

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CETOCONAZOL SOBRE O EFEITO GLICOCORTICOIDE EM
TILÁPIAS DO NILO DURANTE AEROCISTITE AGUDA**

Guadalupe Sampaio Ferreira

Médica Veterinária

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CETOCONAZOL SOBRE O EFEITO GLICOCORTICOIDE EM
TILÁPIAS DO NILO DURANTE AEROCISTITE AGUDA**

Guadalupe Sampaio Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

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

2017

Ferreira, Guadalupe Sampaio

F383a Cetoconazol sobre o efeito glicocorticoide em Tilápias do Nilo durante aerocistite aguda / Guadalupe Sampaio Ferreira. – – Jaboticabal, 2017

vii, 85 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Marco Antonio de Andrade Belo

Banca examinadora: Annelise Carla Camplesi dos Santos, Luciano Melo de Souza, Silvia Patrícia Carraschi de Oliveira, Wilson Gómez Manrique

Bibliografia

1. Derivado de imidazol. 2. Aeromonose. 3. Inflamação. 4. Peixe teleósteos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:639.3.09

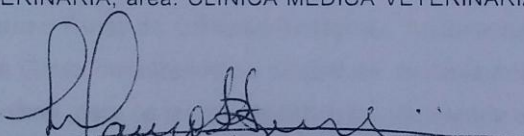
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

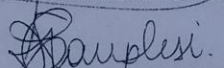
TÍTULO: CETOCONAZOL SOBRE O EFEITO GLICOCORTICOIDE EM TILÁPIAS
DO NILO DURANTE AEROCISTITE AGUDA

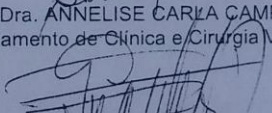
AUTORA: GUADALUPE SAMPAIO FERREIRA

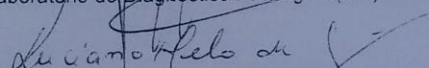
ORIENTADOR: MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

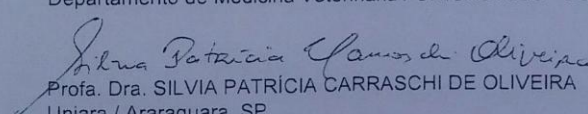
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:


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


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


Prof. Dr. WILSON GÓMEZ MANRIQUE
Laboratório de Diagnóstico Patológico (MV) / UNICASTELO - Descalvado/SP


Prof. Dr. LUCIANO MELO DE SOUZA
Departamento de Medicina Veterinária / UNICASTELO - Descalvado/SP


Profa. Dra. SILVIA PATRÍCIA CARRASCHI DE OLIVEIRA
Uniará / Araraquara, SP

Jaboticabal, 10 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Guadalupe Sampaio Ferreira – Médica Veterinária graduada pela Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/PA, (2009). Especialista em Clínica Médica de Felinos pela Universidade Castelo Branco/ Qualittas Campinas-SP (2010). Realizou Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (2013), sob orientação da Prof.^a Dr.^a Marileda Bonafim Carvalho. Em março de 2013 iniciou o curso de doutorado em Medicina Veterinária na mesma instituição, sob orientação do Prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo. Foi docente da Universidade Estadual de Goiás (2013-2014) ministrando as disciplinas de Fisiologia Humana e Comparada e Imunologia para o Curso de Ciências Biológicas. Atualmente é docente da Universidade Federal de Goiás ministrando as disciplinas de Anatomia Veterinária e Noções de Anatomia Animal, para os cursos de Medicina Veterinária e Zootecnia, respectivamente.

"Obstáculos

Aquele que cede ante ao obstáculo, que desiste diante da dificuldade já perdeu a batalha sem a ter enfrentado. Não raro, o obstáculo e a dificuldade são mais aparentes que reais, mais ameaçadores do que impeditivos. Só se pode avaliar após o enfrentamento. Ademais, cada vitória conseguida se torna aprimoramento da forma de vencer e cada derrota ensina a maneira como não se deve tentar a luta. Essa conquista é proporcionada mediante o esforço de prosseguir sem desfalecimento e insistir após cada pequeno ou grande insucesso. O objetivo deve ser conquistado, e, para tanto, a coragem do esforço contínuo é indispensável. Muitas vezes será necessário parar para refletir, recuar para renovar forças e avançar sempre. É uma salutar estratégia aquela que faculta perder agora o que é de pequena monta para ganhar resultados permanentes e de valor expressivo depois."

