneo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)
A: Incisão dorso lateral esquerda para implante da lamínula; B: Divulsão do tecido subcutâneo; C: Implante da lamínula de vidro.

4.8 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Para as avaliações hematológicas foram colhidas amostras de sangue nos tempos dois, sete e 15 dias após o implante das lamínulas. As amostras sanguíneas foram obtidas através de punção do venosa caudal (Figura 7), acondicionados em frascos de “eppendorf” com capacidade para 1,5 mL contendo 20 µL de EDTA à 10% (quantidade de anticoagulante suficiente para 1 mL de sangue).

O sangue total colhido no frasco com anticoagulante e à temperatura ambiente foi homogeneizado até garantir perfeita homogeneização da amostra. O hematócrito (Htc) foi determinado pelo método manual utilizando-se centrífuga e a proteína plasmática em refratômetro manual. Um tubo de micro-hematócrito (capilar com 75 mm) de cada amostra foi preenchido com sangue até aproximadamente $\frac{3}{4}$ de sua

capacidade. Uma de suas extremidades foi vedada com massa de modelar. O tubo foi centrifugado a 10, 000 RPM (rotações por minuto) por 5 minutos e a altura da coluna de eritrócitos foi medida como percentagem da coluna de sangue total em cartão especial para leitura de hematócrito.

Para determinação da contagem global de eritrócitos foi utilizada a câmara de Neubauer. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grunwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). Para a contagem de leucócitos e trombócitos totais foram avaliados 10 campos de cada extensão, quantificando o número de eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Os valores de leucócitos e trombócitos totais foram determinados mediante os seguintes cálculos:

$$\text{Leucócitos Totais } (\mu\text{L}) = \frac{\text{número de leucócitos X contagem de eritrócitos } (\mu\text{L})}{\text{Número de eritrócitos na extensão sanguínea}}$$

$$\text{Trombócitos Totais } (\mu\text{L}) = \frac{\text{número de trombócitos X contagem de eritrócitos } (\mu\text{L})}{\text{Número de eritrócitos na extensão sanguínea}}$$

Para a determinação do teor da concentração de hemoglobina, uma alíquota de sangue (0,5ml), foi utilizada em amostras de sangue total por reação colorimétrica de ponto final. A determinação do teor de hemoglobina foi realizado através da metodologia de cianeto de hemoglobina, com reação colorimétrica de ponto final e leitura espectrofotométrica a 540 nm. Para a obtenção da concentração em g/dL foi utilizado um Kit padrão de hemoglobina.

$$\text{Hemoglobina (g/dl)} = \frac{\text{Absorbância do teste } \times 10}{\text{Absorbância do padrão}}$$



Figura 7 – Punção venosa caudal

4.9 EUTANÁSIA, COLHEITA, FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DAS LAMÍNULAS

Dois sete e 15 dias após o implante das lamínulas, os peixes foram submetidos à eutanásia por imersão em benzocaína diluída na água (1:500). As lamínulas foram cuidadosamente retiradas, lavadas generosamente com solução salina 0,9% para retirada de fibrina e outras células aderentes à lamínula que não macrófagos e células gigantes, e em seguida colocadas em cassetes identificados. As lamínulas foram fixadas em solução de Bouin por cerca de um minuto e coradas em hematoxilina-eosina (HE).

Os macrófagos policariontes foram contados *“in totum”*, assim como, o número de núcleos por célula gigante, o número de gigantócitos do tipo corpo estranho e do tipo Langhans para estabelecer a correlação entre eles. Foi realizada contagem de cinco campos, por lamínula, totalizando 40 campos por tratamento, em aumento de 400x de microscópio óptico de luz.

V - RESULTADOS

5.1 INFLAMAÇÃO TIPO CORPO ESTRANHO

Tabela 2 apresenta os resultados do estudo da resposta inflamatória tipo corpo estranho de pacus submetidos ao implante da lamínula de vidro no tecido subcutâneo e pré-tratados com levamisol e/ou dexametasona. Na avaliação da cinética de acúmulo celular sobre a lamínula, observou-se maiores contagens sete dias após o implante em todos os grupos experimentais, associada ao aumento na formação de células policariontes. Tais resultados observados na contagem dos diferentes tipos celulares (7DPI) foram estatisticamente superiores ($P < 0,05$) quando comparados aos peixes amostrados 2 DPI.

Animais tratados com dexametasona associada ao levamisol (50mg) = (D2+L50) apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) no acúmulo de macrófagos e na formação de policariontes de até 5 núcleos dois dias após o implante da lamínula (Tabela 2). Neste período, não se observou alterações significativas ($P > 0,05$) nas respostas de acúmulo celulares de animais controles quando comparados aos demais tratamentos.

Sete dias após o implante da lamínula, verificou-se diminuição ($P < 0,05$) no acúmulo celular de policariontes maiores de 6 núcleos em pacus tratados com levamisol (25 mg/Kg) = (L25). O grupo de animais tratados com dexametasona apresentou a mesma tendência, sendo observada menor formação de gigantócitos com mais de 20 núcleos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios transformados em $\log(x+1)$ ¹, desvio padrão análise de variância ² das contagens de células presentes nas lamínulas dois, sete e quinze dias após o implante no tecido subcutâneo de pacus, submetidos aos diferentes tratamentos ³.

Tratamentos		Número de núcleos					
		1	2	3 a 5	6 a 10	11 a 20	> 20
2 (DPI)	CL	3.19 ± ABb	0.98 ± Bb	0.35 ± Bb	0.31 ± Ab	0.21 ± Ab	0.00 ± Aa
	L 25	3.04 ± Bb	0.26 ± Bb	0.00 ± Bb	0.00 ± Ab	0.00 ± Ab	0.00 ± Aa
	L 50	3.26 ± ABb	0.85 ± Bb	0.39 ± Bb	0.00 ± Ab	0.00 ± Ab	0.00 ± Ab
	D 2	3.38 ± Ac	0.96 ± Bb	0.63 ± Bb	0.16 ± Ab	0.21 ± Ab	0.00 ± Aa
	D 2 + L 25	2.93 ± Bb	1.02 ± Bb	0.00 ± Bb	0.00 ± Ab	0.00 ± Ab	0.00 ± Ab
	D 2 + L 50	3.53 ± Ab	2.00 ± Ab	1.64 ± Ab	0.85 ± Aa	0.00 ± Ab	0.00 ± Ab
7 (DPI)	CL	4.27 ± Aa	2.92 ± Aa	2.57 ± Aa	1.26 ± ABa	1.11 ± ABCa	0.58 ± ABa
	L 25	4.13 ± Aa	2.85 ± Aa	2.15 ± Aa	0.85 ± Bab	0.46 ± Cab	0.00 ± BCa
	L 50	4.30 ± Aa	2.57 ± Aa	2.47 ± Aa	1.72 ± Aa	1.24 ± ABa	0.64 ± ABab
	D 2	4.42 ± Aa	2.96 ± Aa	2.51 ± Aa	1.49 ± ABa	1.05 ± ABCa	0.00 ± Ba
	D 2 + L 25	4.25 ± Aa	2.91 ± Aa	2.72 ± Aa	1.74 ± Aa	1.49 ± Aa	0.82 ± ABab
	D 2 + L 50	4.24 ± Aa	2.91 ± Aa	2.61 ± Aa	1.56 ± ABa	0.71 ± BCab	0.46 ± Aa
15 (DPI)	CL	4.20 ± Aa	2.75 ± Aa	2.33 ± Aa	1.44 ± Aa	0.78 ± Bab	0.31 ± ABa
	L 25	4.12 ± ABa	2.82 ± Aa	2.28 ± Aa	1.51 ± Aa	1.02 ± ABa	0.25 ± ABa
	L 50	4.10 ± ABa	2.73 ± Aa	2.19 ± Aa	1.21 ± Aa	0.25 ± Bb	0.25 ± ABab
	D 2	3.88 ± Bb	2.72 ± Aa	2.33 ± Aa	1.05 ± Aa	0.50 ± Bab	0.00 ± Ba
	D 2 + L 25	4.06 ± ABa	2.65 ± Ab	2.20 ± Aa	1.67 ± Aa	1.57 ± Aa	0.46 ± ABab
	D 2 + L 50	4.06 ± ABa	2.82 ± Aab	2.55 ± Aa	1.81 ± Aa	1.16 ± ABa	0.92 ± Aa
Valor de F		16.76	11.70	19.80	5.35	3.85	1.98
Pr > F ⁴		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0206
CV (%) ⁴		7.28	28.67	28.91	63.32	92.90	196.74

¹Médias aritméticas, comparadas nas colunas com uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). ²Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado. ³ Tratamentos, controle (CL), levamisol 25mg/Kg (L 25), levamisol 50mg/Kg (L 50), dexametasona 2 mg/Kg (D 2), dexametasona 2 mg/Kg + levamisol 25 mg/Kg (D 2+L 25), dexametasona 2 mg/Kg + levamisol 50 mg/Kg (D 2+L 50). Pr>F – Probabilidade de significância de F – CV (%) – Coeficiente de variação.

5.2 ESTUDO ERITROCITÁRIO

Na fase mais aguda do processo inflamatório (2 DPI), observou-se diminuição significativa ($P<0,05$) na contagem de eritrócitos, no sangue circulante associado ao aumento ($P<0,05$) no volume corpuscular médio (VCM) de peixes controles quando comparados a animais “naive” (Tabela 3). Nesta fase da resposta inflamatória, verificou-se o efeito do tratamento com dexametasona sobre a série vermelha dos pacus, pois peixes tratados com este esteróide sem a associação com o levamisol apresentaram o mesmo perfil hematológico observado em animais naive.

No sétimo dia após a indução do processo inflamatório, animais tratados com levamisol e/ou dexametasona apresentaram significativa ($P<0,05$) diminuição na contagem global de eritrócitos e aumento ($P<0,05$) do VCM (Tabela 3). Observou-se diminuição no número de eritrócitos ($P<0,05$) entre animais controles e naives.

Constatou-se recuperação na resposta hematológica de pacus controles com 15 DPI (Tabela2), sendo observado aumento na contagem global de eritrócitos e diminuição do VCM quando comparados ao grupo de animais naive. No entanto, animais tratados com a associação de dexametasona e levamisol apresentaram baixas ($P<0,05$) contagens de eritrócitos circulantes com elevados valores de VCM quando comparados aos animais controles e naive (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios¹ e desvio padrão da contagem total de eritrócitos (Erit), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina (Hg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) do sangue de pacus submetidos aos diferentes tratamentos ³.

Tratamentos											
		Erit		Hct		VCM		Hg		CHCM	
2 (DPI)	NV	1.84 ± 0.09	Aa	42.14 ± 1.59	ABa	232.42 ± 13.03	Da	9.60 ± 0.47	Ba	22.85 ± 2.28	Ba
	CL	1.34 ± 0.03	Cb	39.21 ± 0.89	Ba	294.14 ± 11.93	ABa	9.27 ± 0.55	Ba	23.71 ± 1.45	Ba
	L 25	1.59 ± 0.13	Bb	40.28 ± 1.10	ABa	261.00 ± 15.63	ABCDa	11.33 ± 1.30	Aa	28.28 ± 2.40	Aa
	L 50	1.59 ± 0.04	Ba	40.28 ± 1.77	ABa	252.85 ± 7.02	BCDb	9.21 ± 0.53	Ba	22.71 ± 0.68	Ba
	D 2	1.87 ± 0.15	Aa	43.33 ± 1.68	Aa	239.33 ± 20.78	CDb	9.04 ± 0.26	Ba	21.00 ± 1.34	Ba
	D 2 + L 25	1.42 ± 0.09	BCa	41.71 ± 1.31	ABa	302.66 ± 23.50	Ab	9.07 ± 0.70	Ba	22.14 ± 2.04	Ba
	D 2 + L 50	1.37 ± 0.04	BCab	40.14 ± 0.98	ABa	287.83 ± 5.61	ABCab	9.50 ± 0.70	Ba	23.85 ± 2.14	Ba
7 (DPI)	NV	1.84 ± 0.09	Aa	42.14 ± 1.59	Aa	232.42 ± 13.03	Ea	9.60 ± 0.47	Aa	22.85 ± 2.28	Aa
	CL	1.55 ± 0.05	Bb	40.00 ± 1.12	Aa	258.28 ± 5.77	DEa	8.59 ± 0.38	ABa	21.57 ± 0.61	Aa
	L 25	1.38 ± 0.05	BCb	39.37 ± 1.04	ABa	288.15 ± 13.33	CDa	8.02 ± 0.33	Bb	20.37 ± 0.53	Ab
	L 50	1.12 ± 0.04	Db	42.87 ± 2.40	Aa	377.00 ± 19.75	ABa	8.89 ± 0.32	ABa	20.50 ± 0.64	Aa
	D 2	1.03 ± 0.08	Db	41.10 ± 1.03	Aab	402.25 ± 40.95	Aa	8.32 ± 0.32	ABa	19.75 ± 1.10	Aa
	D 2 + L 25	0.98 ± 0.16	Db	39.90 ± 1.61	ABa	438.50 ± 58.39	Aa	8.77 ± 0.34	ABa	22.20 ± 1.20	Aa
	D 2 + L 50	1.13 ± 0.10	CDb	37.50 ± 1.45	Ba	337.25 ± 25.45	BCa	8.67 ± 0.36	ABa	23.20 ± 0.20	Aa
15 (DPI)	NV	1.84 ± 0.09	BCa	42.14 ± 1.59	Aa	232.42 ± 13.03	BCa	9.60 ± 0.47	Aa	22.85 ± 2.28	Aa
	CL	2.17 ± 0.08	Aa	39.14 ± 1.10	ABa	179.83 ± 9.50	Db	9.21 ± 0.24	ABa	23.71 ± 1.12	Aa
	L 25	2.00 ± 0.09	ABa	42.21 ± 0.07	Aa	213.42 ± 11.76	CDb	9.25 ± 0.27	ABb	22.00 ± 0.53	Ab
	L 50	1.79 ± 0.03	BCa	39.07 ± 1.15	ABa	218.14 ± 5.50	CDb	8.06 ± 0.30	Ba	20.71 ± 0.52	Aa
	D 2	1.72 ± 0.10	CDa	38.07 ± 0.45	Bb	225.71 ± 15.01	CDb	8.39 ± 0.23	ABa	22.14 ± 0.50	Aa
	D 2 + L 25	1.41 ± 0.07	Ea	38.41 ± 0.88	Ba	277.16 ± 20.43	ABb	8.61 ± 0.27	ABa	22.50 ± 0.50	Aa
	D 2 + L 50	1.53 ± 0.11	DEa	40.78 ± 0.89	Aa	277.28 ± 24.42	Ab	9.21 ± 0.25	ABa	22.57 ± 0.64	Aa
Valor de F		11.05		1.53		10.52		1.95		1.79	
Pr >F ⁴		< .0001		0.08		< .0001		0.0146		0.0291	
CV (%) ⁴		14.40		8.07		16.36		14.70		14.83	

¹Médias aritméticas, comparadas nas colunas com uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). ² Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado.. ³ Tratamentos, controle (CL), levamisol 25mg/Kg (L 25), levamisol 50mg/Kg (L 50), dexametasona 2 mg/Kg (D 2), dexametasona 2 mg/Kg + levamisol 25 mg/Kg (D 2+L 25), dexametasona 2 mg/Kg + levamisol 50 mg/Kg (D 2+L 50). Pr>F – Probabilidade de significância de F – CV (%) – Coeficiente de variação.

Com 2 DPI, constatou-se aumento na contagem de leucócitos de pacus submetidos ao estímulo inflamatório quando comparados a animais “naive”, sendo observado maiores contagens em peixes submetidos ao tratamento parenteral com levamisol e/ou dexametasona (Tabela 4). Durante a evolução do processo inflamatório, observou-se supressão desta resposta nestes animais aos 7 DPI, sendo estes efeitos mais expressivos em animais tratados somente com dexametasona. Por outro lado, houve aumento do número de leucócitos circulantes em pacus submetidos ao implante da lamínula 15 DPI quando comparados aos animais naive, exceto para peixes tratados com Dexametasona associado à dose de 50 mg/Kg de levamisol (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios¹ e desvio padrão para contagem total de leucócitos, trombócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos e LGPAS do sangue de pacus, submetidos aos diferentes tratamentos ³.