Joanna de Ângelis

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

"Sempre há um motivo para agradecer, mesmo que você não perceba. Pedir menos e agradecer mais."

Rosalia Prado

À Deus infinitamente bom, por todos os benefícios concedidos. Pela oportunidade única de estar reencarnada, além de ter concedido-me uma família que é a primeira escola do espírito imortal. Ao meu anjo guardião por toda orientação e inspiração continua para o progresso moral.

À Unesp pela possibilidade de obtenção do Título de Doutora e pela possibilidade de aprendizado. À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, FCAV/Unesp Jaboticabal pela concessão da bolsa de Doutorado por um determinado período destes anos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pela amizade, amor e confiança durante este período.

Aos funcionários da biblioteca da FCAV/Unesp-Jaboticabal, Sr. Claudemir, Dona Marta, Tatiana e Adriana pela ajuda no levantamento bibliográfico e na revisão deste documento.

À Prof.^a Dr.^a Annelise Carla Camplesi, à Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski, Prof. Dr. Luciano Melo de Souza e ao Prof. Dr. Wilson Gómez Manrique no aceite para participarem da banca de qualificação, além das sugestões das correções. E ainda, à Prof.^a Dr.^a Annelise Carla Camplesi, à Prof.^a Dr.^a Silvia Patrícia Carraschi Oliveira, Prof. Dr. Luciano Melo de Souza e ao Prof. Dr. Wilson Gómez Manrique, por aceitarem participar da banca de defesa e por sugestões de melhorias da Tese.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Belo, pela grande oportunidade de trabalharmos juntos, por compartilhar seus conhecimentos e proporcionar uma convivência amigável e sincera.

Aos queridos amigos da pós-graduação, pelo companheirismo e oportunidade de convivência.

Aos meus pais Ronaldo e Nazaré, pela maior dívida impagável ... minha vida! Por acompanhar todo meu desenvolvimento, sempre me incentivando e encorajando nos mais diversos momentos. Ademais, por sempre me ajudarem na minha formação profissional.

Aos meus irmãos Grace, Giulianne e Gyorgy por todo incentivo e amor, e acima de tudo, por serem meus eternos amigos, seja perto ou longe, são os melhores presentes que meus pais me deram.

Ao meu marido Guido e meus filhos Alice e Arthur, pelo carinho, amor, paciência, compreensão e apoio. Minha família, meu maior tesouro!

Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa em Farmacologia Animal - GAP, em especial ao Roberto Barbuio, Alessandra Moraes, Ed Johnny Prado e Vanessa Faria, pela grande e imensurável ajuda na realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos da época da graduação Christian Renato, Juliana Saad e Eva Costa, pelas lembranças boas de um tempo que virou saudade.

Ao meu querido amigo Ary de Almeida Antunes pelas orientações sábias no tempo de Faculdade.

Ao casal de amigos queridos, Mayra e Wilson, que foram responsáveis por me ajudar a conquistar muitas vitórias ao longo deste doutorado. Sou feliz de tê-los em minha vida!

Às minhas grandes amigas Cíndia de Jesus, Mayra Araguaia e Viviane Rodrigues Mestre, pelas longas conversas, desabaços e conselhos! Obrigada por serem essas pessoas incríveis.

Aos Professores Doutores do Laboratório de Anatomia Veterinária, Regional Jataí - UFG, Cássio Fontana e Henrique Ferraz, pela paciência e compreensão nos meus momentos de ausência para finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	i
Certificado de Comissão de ética no uso de animais.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1. Inflamação em peixes teleósteos.....	10
3.2. Fisiologia do estresse em teleósteos.....	13
3.3. Efeito anti-inflamatório do cortisol.....	18
3.4. Cetoconazol.....	19
3.5. Hematologia e bioquímica em peixes	21
3.6. Proteínas de fase aguda	23
3.7. Burst - Atividade Respiratória	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Peixes e acondicionamento.....	26
4.2. Delineamento experimental.....	27
4.3. Anestesia dos peixes.....	28
4.4. Isolamento da <i>Aeromonas hydrophila</i>	28
4.5. Preparação do inóculo e indução do processo inflamatório.....	29
4.6. Administração de dexametasona (DEXA) e cetoconazol (CETO).....	29
4.7. Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória	30
4.8. Avaliação hematológica.....	32
4.9. Avaliação da atividade respiratória dos leucócitos (burst respiratório).....	33
4.10. Determinação das proteínas de fase aguda.....	34
4.11. Índice Somático	35
4.12. Avaliação da bioquímica sérica.....	35
4.13. Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Avaliação do exsudato	36
5.2. Avaliação do hemograma na aerocistite.....	39
5.3. Leucograma e trombograma.....	40
5.4. Bioquímica sérica.....	42
5.5. Proteinograma.....	44
5.6. Estudo do índice hepático e esplênico.....	45
5.7. Burst oxidativo.....	47
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFÊNCIAS.....	55



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Estudo da administração do Cetoconazol sobre o efeito glicocorticóide em Tilápias do Nilo durante aerocistite infecciosa induzida por *Aeromonas hydrophila***", protocolo nº 22098/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP, em reunião ordinária de 16 de fevereiro de 2016.

Vigência do Projeto	10/12/2015 a 30/08/2016
Espécie / Linhagem	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Nº de animais	170
Peso / Idade	± 300g / adulto
Sexo	M
Origem	Piscicultura / Criatório

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

CETOCONAZOL SOBRE O EFEITO GLICOCORTICOIDE EM TILÁPIAS DO NILO DURANTE AEROCISTITE AGUDA

RESUMO - Com o objetivo de estudar a fisiopatologia da reação inflamatória em tilápias, este estudo avaliou a participação do tratamento exógeno com cetoconazol sobre o efeito glicocorticoide de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, durante aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila*. Para tanto, foram utilizadas 91 tilápias, constituindo cinco tratamentos: Não tratado e não inoculado (Padrão fisiológico); Não tratado e inoculado (controle infectado); Tratado com dexametasona (DEXA) e inoculado; Tratado com cetoconazol (CETO) e inoculado; Tratado com DEXA + CETO e inoculado. Após anestesia profunda nos períodos experimentais de 6, 24 e 48 horas pós-inoculação (HPI) coletou-se o exsudato para contagem celular e sangue para determinação do hemograma completo, proteinograma, bioquímico sérico. Na fase inicial da infecção (6HPI), o tratamento subcutâneo das tilápias com 200 UI-kg⁻¹ de cetoconazol resultou em atividade pró-inflamatória caracterizada pelo aumento do acúmulo de granulócitos e diminuição de trombócitos no exsudato, associado à neutrofilia e aumento dos níveis séricos de haptoglobina e ceruloplasmina. No quadro eritrocitário inicial de tilápias tratadas com cetoconazol, observou-se diminuição do número de hemácias com diminuição do hematócrito e do volume corpuscular médio, caracterizando alterações microcíticas comuns em deficiências por ferro, corroborando os aumentos observados nos níveis séricos das proteínas de fase aguda haptoglobina e ceruloplasmina. No pico de exsudação celular para o foco inflamado 24 HPI, tilápias tratadas com cetoconazol apresentaram aumento do acúmulo de trombócitos associado à trombocitopenia e aumento dos níveis séricos de transferrina. Na fase tardia da infecção (48 HPI), o tratamento subcutâneo das tilápias com 200 UI-kg⁻¹ de cetoconazol resultou em atividade pró-inflamatória caracterizada pelo aumento do acúmulo de macrófagos no exsudato associado ao quadro de monocitose e diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio na atividade respiratória leucocitária. Contudo, os resultados da participação do cetoconazol no efeito glicocorticoide demonstraram atividade pró-inflamatória por favorecer a cinética de acúmulo de granulócitos na fase inicial e de macrófagos em fase mais tardia com aumento de atividade de proteínas de fase aguda, entretanto, efeitos deletérios transitórios foram evidentes no quadro hematológico associados à patogenia da aeromonose em animais tratados com este derivado do imidazol.