Tratamentos		Leucócitos Totais (x10 ³)		Trombócitos (x10 ³)		Neutrófilos (x10 ³)		Monócito (x 10 ³)		Linfócitos (x10 ³)		LGPAS (x10 ³)	
2 (DPI)	NV	7.19 ± 1.83	Ba	19.23 ± 2.02	Aa	0.32 ± 0.07	Aa	0.18 ± 0.03	BCa	6.66 ± 1.77	Ca	0.06 ± 0.03	Ca
	CL	8.16 ± 1.91	Cdb	21.44 ± 5.63	Aa	0.37 ± 0.05	Aa	0.24 ± 0.07	BCb	7.95 ± 2.22	BCb	0.04 ± 0.03	Ca
	L 25	9.44 ± 2.56	BCDab	18.04 ± 3.01	Ab	0.36 ± 0.10	Aa	0.04 ± 0.03	Ca	9.50 ± 2.71	Bcab	0.38 ± 0.07	Aa
	L 50	13.98 ± 1.28	ABa	21.50 ± 3.82	Aa	0.64 ± 0.12	Ab	0.39 ± 0.11	ABa	12.74 ± 1.23	ABa	0.19 ± 0.09	Ba
	D 2	19.44 ± 2.69	Aa	21.14 ± 2.68	Aa	0.51 ± 0.20	Aa	0.64 ± 0.32	Aa	18.06 ± 2.19	Aa	0.21 ± 0.11	Ba
	D 2 + L 25	13.56 ± 3.37	BCa	18.71 ± 4.02	Aa	0.12 ± 0.07	Aa	0.14 ± 0.04	BCa	13.18 ± 3.48	ABa	0.11 ± 0.03	BCa
	D 2 + L 50	11.26 ± 1.86	BCDa	19.01 ± 2.83	Aa	0.18 ± 0.04	Aa	0.15 ± 0.06	BCa	10.85 ± 1.81	Ba	0.11 ± 0.04	BCa
7 (DPI)	NV	7.19 ± 1.83	ABa	19.23 ± 2.02	Aa	0.32 ± 0.07	Aa	0.18 ± 0.03	Ba	6.66 ± 1.77	ABa	0.06 ± 0.03	Aa
	CL	10.72 ± 2.75	Aab	14.04 ± 3.46	ABa	0.77 ± 0.20	Aa	0.52 ± 0.15	Aab	9.36 ± 2.50	Aab	0.03 ± 0.03	Aa
	L 25	5.43 ± 0.70	ABb	11.76 ± 2.31	ABb	0.24 ± 0.04	Aa	0.24 ± 0.07	ABa	4.92 ± 0.65	ABb	0.02 ± 0.01	Ab
	L 50	3.87 ± 0.97	Bb	10.79 ± 2.14	ABb	0.30 ± 0.10	Ab	0.34 ± 0.16	ABa	3.19 ± 0.77	Bb	0.02 ± 0.01	Ab
	D 2	3.77 ± 0.96	Bb	6.34 ± 1.44	Bab	0.25 ± 0.10	Aa	0.28 ± 0.04	ABa	3.19 ± 1.00	ABb	0.04 ± 0.02	Ab
	D 2 + L 25	6.73 ± 1.73	ABb	9.62 ± 2.50	Ba	0.19 ± 0.01	Aa	0.26 ± 0.04	ABa	6.27 ± 1.70	ABb	0.01 ± 0.01	Aa
	D 2 + L 50	6.49 ± 1.14	ABa	12.98 ± 1.42	ABab	0.24 ± 0.09	Aa	0.42 ± 0.11	ABa	5.74 ± 1.04	ABa	0.09 ± 0.03	Aa
15 (DPI)	NV	7.19 ± 1.83	BCa	19.23 ± 2.02	ABa	0.32 ± 0.07	Ba	0.18 ± 0.03	Ba	6.66 ± 1.77	Ba	0.06 ± 0.03	Aa
	CL	15.23 ± 2.26	Aa	14.26 ± 2.24	BCa	0.39 ± 0.09	Ba	0.58 ± 0.16	Aa	14.26 ± 2.08	Aa	0.00 ± 0.00	Aa
	L 25	13.20 ± 2.39	Aa	26.85 ± 4.01	Aa	0.47 ± 0.14	Ba	0.35 ± 0.09	ABa	12.35 ± 2.36	Aa	0.02 ± 0.01	Ab
	L 50	12.33 ± 2.04	ABa	19.82 ± 3.40	ABa	2.20 ± 1.89	Aa	0.17 ± 0.09	Ba	9.93 ± 2.64	ABa	0.02 ± 0.02	Ab
	D 2	15.88 ± 1.80	Aa	15.56 ± 2.33	BCab	0.14 ± 0.09	Ba	0.39 ± 0.19	ABa	15.30 ± 1.65	Aa	0.04 ± 0.03	Ab
	D 2 + L 25	13.74 ± 3.52	Aa	11.93 ± 2.15	BCa	0.06 ± 0.05	Ba	0.20 ± 0.10	Ba	13.45 ± 3.60	Aa	0.02 ± 0.01	Aa
	D 2 + L 50	5.57 ± 1.19	Ca	8.15 ± 1.16	Cb	0.12 ± 0.03	Ba	0.16 ± 0.05	Ba	5.24 ± 1.17	Ba	0.06 ± 0.03	Aa
Valor de F		3.71		2.74		0.86		1.81		3.46		4.20	
Pr >F ⁴		<.0001		0.0005		0.63		0.0283		<.0001		<.0001	
CV (%) ⁴		52.14		45.7		288.72		96.87		55.63		135.03	

¹ Média aritmética de 210 contagens por dia (6 x tratamentos x 7 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). ² Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados. ³ Tratamentos, naive (NV), controle (CL), levamisol 25mg/Kg (L 25), levamisol 50mg/Kg (L 50), dexametasona 2 mg/Kg (D 2), dexametasona 2 mg/Kg + levamisol 25 mg/Kg (D 2+L 25), dexametasona 2 mg/Kg + levamisol 50 mg/Kg (D 2+L 50).⁴ Pr>F – Probabilidade de significância de F – CV (%) – Coeficiente de variação.

Tabela 5. Valores médios¹ e desvio padrão análise de variância ² da contagem de diferencial de leucócitos no sangue expressa em valores relativos de pacus submetidos aos diferentes tratamentos³.

Tratamentos		Neutrófilo Rel		Monócito Rel		Linfócito Rel		CGE Rel	
2 (DPI)	NV	4.42 ± 1.21	Aa	2.71 ± 0.47	Aa	91.57 ± 2.04	Aa	1.28 ± 0.60	BCa
	CL	5.40 ± 1.50	Aa	3.20 ± 1.24	Aa	91.00 ± 2.16	Aa	0.40 ± 0.24	Ca
	L 25	3.66 ± 0.55	Aa	0.83 ± 0.47	Ab	91.16 ± 1.07	Aa	4.33 ± 0.61	Aa
	L 50	4.57 ± 0.71	Ab	3.00 ± 0.87	Ab	91.00 ± 1.36	Aa	1.42 ± 0.71	BCa
	D 2	1.83 ± 0.74	Aa	2.83 ± 0.70	Ab	94.16 ± 1.24	Aa	1.16 ± 0.47	BCa
	D 2 + L 25	2.00 ± 1.00	Aa	1.85 ± 0.63	Ab	94.42 ± 1.97	Aa	1.71 ± 0.56	Ba
	D 2 + L 50	1.28 ± 0.28	Aa	1.71 ± 0.60	Ab	96.28 ± 0.70	Aa	0.71 ± 0.28	BCa
7 (DPI)	NV	4.42 ± 1.21	Aa	2.71 ± 0.47	Ca	91.57 ± 2.04	Aa	1.28 ± 0.60	Aa
	CL	8.00 ± 1.60	Aa	5.85 ± 1.35	ABa	85.71 ± 2.10	Aa	0.42 ± 0.42	Aa
	L 25	4.57 ± 0.94	Aa	4.57 ± 1.19	BCa	90.42 ± 1.91	Aa	0.42 ± 0.20	Ab
	L 50	7.40 ± 1.86	Aab	7.80 ± 1.88	Aa	83.80 ± 2.41	Aa	1.00 ± 0.54	Aab
	D 2	9.80 ± 4.45	Aa	8.40 ± 0.87	Aa	80.60 ± 5.44	Ab	1.20 ± 0.37	Aa
	D 2 + L 25	5.20 ± 1.77	Aa	6.40 ± 2.01	ABa	87.80 ± 3.89	Aa	0.60 ± 0.40	Aab
	D 2 + L 50	3.40 ± 0.28	Aa	5.80 ± 2.17	ABa	89.20 ± 3.02	Aa	1.60 ± 0.50	Aa
15 (DPI)	NV	4.42 ± 1.21	Ba	2.71 ± 0.47	Aa	91.57 ± 2.04	ABa	1.28 ± 0.60	Aa
	CL	2.57 ± 0.36	Ba	3.28 ± 0.83	Aa	94.14 ± 0.85	Aa	0.00 ± 0.00	Ba
	L 25	4.00 ± 1.27	Ba	3.28 ± 1.19	Aab	92.42 ± 2.36	Aa	0.28 ± 0.18	ABb
	L 50	16.71 ± 3.50	Aa	1.71 ± 0.89	Ab	81.42 ± 3.65	Ba	0.14 ± 0.14	ABb
	D 2	1.00 ± 0.65	Ba	2.00 ± 0.84	Ab	96.71 ± 0.80	Aa	0.28 ± 0.18	ABa
	D 2 + L 25	0.83 ± 0.65	Ba	2.33 ± 0.98	Ab	96.50 ± 1.45	Aa	0.33 ± 0.21	ABb
	D 2 + L 50	2.57 ± 0.78	Ba	3.57 ± 0.94	Aab	93.14 ± 1.26	Aa	0.71 ± 0.35	ABa
Valor de F		1.09		3.53		1.35		4.22	
Pr >F ⁴		0.3667		< .0001		0.161		< .0001	
CV (%) ⁴		191.6		74.55		10.72		116.16	

¹ Média aritmética de 210 contagens por dia (6 x tratamentos x 7 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas com pelo menos uma letra em comum não deferente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).² Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados. ³ Tratamentos, naive (NV), controle (CL), levamisol 25mg/Kg (L 25), levamisol 50mg/Kg (L 50), dexametasona 2 mg/Kg (D 2), dexametasona 2 mg/Kg + levamisol 25 mg/Kg (D 2+L 25), dexametasona 2 mg/Kg + levamisol 50 mg/Kg (D 2+L 50). ⁴ Pr>F – Probabilidade de significância de F – CV (%) – Coeficiente de variação.