Palavras-chave: derivado do imidazol, aeromonose, inflamação, peixes teleósteos.

KETOCONAZOLE ON GLUCOCORTICOID EFFECT ON NILO TILAPS DURING ACUTE AEROCYSTITIS

ABSTRACT - In order to study the pathophysiology of the inflammatory reaction in tilapias, this study evaluated the participation of the exogenous treatment with ketoconazole on the glucocorticoid effect of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during acute aerocystitis induced by *Aeromonas hydrophila*. For this, 91 tilapias were used, constituting five treatments: Untreated and uninoculated (Physiological pattern); Untreated and inoculated (infected control); Treated with dexamethasone (DEXA) and inoculated; Treated with ketoconazole (CETO) and inoculated; Treated with DEXA + CETO and inoculated. After deep anesthesia in the experimental periods of 6, 24 and 48 hours post-inoculation (HPI), the exudate was collected for cell count and blood for determination of the complete blood count, proteinogram, serum biochemistry. In the initial phase of infection (6HPI), the subcutaneous treatment of tilapia with 200 IU kg⁻¹ of ketoconazole resulted in proinflammatory activity characterized by increased granulocyte accumulation and decreased thrombocytes in the exudate associated with neutrophilia and increased levels of serum levels of haptoglobin and ceruloplasmin. In the initial erythrocyte framework of ketoconazole-treated tilapia, a decrease in the number of red cells with decreased hematocrit and mean corpuscular volume was observed, characterizing common microcytic changes in iron deficiencies, corroborating the observed increases in serum levels of acute phase proteins haptoglobin and ceruloplasmin. At the peak of cellular exudation to the inflamed focus 24 HPI, tilapia treated with ketoconazole showed increased thrombocyte accumulation associated with thrombocytopenia and increased serum levels of transferrin. In the late phase of infection (48 HPI), subcutaneous treatment of tilapia with 200 IU kg⁻¹ of ketoconazole resulted in proinflammatory activity characterized by increased accumulation of macrophages in the exudate associated with monocytosis and decreased production of reactive oxygen species (ROS) in the leukocyte respiratory activity. However, the results of the participation of ketoconazole in the glucocorticoid effect demonstrated a proinflammatory activity, favoring the kinetics of accumulation of granulocytes in the early phase and of later macrophages with increased activity of acute phase proteins, however, transient deleterious effects were evident in the hematological profile associated with the pathogenesis of aeromonosis in animals treated with this imidazole derivative.

Keywords: Derived from imidazole, aeromonose, inflammation, teleost fish.

LISTAS DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Distribuição das tilápias nos Estudos de eficácia terapêutica de cetoconazol e dexametazona.....	27
Tabela 2	Valores médios ¹ e ANOVA ² observados no estudo da contagem relativa do exsudato inflamatório de tilápias tratadas durante aerocistite por <i>A. hydrophila</i>	38
Tabela 3	Valores médios ¹ e ANOVA ² observados no estudo da contagem hematológica de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametazona durante aerocistite por <i>A. hydrophila</i>	40
Tabela 4	Valores médios ¹ e ANOVA ² observados no estudo da contagem absoluta de leucócitos e trombócitos no sangue de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametazona durante aerocistite por <i>A. hydrophila</i>	41
Tabela 5	Valores médios ¹ e ANOVA ² observados no estudo da contagem absoluta do bioquímico sanguíneo de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametazona durante aerocistite por <i>A. hydrophila</i>	43
Tabela 6	Valores médios ¹ e ANOVA ² observados no estudo da análise das proteínas de fase aguda de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametazona durante aerocistite por <i>A. hydrophila</i>	45
Tabela 7	Valores médios ¹ e ANOVA ² observados no estudo da análise somática hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametazona durante aerocistite por <i>A. hydrophila</i>	46