No estudo trombocitário (Tabela 4), verificou-se 7 DPI diminuição no número de trombócitos circulantes em pacus submetidos ao estímulo inflamatório, sendo este efeito mais expressivo em animais tratados somente com dexametasona. Contudo, animais tratados com dexametasona associada ao levamisol (50mg/kg) apresentaram

diminuição significativa ($P < 0,05$) do número de trombócitos comparados com animais Naive 15 DPI (Tabela 4). Na contagem diferencial de leucócitos, observou-se linfocitose absoluta (Tabela 4) e relativa (Tabela 5) 2 e 15 DPI em animais submetidos ao processo inflamatório tipo corpo estranho. Estes achados foram acompanhados por monocitose absoluta (Tabela 4) e relativa (Tabela 5) 7 DPI, sendo mais expressivos em animais controles não tratados.

Apesar das baixas contagens de CGE observadas neste estudo, verificou-se diminuição dos valores absolutos (Tabela 4) e relativos (Tabela 5) em peixes controle quando comparados a animais “naive” nos três períodos analisados. Com 2DPI, observou-se elevadas contagens absolutas destas células em peixes submetidos ao processo inflamatório por corpo estranho. Enquanto, na fase mais crônica com 15 DPI, observou-se as menores contagens relativas de LEPAS (Tabela 5).

VI - DISCUSSÃO

6.1 EFEITO DO FOSFATO DE LEVAMISOL E DEXAMETASONA SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

No estudo das variáveis hematológicas durante o decorrer do tempo, foram observadas variações significativas entre os parâmetros eritrocitários avaliados dois e sete dias após o implante (número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e volume corpuscular médio). O valor do VCM ao longo das coletas aumentou significativamente em peixes tratados ou não com fosfato de levamisol e/ou dexametasona embora o valor do hematócrito não tenha apresentado diferença significativa. Entretanto observou-se aumento no número de eritrócitos e diminuição do volume corpuscular médio em todos os grupos estudados nos diferentes tratamentos, quinze dias após o implante.

O quadro observado na série vermelha sugere ligeira anemia macrocítica, onde

predomina a redução de glóbulos vermelhos sobre a taxa de hemoglobina, em relação ao observado nos grupos CL e NV. Então, os órgãos hematopoiéticos podem ser estimulados por essa redução do número de eritrócitos e de hemoglobina e lançarem na circulação hemácias maiores que as normais a fim de carrear a mesma quantidade de hemoglobina que a observada no estado normal. Esta situação é freqüente em casos de hemólise (JANNINI; JANNINI FILHO, 1978). Como compensação o organismo usa a hemoconcentração como estratégia para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio do sangue em situações de alta demanda energética (MONTERO *et al.*, 1999; CARVALHO e FERNANDES, 2006; TRENZATO *et al.*, 2006).

A exposição crônica ao estresse resulta em elevação da concentração de cortisol, glicose e em variações hematológicas (YADA e NAKANISHI, 2002). Os agentes estressores podem comprometer a absorção do ferro, a malformação ou produzir hemólise dos eritrócitos, inibir a síntese de hemoglobina e competir pelo sitio de ligação do oxigênio, causando hemodiluição ou anemia e reduzir a capacidade de transporte de oxigênio do sangue (TRENZATO *et al.*, 2006). Esta situação foi observada nos grupos pré-tratados com dexametasona, mas não com levamisol. Todavia o mesmo quadro foi observado quando ambas as drogas foram associadas.

Já no período de 15 (DPI), observou-se aumento do numero de eritrócitos associado à diminuição do VCM, nos grupos (CL; L25; L50 e D2). Esses resultados demonstram a recuperação da resposta hematológica, sendo mais expressiva no grupo L25. A partir desses dados pode-se especular que, possivelmente, o uso de levamisol na dose de 25 mg/Kg levou à recuperação da quantidade dessas células na circulação em peixes com inflamação crônica por corpo estranho. Porém, os animais tratados com o fosfato de levamisol e dexametasona (D2+L25 e D2+L50), não apresentaram recuperação dessa resposta e mantiveram a ligeira anemia macrocítica hipercrômica observada nos tempos 2 (DPI) e 7(DPI). Provavelmente no grupo tratado com a associação de drogas não houve interferência do levamisol e foi mantido o efeito anemiante da dexametasona, embora os efeitos farmacológicos deste fármaco sejam pouco conhecidos em peixes teleósteos (SMYTH *et al.*, 2007). Diminuição e aumento nestes valores foram respectivamente observados por TAVARES DIAS *et al.* (2001) e

GOMES *et al.* (2003). Todavia ocorrem diferenças nos resultados quando a metodologia de colheita de sangue utilizada, pois o tipo de anticoagulante utilizado pode atuar como fonte de variação de resultados hematológicos. TAVARES-DIAS & SANDRIN (1998) demonstraram que o hematócrito e taxa de hemoglobina do sangue heparinizado são maiores se comparados ao encontrado no sangue colhido com EDTA, para um mesmo animal.

O número total de leucócitos e trombócitos fornecem informações sobre possíveis alterações da homeostase e de repostas às agressões (BOZZO *et al.*, 2007;; REQUE *et al.*, 2010). Apesar da importância, são poucos os estudos que analisam o leucograma e trombograma, principalmente em peixes tropicais (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; AFFONSO *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2007).

Neste estudo a quantidade de leucócitos totais de pacus variou em relação aos tratamentos e aos tempos estudados. Dois dias após o implante observou-se aumento do número de leucócitos totais em todos os grupos implantados (CL, L25, L50, D2), tratados ou não com fosfato de levamisol e/ou dexametasona, sugerindo leucocitose na fase inicial do processo inflamatório.

Dentre os componentes do sangue, os leucócitos têm importante papel na inflamação não específica e os seus valores podem ser considerados como indicadores do estado de saúde dos peixes (MISRA *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstram que a alimentação suplementada com imunoestimulantes pode elevar o número de leucócitos, conforme foi observado em matrinxã, *B. amazonicus*, alimentados com ração suplementada com altas doses de vitamina C (AFFONSO *et al.*, 2007); em pacus, *P. mesopotamicus*, alimentados com ração suplementada vitaminas C e E (SAFI *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007) e *Saccharomyces cerevisiae* (REQUE *et al.*, 2010; SALVADOR *et al.*, 2012).

O aumento no número total de leucócitos foi observado em tambacu submetido ao estresse repetitivo da captura (MARTINS *et al.*, 2002) que corresponde ao observado neste ensaio nos peixes tratados com dexametasona e com a associação das drogas no início da reação inflamatória.

Tais resultados foram acompanhados de aumento do número de trombócitos,

neutrófilo, monócito, linfócitos e LGPAS, sendo mais expressivos em animais tratados somente com dexametasona (D2).

Para Feldman (2004), o aumento no número de neutrófilos e monócitos circulantes em cães com elevados níveis de glicocorticóides sanguíneos são decorrentes da diminuição dos mecanismos de marginação leucocitária vascular, de aumento de permeabilidade vascular e diapedese, inibindo a transmigração destas células para fora dos leitos vasculares.

Segundo LATIMER ; MEYER (1992), em mamíferos, a administração exógena de corticosteróide ou ACTH, pode causar neutrofilia. Assim que a inflamação ou infecção esteja estabelecida, ocorrerá neutrofilia continuada se a velocidade de liberação dos neutrófilos pela medula óssea vier a exceder a velocidade de emigração dos neutrófilos para o tecido (LATIMER & MEYER, 1992). Os neutrófilos são completamente diferenciados e incapazes de dividir-se. São particularmente atraídos até o foco de inflamado com ou sem infecção, chegando rapidamente nessas áreas (RINGLER, 1997). Em peixes pode ocorrer fenômeno semelhante, como o ora observado, em relação ao comportamento do leucograma e trombograma.

Em situações de inflamação aguda nos peixes estimulados experimentalmente ou de forma natural, ocorrem neutrofilia e monocitose no sangue, além do acúmulo de neutrófilos e monócitos na área afetada (ROBERTS, 1989; SUZUKI; LIDA, 1992)

Deve-se destacar que, em algumas situações, ocorre o aparecimento de neutrófilos imaturos no sangue, aumentando dessa forma o número dessa célula. Este fato é possivelmente resultado do recrutamento dessas células dos compartimentos de reserva para o foco inflamado (SECOMBES; CHAPPELI 1996).

Mediadores celulares ou moleculares da inflamação produzem substâncias quimiotáticas que estimulam a liberação de neutrófilos e promovem a marginação e adesão destes ao endotélio vascular, nos locais adjacentes ao sítio da inflamação (RABER *et al*, 2003).

Os valores obtidos no presente estudo demonstram que os resultados diferem significativamente entre os grupos tratados com dexametasona associados com o levamisol (D2+L25 e D2+L50), que apresentaram diminuição no número de neutrófilos,

trombócitos, monócitos e aumento do de linfócitos.

Os linfócitos ocupam o segundo lugar em número de leucócitos no sangue de animais sadios. São singulares, porque recirculam e preservam a capacidade mitótica, permitindo o recrutamento de linfócitos pelos tecidos (LATIMER; MEYER et al., 1992).

Os linfócitos são células imunocompetentes com função de defesa (ELLIS et al., 1976; 1977; HOUSTON et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2001), sendo que estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem a presença de linfócitos T citotóxicos em peixes (NAKANISHI et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2001) e essa habilidade foi descrita em *Sparus aurata* (MESEGUER et al., 1994a, b; CUESTA et al., 1999) e *Cyprinus carpio* (MESEGUER et al., 1994a; PALIKOVÁ et al., 1998). De acordo com Jeney et al. (1997) em peixes alimentados com dietas suplementadas com 1,0% de β -glucano apresentaram linfocitose, neutropenia e monocitopenia.

Imunoestimuladores como vacinas, leveduras, lipopolissacarídeos e adjuvantes, aumentam a resposta proliferativa de linfócitos T e B e a atividade citotóxica de linfócitos T (Siwicki et al., 1998). Todavia não há observações neste sentido para o levamisol.

Sete dias após o implante, os grupos (L25; L50, D2, D2+L25 e D2+L50), apresentaram diminuição no número de leucócitos, trombócitos, neutrófilos e linfócitos.

Tais resultados podem estar de acordo com a vida média dos granulócitos na circulação que é de aproximadamente nove dias. Quando entram na corrente sanguínea têm aproximadamente seis dias de vida e permanecem na circulação de seis a vinte horas. No caso de inflamação eles deixam a corrente circulatória por diapedese e migram para o foco lesado, onde vivem por dois a três dias (DUKES, 1996).

Em mamíferos quando há súbita demanda dessas células ocorre sua mobilização da medula óssea, que pode corrigir a neutropenia em algumas horas. No caso de necessidade de longo prazo estimulam maior diferenciação de células precursoras, que levam de quatro a seis dias para maturar (KERR, 2003).

Segundo Pickering e Pottinger (1985), em peixes, a redução do número de linfócitos circulantes pode representar importante ligação entre a resposta ao estresse e o surgimento de doenças, devido a elevação do nível plasmático de cortisol.

Igualmente, Pickering (1986) relatou que a diminuição do número de linfócitos pode estar relacionada com a baixa capacidade do peixe de se defender contra agentes patógenos.

De acordo com dados encontrados na literatura, a diminuição do número de monócitos sanguíneos pode ser o resultado de combate à infecção. Os monócitos são importantes na inflamação, pois secretam diversas substâncias biologicamente ativas e são responsáveis pela remoção e processamento de antígenos, como células senescentes e debris, bactérias e toxinas do sangue (MEYER *et al*, 1995).

A diminuição do número de leucócitos pode refletir o início de um quadro de toxicidade do levamisol no processo leucopoiese. Altas dosagens podem ocasionar toxicidade, caracterizado por imunossupressão, assim como subdosagens podem não ser eficientes (LI; *et al.*, 1998). *Clarias fuscus* suplementados com 600 mg de levamisol/kg de dieta apresentaram estímulo da atividade imunológica após sete dias de tratamento, porém posteriormente esse efeito foi decrescendo chegando a mostrar efeitos imunossupressivos com oito semanas pós-tratamento (LI *et al.*, 2006).

Respostas de imunossupressão relacionadas com altas dosagens de imunoestimulantes foram igualmente observadas por outros autores. Couso *et al.* (2003) relataram em dourada menor resistência quando desafiada com *Photobacterium damsela*, com produção do reativo intermediário do oxigênio similar ao da dieta ausente de suplementação; Jeney *et al.* (1997) demonstraram que trutas arco-íris tornaram-se mais susceptíveis a infecção por *Flavobacterium columnaris*; Robertsen *et al.* (1990) demonstraram em salmão do Atlântico alta mortalidade quando injetado via intraperitoneal com elevadas concentrações de β -glucano e Whittington *et al.* (2005) relataram diminuição da resposta imune da tilápia do Nilo quando alimentada com dietas suplementadas com níveis superiores a 0,1% de β -glucano e desafiadas por *Streptococcus iniae*. Os autores supracitados inferiram que as altas dosagens de β -glucano podem determinar a exaustão das células fagocíticas com conseqüente diminuição da atividade. Castro *et al.* (2006) ressaltaram não só a exaustão do sistema imune frente a concentrações elevadas de β -glucano, mas também a potência e rapidez desta resposta.

No décimo quinto dia após o implante, os grupos (CL, L25, L50, D2 e D2+L25), apresentaram aumento do número de leucócitos totais, mantendo o mesmo perfil observado no 2(DPI).

A leucocitose pode ser devida exclusivamente ao aumento de um único tipo de célula ou a 2 ou 3 ou todos ao mesmo tempo. Consequentemente observa-se leucocitose toda vez que houver aumento do número de qualquer um dos leucócitos do sangue desde que não haja, ao mesmo tempo, diminuição do número de outro elemento que venha a compensá-lo (JANNINI; JANNINI FILHO, 1978).

Já no grupo (D2+L50), observou-se diminuição do número total de leucócitos, que demonstra mais uma vez que na associação do fosfato de levamisol com o glicocorticóide, o primeiro não interfere, mas o segundo pode induzir a redução do número das células, que resulta em imunossupressão. De acordo com Krensky *et al.*, 2001, os efeitos imunossupressores dos glicocorticóides são relativamente conhecidos, mas os mecanismos específicos de sua ação imunossupressora ainda não é claro. Os glicocorticóides destroem e induzem a redistribuição dos linfócitos, resultando na redução das contagens dessas células no sangue periférico.

Entretanto pode-se observar a ação do fosfato de levamisol no grupo (L25) apresentou aumento do número de monócitos e trombócitos. Os trombócitos são responsáveis pela homeostasia sangüínea, de modo análogo às plaquetas em mamíferos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Além da função homeostática, os trombócitos participam de processos mórbidos (STOSKOPF, 1993) e reduzem a predisposição a infecções (KOZINSKA *et al.*, 1999; TAVARES-DIAS *et al.*, 2007).

O levamisol parece restaurar a função imune deprimida dos linfócitos, monócitos e macrófagos. Siwicki (1989) observou aumento de leucócitos em carpas *Cyprinus carpio* suplementadas com 2 a 8mg de levamisol por kg de peso vivo. A injeção intraperitoneal de levamisol na dose de 5 mg/kg de peso vivo (ISPIR; DORUCU, 2005) e banho na concentração de 5/mL por 30 minutos (JENEY; ANDERSON, 1993), também levaram a maior produção de leucócitos em truta arco-íris. Entretanto Sahoo e Murkherjee (2001) não observaram aumento do número de leucócitos em *rohu* suplementados com levamisol na dieta.

A maioria dos estudos realizados está voltada à avaliação dos efeitos do levamisol sobre o sistema imune dos peixes (CUESTA *et al.*, 2002; CUESTA *et al.*, 2006), sendo escassos os relacionados com variáveis hematológicas.

Os diversos trabalhos a respeito do uso de levamisol como imunoestimulante na produção de peixes mostram diferentes resultados, muitas vezes conflitantes, com relação à dosagem capaz de trazer benefícios. Segundo Mulero *et al.*, (1998 a) essas diferenças provêm da utilização de diversos métodos de administração, idade, padrão imunológico, além da variação intra interespecífica. Da mesma forma, Sakai (1999) enfatiza a importância da dose e tempo de administração de imunoestimulantes para sua eficácia.

6.2 ESTUDO DA CINÉTICA DE MACRÓFAGOS SOBRE A REPOSTA INFLAMATÓRIA

A avaliação da resposta inflamatória crônica analisada pela cinética do acúmulo de macrófagos e da formação de macrófagos policariontes em lamínula de vidro, implantadas no tecido subcutâneo de pacus, tratados ou não com fosfato de levamisol e ou dexametasona estão expressos na Tabela1.

Apesar das baixas contagens dessas células, pode-se observar que dois dias após o implante todos os grupos (CL; L25; L50; D2; D2+L25; D2+L50) tratados ou não com fosfato de levamisol e dexametasona, apresentaram aumento progressivo da contagem dessas células com o decorrer do tempo. Então a presença de macrófagos assim como de alguns gigantócitos, com dois e três a cinco núcleos, demonstra o recrutamento de macrófagos, formação de células policariontes e de parte de seu processo de maturação, refletindo a evolução da reação e a atividade dos macrófagos.

Esses resultados são semelhantes aos encontrados por PETRIC *et al.*, (2003 a,b); BRUM (2003), BELO *et al.*, (2005; 2007) que observaram o acúmulo de macrófagos sobre a lamínula de vidro por toda sua extensão logo após o implante.

O grupo D2+L50, apresentou contagem de gigantócitos com três a cinco núcleos em número significativamente maior do que o observado nos demais grupos.

O aumento nas contagens de macrófagos e gigantócitos pode ser observado aos sete dias após o implante se comparado com o observado após dois dias. Este fato está de acordo com os achados de BELO (2007) e sugerem que o máximo da resposta dos macrófagos ocorre neste período, no modelo experimental utilizado.