LISTAS DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representação esquemática do controle da liberação do cortisol pelo eixo HPIotálamo-HPIófise-interrenal (IH) no peixe teleósteo.....	14
Figura 2	Consequências orgânicas da fisiologia do estresse e peixe teleósteo.....	16
Figura 3	Transporte dos peixes (A). Acondicionamento nos microcosmos (B).....	27
Figura 4	Administração do inoculo de <i>A. hydrophila</i> na cavidade celomática.....	29
Figura 5	Administração de glicocorticóide por via intramuscular na região dorso- lateral esquerda (A). E, administração de cetoconazol via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda (B).....	30
Figura 6	Necropsia do peixe com corte longitudinal ventral e corte longitudinal ventro-lateral-dorsal para acesso a bexiga natatória (A e B). Acesso a bexiga natatória para coleta do exsudato com pipeta de Pateur estéril (C). Contagem de células na câmara de Neubauer pelo fator de diluição (D).....	31
Figura 7	Diferentes tipos de células provenientes do exsudato de tilápias.....	32
Figura 8	Coleta de amostra de sangue por punção do vaso caudal (A). Determinação da contagem global de células sanguíneas realizadas em câmara de Neubauer (B).....	33
Figura 9	Necropsia das tilápias. Abertura da cavidade celomática (A), separação dos órgãos (B), e pesagem dos órgãos para cálculo de índice somático.....	35
Figura 10	Análise bioquímica sérica. Centrifugação do sangue (A). Dissoração sanguínea (B) e analisador bioquímico Lab Quest (C).....	36

Figura 11	Contagem absoluta do acúmulo celular presente no exsudato da bexiga natatória de tilápias do Nilo inoculadas com <i>Aeromonas hydrophila</i>	37
Figura 12	Valores médios (ANOVA) observados na produção de espécies de oxigênio reativos (ROS) em tilápias infectadas com <i>Aeromonas hydrophila</i> e tratadas com dexametasona e/ou cetoconazol.	47

1. INTRODUÇÃO

O relatório da FAO de 2016 estima que o Brasil deva registrar um crescimento de 104% na produção aquícola até o ano de 2025, com grande destaque para a produção de tilápias (FAO, 2016). A intensificação dos recursos produtivos, com o objetivo de atender a nova realidade de mercado, representa um desafio para as autoridades sanitárias. Pois, o elevado adensamento populacional nos diferentes sistemas de criação favorece o aparecimento de enfermidades, que comprometem economicamente as pisciculturas, e em casos de zoonoses representam sérios problemas para a saúde pública (CASTRO et al., 2014).

Neste preceito, agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (BELO et al., 2012), tais como a *Aeromonas hydrophila* agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemias hemorrágicas em peixes de água doce, acarretando perdas na produção e na qualidade do pescado (REQUE et al., 2010).

A inflamação é uma reação do organismo contra um agente agressor ou lesão tecidual. Segundo Belo et al. (2014), os processos infecciosos, inflamatórios e cicatriciais e seus mecanismos de controle são bem conhecidos em mamíferos. Entretanto, pouco se conhecem destes processos em outras classes, principalmente os peixes. O cetoconazol, derivado do imidazol, é um fármaco de primeira linha usado para supressão da esteroidogênese e bloqueio endógeno da produção de cortisol, largamente empregado no tratamento médico da doença de Cushing em seres humanos e atua por bloquear as enzimas CYP450 11-β-hidroxilase e 17-α-hidroxilase (BURNS et al., 2016). Porém, pouco se sabe sobre o efeito deste fármaco em peixes teleósteos.

Partindo da importância da tilapicultura para economia brasileira, associada à necessidade de estudar a fisiopatologia da reação inflamatória, a presente investigação buscou em condições experimentais controladas, avaliar a participação do cetoconazol sobre o efeito glicocorticoide durante aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito da administração exógena de cetoconazol sobre a resposta glicocorticoide de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, durante aerocistite infecciosa por *Aeromonas hydrophila*

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o componente celular presente no exsudato da aerocistite
- Avaliar o hemograma, bioquímica sérica, índice somáticos hepático e esplênico e proteinograma
- Avaliar a atividade respiratória dos leucócitos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Inflamação em peixes teleósteos