Pode-se observar que a cinética do acúmulo dos macrófagos e a formação de gigantocitos nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo evoluiu progressivamente em todos os tratamentos (CL; L25; L50; D2; D2+L25 e D2+L50) e em todos os tempos estudados.

Os macrófagos formados possuem núcleos distribuídos aleatoriamente em seu citoplasma, caracterizando, a inflamação tipo corpo estranho. Gradualmente, os núcleos se organizam na periferia do citoplasma, formando as células de Langhans (Mariano e Spector, 1974).

A formação de macrófagos depende do recrutamento diário de monócitos dos compartimentos de reserva do sangue. Seguindo a diapedese e a transformação em macrófagos, estas células vão para o foco da inflamação por meio de quimiotaxia, onde a IL-4 e IL-13 induzem a fusão dos macrófagos (Brodbeck & Anderson, 2009). O interferon-gama participa da formação de células gigantes, Langhans (Anderson et al., 2008). Estes resultados mostram diferenças na evolução da resposta de macrófagos entre as diferentes espécies de peixes e modelos experimentais. Neste modelo de avaliação da inflamação crônica de corpo estranho, apresentou diferenças significativas na resposta fisiopatológica do pacu, *P. mesopotamicus* (PETRIC et al., 2003 a,b; BELO et al., 2005), onde a formação de células gigantes tipo Langhans foi observado 15 dias após a implantação da lamínula, considerando que em tilápias do Nilo essa formação foi predominante após oito dias.

Pouco se conhece sobre os efeitos dos corticosteróides exógenos em peixes teleósteos, pois os resultados obtidos nesse período não estão de acordo com os de BELO et al., (2005). Estes autores verificaram que peixes tratados com dexametasona

apresentaram menor número de gigantócitos, sendo este efeito supressor, devido à ação antiinflamatória do glicocorticóide na fase aguda do processo que inibe a formação de eicosanóides e liberação de citocinas pro - inflamatórias, com início da quimiotaxia. Este efeito pode ser observado quinze dias após o implante, em que pacus tratados com dexametasona (D2), apresentaram atividade imunossupressora, com menor formação de gigantócitos com seis a dez e onze a vinte núcleos.

Porém a associação do esteróide com o fosfato de levamisol apresentou efeitos progressivos quanto ao acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em lamínulas nesse período. Estes resultados sugerem que a associação desses fármacos não interferiu na cinética da evolução da resposta uma vez que não diferiu do observado no grupo controle.

O efeito do tratamento com dexametasona sobre a formação de policariontes foi observado 15 DPI (Tabela 2), pois, houve formação de gigantócitos com mais de 11 núcleos significativamente menor ($P < 0,05$) que o observado no grupo controle. Contrariamente a associação do esteróide com o levamisol manteve a evolução do processo como já verificado aos 7 DPI.

Durante a evolução da inflamação crônica houve formação de gigantócitos tipo corpo estranho no período avaliado, mas não de células tipo Langhans, cujos núcleos estão dispostos na periferia do citoplasma conferindo o aspecto de “coroa”.

De acordo com os resultados pode-se constatar que a evolução da adesão de macrófagos e formação de gigantócitos, foi progressiva durante o experimento. Todavia nos peixes que receberam dexametasona ocorreu inibição da reação, efeito que pode ser somado ao do estresse do ato cirúrgico. Tanto o glicocorticóide como o cortisol liberado pelo estresse podem ter inibido a liberação de IL-4 e IL-13 importantes para a fusão dos macrófagos (Brodbeck & Anderson, 2009) como o interferon-gamma que participa da formação dos gigantócitos de Langhans (Anderson et al., 2008).

BELO *et al.*, (2005) observaram efeitos benéficos na suplementação dietética com vitamina E sobre a formação dos macrófagos policariontes em pacus. Resultados semelhantes foram observados por BELO (2007) ao trabalhar com dietas suplementadas com 500 mg de vitamina E/kg de ração para a tilápia do Nilo, vacinadas

e desafiadas com *Mycobacterium marinum*. O principal benefício foi a redução das concentração plasmática de cortisol que favoreceu o acúmulo de macrófagos e a formação dos gigantócitos (Belo et al., 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo com fosfato de levamisol considerando-se o modelo experimental empregado, não demonstraram qualquer efeito benéfico para os.

VII – CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a suplementação com fosfato de levamisol na concentração de 25mg/kg, induziu aumento significativo no número de leucócitos totais, monócitos e linfócitos sanguíneos no 15º dia.

- No sétimo dia a dexametasona interferiu significativamente na série eritrocitária com diminuição transitória do número de eritrócitos, da taxa de hemoglobina e VCM, bem como no leucograma provocando diminuição transitória do número de leucócitos, linfócitos e monócitos.

- A dexametasona isoladamente inibiu a atividade dos macrófagos na reposta inflamatória crônica com diminuição do acúmulo das células e formação de gigantócitos na lamínula sete dias após o implante.

O fosfato de levamisol não interferiu na atividade dos macrófagos pois não estimulou seu acúmulo e a formação de gigantócitos.

- A associação dos fármacos pode ter inibido os efeitos da dexametasona, já que os peixes apresentaram a mesma cinética de acúmulo dos macrófagos nas lamínulas de vidro quando comparados aos demais grupos.

- Os pacus tratados com a associação das drogas apresentaram variações no perfil hematológico que foram inconclusivas..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEROLD, L. **Glucocorticoidal therapy**. *Medicini* 1976; 55: 39-65.

AFFONSO, E. G.; SILVA, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MENEZES, G. C.; CARVALHO, C. S. M.; NUNES, E. S.S.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. A. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology: part A: molecular & integrative physiology**, New York, v. 147, n. 2, p. 383–388, 2007.

ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; MARTINS-BRASIL, E.; ROUBACH, R.; URBINATH, E.C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E.G. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology: part A: molecular & integrative physiology**, New York, v. 146, n. 4, p. 576–580, Apr. 2007.

ANTI, S.M.A.; GIORGI, R.D.N.; CHAHADE, W.H. **Antiinflamatórios hormonais: glicocorticóides**, *einstein*; 6 (supli): p.159-165, 2008.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K.. Physicological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the respouse and effects of cortices feroids. **Annual Review of fish Diseases** v.1, p. 3-26. 1991.

BAYNE, C.J. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: isolation, separation and characterization. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.12, p.141-151, 1986.

BELO, M.A.A. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.146-54, 2005.

BELO, M.A.A. Estudo da resposta inflamatória granulomatosa de tilápias do nilo, *Oreochromis niloticus*, suplementadas com vitamina E e mantidas em elevado adensamento populacional. **34º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária – CONBRAVET**, Santos-SP, 2007.

BIRMAN, E.G.; MARIANO, M.; The influence of inflammatory agentes on giant cell formation. **Brazilian Journal of Biological Reaserch**, v.18, p. 507-512, 1985.

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. **Annals of Internal Medicine**, v.119, n.12, p.1198-1208. 1993.

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

BOZZO, F.R.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. *et al*. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). *J. World Aquac. Soc.*, v.38, p.302-308, 2007.

BRODBECK, W.G., ANDERSON, J.M., 2009. Giant cell formation and function. *CurrentOpinion in Hematology* 16, 53–57

BRUM, C.D. Vitamina C favorece a formação de macrófagos e policariontes em *Piaractus mesophotamicus* Holmberg, 1887 Mantidos em diferentes densidades. **Dissertação (Mestrado em Aquicultura)** – Centro de aquicultura Unesp, Jaboticabal, 58 p. 2003.

CARDOZO, P.A.L, BORTOLINI, B.F.C, STEFANI, M, CHARLÍN, R. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. **Med Cutan Iber Lat Am**, v.35 p.35-50. 2007.

CARVALHO, C.S.; FERNANDES, M.N. Effectes os temperature on copper toxicity and hematological response in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**, v. 251, p 109-117, 2006.

CARVALHO. A.W.; LÊMONIA. L.; **Revista Brasileira de Anestesiologia** v. 48, n 2, 1998.

CASTRO, R.; PIAZZON, M.C.; ZARRA, I.; LEIRO, J.; NOYA, M.; LAMAS, J. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. **Aquaculture**, v.254, p.9-20, 2006.

CLAUDIANO, G.S. Eicosanóides no aumento de permeabilidade vascular e componente celular da inflamação aguda em *Piaractus mesopotamicus*. p.26. **Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária)** – Departamento de Patologia- Laboratório de Ictiopatologia, Centro de Pesquisa Parasitológicas, Unesp, Jaboticabal, SP, 2011.

COUSO, N. et al. Formulation of short-lived multinucleated giant cells (MGCS) from cultured gilthead seabream macrophages. **The Anatomical Record**, v.267, p.204-212, 2002.

COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARINOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. **Aquaculture**, v.219, p.99-109, 2003.

CUESTA, A., ESTEBAN, M.A´., MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v. 71, p. 161–171, 1999.

CUESTA, A., MESENGUER, J; ESTEBAN, M.A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.203-210, 2004.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A. and MESENGUER, J. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.89, p. 169-174, 2002.

DAMIANI, D.; KUPERMAN H.; DICHTCHEKENIAN V.; MANNA, T.D.; SETIAN N. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo–benefício. **Review and essay revisión ensaio**. 2001.

DAMIANI, D; SETIAN, N; DICHTCHEKENIAN. Corticosteróides- **Conceitos Básicos e Aplicações Clínicas, Pediatria**, São Paulo. v.103, p 160-166, 1984.

DANILOVA, N.;BUSSMANN, J.;JEKOSCH, K.; STEINER, L.A. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification of a new isotype, immunoglobulin. **Nature Immunology**.v. 6, n. 3, p. 295-302, 2005.

DUKES, H.H. Fisiologia dos Animais Domésticos. 11. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara**, p. 19-43, 1996.

DUTHIE, E.S. The origin, development and function of the blood cells in certain teleosts. **I. Morphology. J.Anat.**, v.73, p.39, 1939.

EIRAS, J.C.; REGO, A. A.Giant cell reaction associated with *Paulicea lutkeni* (Osteichthyes, Pimelodidae) infection with *Juella glandicephalus* (Cestoda, Proteocephalidae). **Revista Iberica de Parasitologia**, v.49, n. 3, p. 217-218, 1989.

ELLIS, A.E.; MUNROE, A.L.S.; ROBERTS, R.J. Defence mechanisms in fish. **J. Fish Biol.**, London, v. 8, p. 67-78, 1976.

FELDMAN, E.C. Hiperadrenocorticism. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de medicina interna veterinária - Doenças do cão e gato. 5ªed. vol 2. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

FINDLAY, V.L. MUNDAY, B.L. The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, v.23, p.369-378, 2000a.

FINDLAY, V.L., ZILBERG, D.; MUNDAY, B.L. Evaluation of levamisole as a treatment for amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, v.23, p.193-198, 2000.

FINDLAY, V.L.; MUNDAY, B.L.. The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo solar* L. **Journal of Fish Diseases**. v. 23, p. 369-378, 2000b.

GARCIA LEME, J. **Hormones and Inflammation**, p.1-238, CRC Press, Boca Raton, 1989.

GILLMAN T.; WRIGHT L.J. Probable in vivo origin of multinucleate giant cells from circulating mononuclears. **Nature**, v. 209, p. 263-265, 1996.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; URBINATI, E.C. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **J. World Aquac. Soc.**, Stoneville, v. 34, n. 1, p. 76-84, 2003.

GUYTON AC. Tratado de fisiologia médica. 5.ed., Rio de Janeiro: **Interamericana**; 1976.

HANSEN, J.D.; LANDIS, E.D.; PHILLIPS, R.B. Discovery of a unique Ig heavy chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications or a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. Proc. **National Academy of Sciences**, v. 102, p. 6919-6924, 2005.

HARKNESS, R.A. The a characteristic cell acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte, and its biochemistry. **Molecular Aspects of Medicine**., v. 4, p.

191-207, 1981.

HIRONO, I.; NAM, B.H.; ENOMOTO, J.; UCHINO, K.; AOKI, T. Cloning and characterization of a cDNA encoding japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. **Fish shell fish Immunol.**, v. 15, p. 63-70, 2003.

HOUSTON, A.H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to simulated winter, spring and summer conditions. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.15, p. 339-347, 1996.

HOUSTON, A.H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. Studies or rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to simulated winter, spring and summer conditions. **Fish Physiology and Biochemistry.**, v. 15, p. 339-347, 1997.

ISPIR, U.; DORUCU, M. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**, Ankara, v. 29, p. 1169-1176, 2005.

JANNINI; JANNINI FILHO,. **Interpretação clínica do hemograma**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, capítulo 52; 1978. 625 p.

JANSSON Jr., C. W.; WAALER, E. Body temperature, antibody formation and inflammatory response. **Acta Pathological et Microbiologica. Scandinavica**, Carroll, v. 69, p. 577-566, 1967.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in imunoestimulantes. **Fish Shellfish Immunoligy**, Oxford, v. 3, p. 51-58, 1993.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. Prevention of

stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v.154, p.1-15, 1997.

JENKINS, J.A.; KLESIUS, P.H.; Glicitation of macrophage from the peritoneal cavity of channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v.10; p. 69-74, 1998.

KAATARI, S.L.; TRIPP, R. A. Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmonid. **J. Fish Biol.**, v. 31 (supplement A), p. 129-132, 1987.

KLLUGE, J.P. A granulomatous disease of fish produced by flavobacteria. **Veterinary Pathology**. v. 2, p. 545-552, 1965.

KLONTZ, G.W. Haematological techniques and immune response in rainbow trout. In: Mawdesley-Thomas L.E. (Ed), **Disease of Fish**, p 89-99, 1994.

KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. Relationship between the thrombocyte activity and the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different seasons. **Bulletin of Veterinary Institute of Pulaway**, Pulaway, v. 43, p. 63-69, 1999.

KRENSKY, A. M.; STROM, T. B.; BLUESTONE, J. A. The pharmacological basis of therapeutics. Drugs used for immunomodulation. In: GOODMAN & GILMAN'S, 2001 & GILMAN'S. 20.ed. New York: McGraw Hill Companies, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO. **Pathologic basis of diseases**. 7 ed. Saunders: Philadelphia; 2004. 1552 p.

LARSSON, A.; JOHANSSON, S.; FANGER, R. Comparative study of some hematological and biochemical blood parameters in fish from Shagerrak. **Jour.**, v.9, p. 425-440. 1976.

LATIMER, K.S.; MEYER. D.J. Os leucócitos na Saúde e na Moléstia. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, v. 4, p. 2616-

2664, 1992.

LI, P., WANG, X.; GATLIN III, D.M. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hibrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v.251, p.201-209, 2006.

LI, P., WANG, X.; GATLIN III, D.M. Excessive dietary levamisole supressed growth performance of hibrid stiped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, and elevated levamisole *in vitro* impairs macrophage function. **Aquaculture Research**, v.35, p.1380-1383, 2004.

LITTMAN, G.W.; ANDERSON, M.K.; RAST, J.P. Evolution of antigen binding receptors. **Annual Review of Immunology**, v.17, p. 109-147, 1999.

MAHONEY, J.B.; MCNULTY, J.K.. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hdson-Raritan estuary. **Transactions of the American Fisheries**, Grosyenar Lane, v. 121, p. 261-268. 1992.

MARIANO M.; SPECTOR W.G. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). **Journal of Pathology**, p. 113:119, 1974.

MARIANO, M.. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 161-176, 1995.

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. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 31-39, 2006.

MARTINS, M.L. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados. 2000. 125 f. **Tese (Doutorado em Aquicultura de Águas Continentais)** - Centro de Aquicultura, Unesp,

Jaboticabal, SP, 2000.

MARTINS, M.L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 655-58, 1998.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr, J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 28 (2): 195-204, 2002.

MARTINS, R.S. A economia da produção de tilápias em propriedades da região oeste do Estado do Paraná. In: **Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural**, 16., 2003, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Juiz de Fora, 2003.

MATUSHIMA, E.R. Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – Tilápia-do-Nilo. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Dissertação de Mestrado)**, 110p, 1994.

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

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MCNALLY, A.K.; ANDERSON, J.M. Interleukin-4 induced macrophage fusion is prevented by inhibitors of mannose receptor activity. **American Journal of Pathology**, v.149, p.975-998, 1996.

MCNALLY, A.K.; ANDERSON, J.M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. **American Journal of Pathology**, v. 147, p. 1487-1499, 1995.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, A.M.; LOPEZ-RUIZ, A.; BIELEK, E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). **Anatomic Record**, v. 239, p. 468-474, 1994a.

METCHNIKOFF, E. **Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891**. London: Kegan Paul, Trench, Trubner & Co, 1893.

MEYER, D.J.; COLES, E.H., RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinária**. 1.ed. São Paulo: Roca, p. 23-36, 1995.

MIYAZAKI, T; KAIGE, N. Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. **Fish Pathology**, v.20, 219-27, 1985.

MONTERO, D.; BLAZER, M.S.; SOCORRO, J.; IZQUIERDO, M.S.; TORT, L.. Dietary and culture influences on macrophage aggregate in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture**, v. 179, p. 523-534, 1999.

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

MORRISON, R.N., NOWAK, B.F. CARSON, J. The histopathological effects of a levamisole-adjuvant *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v.195, p.23-33, 2001.

MULERO, V., ESTEBAN, M.A. MESENGUER, J. *In vitro* levamisole fails to increase seabream (*Sparus aurata* L.) phagocyte functions. **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.315-318, 1998b.

MULERO, V., ESTEBAN, M.A., MUÑOZ, J.; MESENGUER, J. Dietary intake of levamisole enhanced the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.49-62, 1998a.

NAKANISHI, T.; AOYAGI, K.; XIA, C.; DIJKSTRA, J.M.; OTOTAKE, M. Specific cell-mediated immunity in fish. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.72, p.101-109, 1999.

NOGA, E.J.; DYKSTRA, M.J.; WRIGTH, J.F. Chronic inflammatory cells with epithelial cell characteristics in teleost fishes. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 5, p. 429-437, 1989.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. **Fish shell fish Immunology**, Aberdell, v. 11, p. 187-197, 2001.

PALIKOVÁ, M.; KOVÁRU, F.; NAVRÁTIL, S.; KUBALA, L.; PESAK, S.; VAJCOVÁ, V. The effect of pure microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) **Acta Vet. Brno**, v.67, p.265-272, 1998.

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

PERSON, J.M. Mécanismes immunologiques de l'inflammation. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Maisons-Alfort, v.168, n.8/9, p. 565-75 1992.

PETRIC, M.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MALHEIROS, E.B. Suplementação alimentar com vitamina C potencia a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n.1, p. 69-76, 2003a.

PETRIC, M.C.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E. Polycarion macrophage formation kinetics in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Experimental model. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n. 2, p. 95-100, 2003b.

PETRIC, M.C. 2000. **Efeito da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP. 86p.

PETRILLO, T. R.; CLAUDIANO G.S.; MELLO, H, BELLO M.A.A., NAPOLEÃO S.; CASTRO, M.P., MORAES, J.R.E.; MORAES, R.F. Resposta leucocitária de pacus, *Piaractus mesopotamicus* pré-tratados com fosfato de levamisol e atividade glicocorticóide na inflamação crônica por corpo estranho, III **Conferência Latinoamericana e III Congresso Brasileiro sobre Peixes nativos**, Lavras –MG, 2011.

PICKERING, A.D. Changes in blood cell composition of the brow trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season. **J. Fish Biol.**, v.29, p.335-347, 1986.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta*, to disease without reducing the white blood cell count. **J. Fish Biol.**, v.27, p.611-619, 1985.

PRADHAN, P.K.; MOHAN, C.V.; SHANDAR, K.M.; KUMAR, B.M. Inflammatory response in Indian major carp, *Cata catta* and *Puntius cauceriensis*, to *Aphanomices invadans* and Freund's complete adjuvant. **Asian Fish**, v. 21, p.385-394, 2008.

PULSFORD, A.; MATHEUS, R.A. Macrophage and giant cell associated with a microsporidium parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Normy pont Trisopterensesi marki. **Journal of Fish Diseases.**, v. 14 (1), p. 67-78, 1991.

RABER, A.H. et al. **Hematologia para Cães e Gatos.** 1. ed. São Paulo: Roca, p. 81-129, 2003.

RAMAKRISHNA, N.R.; BURT, M.D.. Tissue response of fish by larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridae). **Journal Fish Aquat Science**, v. 48, p. 1623-1628, 1991.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M. & LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de Organismos Aquáticos.** São Paulo: Editora Varela, p. 267, 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.T., SILVA E SOUZA, A. 2004 Hematologia de peixes Brasileiros In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.L.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos.** São Paulo: Editora Varela, p. 89-120, 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, E.A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.S.; LIZAMA, M.A.P (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos.** São Paulo: Editora Varela, 2004. Cap. 4p.89-120.

RIBEIRO, W.R. Contribuição ao estudo da hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus*. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 137.p. **(Tese de Doutorado Universidade de São Paulo, USP).** 1978.

RINGLER, D.J. Inflamação e reparo. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária.** 6. ed. São Paulo: Editora, p. 119-149, 1997.

ROBERTS, R.J. The immunology of Teleost. In: - **Fish Pathology.** London: Bailliere Tindall, p.135-150, 1989.

ROBERTS, R.J. **Patologia de los peces**, Madri, Ediciones Mundi prensa. 1981, 467.p.

ROBERTSEN, B.; RØRSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J., Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, p. 391-400. 1990.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C.R. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. **Aquaculture**, v. 68, p. 115-130, 1988.

ROBINS & COTRAN. **Pathologic basis of diseases**. 7 ed. Saunders: Philadelphia; 2004. 1552 p.

ROCHA, R.M; FLORES, C.Q. The ultrastructure of the hematopoietic tissue in the head kidney of matrinxã *Brycon cephalus* Gunher, 1989 (Teleostei – characidae). **Acta microscopica, Supl.** p. 207-208. 2001.

RYAN, G.B., MAJNO, G. Acute inflammation. **American Journal of Pathology**, Hagerstown, v.86, p.184-276, 1977.

RYAN, G.B.; SPECTOR W.G. Macrophage turnover in inflamed connective tissues. **Proceedings of the Royal Society of London (B)**, v. 175, p. 269-292, 1970.

SAFI, S.; ROODSARI, H.V.; AHMADI, M.R. The effects of levamisole hydrochloride on survival of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fry. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 1, p. 226-230, 2006.

SAKABE, R. Estudo da cinética dos macrófagos e formação de gigantócitos em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo de tilápias do Nilo suplementadas com ácidos graxos essenciais. **2º Simpósio de Nutrição e Saúde de peixes**. Botucatu/SP, 2007.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v.172, p. 63-92, 1999.

SALVADOR, R.; TOAZZA, C.R.; MORAES, J.E.R.; MORAES, F.R. Inflammatory responses of nile tilapia (*Oerochomis niloticus*) to streptococcus agalactiae : effects of vaccination and yeast diet supplementet. **Diseases of aquatic Organisms (Dis. Aquat. Org.)**. Published April 26., v.98, p. 235-241, 2012.

SARLIS, N. J.; BAYLY, S. F.; SZAPARY, D.; SIMONS, S. S.: Quantity of partial agonist activity for antiglucocorticoids completed with mutant receptor is constant in two different transactivation assays but not predictable from steroids structure. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.8 n.3-4, p-89-102, 1999.

SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; ABELLI, L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, otogeny and activity of T and B- lymphocytes. **Aquaculture**, v. 172, p. 328. 1999.

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

SECOMBES, C.J. The in vitro formulation of teleost multinucleate giant cells. **Journal Fish Diseases**, v.8, p.461-464, 1985.

SECOMBS, C.J.; CHAPPELI, L.H. Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. **Annu Fish Dis.**, v. 6, p. 167-177, 1996.

SIWICKI, A. Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v.31a, p.245-246, 1987.

SIWICKI, A.K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 13, p. 87-91, 1989.

SIWICKI, A.K.; MORAND, M.; KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECH-MAJEWSKA, E. Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish. **Acta Vet. BRNO**, v.67, p.323-328, 1998.

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

STOSKOPF, M.K. Fish medicine. **W.B. Saunders**, Philadelphia. p. 882, 1993.

SUMPTER, N.G; GETINO, C.; NOID, D.W. Theory and application of neural compwtingin chemical science. **Ann Rev Phys Chem**, v. 45, p. 439-481. 1994.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 29, p. 349-364, 1986.

SUZUKI, Y.; IIDA, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. **Annu. Rev. Fish Dis.**, v.2, p.149-160. 1992.

TAUBER, A.I. CHERNYAK, L. Metchnikoff and the Origins of Immunology, from Metaphor to Theory. **Oxford University Press**, New York. 347p. 1991.

TAVARES-DIAS, M. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. **(Tese de doutorado-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal):** Centro de Aquicultura, 2003.

TAVARES-DIAS, M., SANDRIN. E.F.S. Influence of anticoagulants and blood storage on

hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.20, n.2, p.151-155, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum Biological Science**, Maringá, v. 26, n.2, p. 157-162, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G.; MORAES, F.R.; Características hematológicas de teleosteos brasileiros.IV. Variaveis do Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pimelodidae). **Ciencia Rural, Santa Maria**, v.32, n.4. p. 693-698, 2002a.

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

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO.; P.C.F.; Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27 , n.1 , p. 43-48, 2001.

TAVARES-DIAS, M; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpres144 p.2004.

TIMUR, G.; ROBERTS, R.J.; MCQUEEN, A. Carragenin granuloma in the (*Pleuronectes platessa*) a histopathological study of chronic inflammation in teleost **Journal of Comparative Pathology**. v. 87, p. 83-87. 1997b.

TIMUR, G.; ROBERTS, R.J.; McQUEEN, A.Carrageenin granuloma in the place (*Pleuronectes platessa*) a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. **J. Comp. Pathol.Devon**, 87: 83-87, 1977.

TIMUR, G.; TIMUR, M. Giant cell reaction associated with *Ichthyophonus hoferi* in wild plaice, *Pleuronectes platessa*. **Journal of Fish Diseases**, v.7, p. 513-14, 1984.

TIZARD, R.I. **Imunologia Veterinária**. 6^a, ROCA, 140 pp. 2002.

TRENZADO, C.E; MORALES, A.E; la HIGUERA, M. Physical effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness, **Aquaculture**, v. 258, p. 583-593, .2006.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal Fisheries Research Board of Canada**. v.22, n.5, 1970.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p.591-625, 1997.

WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIUS, P.H. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, **Aquaculture**, v.248, p.217-225, 2005.

YADA, T. e NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune system in fish. **Int. Rev. Cytol.**, v. 220, p. 35-92, 2002.

YAMAMOTO, K.; MUKAMOTO, M.; WATARAI, S.; KODAMA, H.; NAKAYASU, C.; OKAMOTO, N. Induction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cells in carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Veterinary Research**, v. 62, p.599-603, 2001.