A inflamação é um processo que pode ser definido como a reação dos tecidos vascularizados frente a injúria local. Caracteriza-se morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. Na inflamação aguda ocorre vasodilatação, exsudação e infiltração de neutrófilos. Este processo é ativado e amplificado por uma série de fatores extracelulares que coordenam o processo inflamatório (ADAMS-CHAPMAN; STOLL, 2001; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004) e envolvem os sistemas imunológico, cardiovascular, endócrino e nervoso (KIM; DEUTSCHMAN, 2000). Embora a inflamação aguda seja benéfica, a inflamação crônica pode precipitar a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, caracterizada por HPIer- inflamação que pode levar a lesão orgânica, choque e morte (ADAMS-CHAPMAN; STOLL, 2001; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Na maioria das situações, após a lesão, a regeneração ocorre em decorrência da resposta inflamatória adequada e recuperação da homeostasia (KIM; DEUTSCHMAN, 2000). O eixo Hipofisário-adrenal e os componentes do sistema imune inato e adaptativo desempenham papel fundamental na regulação da inflamação e imunidade (RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

A resposta de um organismo à lesão e seu padrão estereotipado característico, depende mais da espécie ou indivíduo do que a natureza do agente prejudicial. É a partir desta reação estereotipada que a resposta do organismo é mediada endogenamente por materiais ativos mobilizados, denominados de mediadores químicos da resposta inflamatória que agem localmente. No entanto, o processo inflamatório, devido a sua complexidade, pode evoluir para lesões crônicas afetando o organismo como um todo. Particularmente, a inflamação é um processo modulador, quando, o organismo passa a responder a intensidade e a persistência do estímulo nocivo, assim sendo, os "moduladores da inflamação" são ativados (GARCIA-LEME, 1981).

Qualquer estágio inflamatório ou resposta imunológica é afetada por ações hormonais. Isso sugere que os hormônios atuam como moduladores da reação do hospedeiro contra traumas e infecções. Os receptores hormonais específicos são

detectados nas estruturas inflamadas. As ligações de hormônios aos receptores celulares específicos por sua vez, desencadeiam as respostas inflamatórias. Diversos hormônios com funções anti-inflamatórias são capazes de influenciar eventos inflamatórios (GARCIA-LEME; FARSKY, 1993).

As citocinas são mediadores necessários da resposta inflamatória ao local de infecção e lesão, ademais são promotores essenciais da cicatrização de feridas. Em casos de lesões graves ou infecção, há persistência das respostas de citocinas pró-inflamatórias podendo levar à lesão e disfunções de órgãos. A presença de citocinas anti-inflamatórias podem servir para atenuar algumas dessas respostas exageradas, contudo, em excesso torna o paciente imunocomprometido e susceptível à morbidade infecciosa (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; KIM; DEUTSCHMAN, 2000).

Há duas categorias de substâncias formadas ou liberadas nas áreas inflamadas que melhoram a aderência de leucócitos às células endoteliais. São as citocinas e os produtos quimiotáticos. A adesão das glicoproteínas específicas expressam na superfície dos leucócitos e das células endoteliais papel semelhante ao fenômeno adesivo (GARCIA-LEME; FARSKY, 1993).

As citocinas são mediadores polipeptídicos classicamente associados com a regulação da imunidade e da inflamação. No sistema imunológico atuam como mensageiros intercelulares responsáveis pela modulação da atividade de células adjacentes, através da interação com receptores específicos de elevada afinidade. As principais citocinas pró-inflamatórias são a interleucina - 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) que, juntamente, com as citocinas anti-inflamatórias interleucina - 6 (IL-6), regulam os processos inflamatórios nos tecidos locais e medeiam a resposta pelo sistema nervoso central frente a infecção e inflamação. Estas respostas são caracterizadas por febre e alterações comportamentais expressos por sinais clínicos inerentes as doenças, bem como, alterações na atividade neuroendócrina (TURNBULL; RIVIER, 1995).

Muitas citocinas pró-inflamatórias liberadas em resposta à injúrias inflamatórias exercem influência direta sobre o eixo Hipotálamo-Hipófise-adrenocortical promovendo a liberação de glicocorticóide que atuam na resposta inflamatória para manter a homeostasia neuroendócrina. Os mecanismos pelos quais as citocinas fazem a liberação dos glicocorticóides são complexos, contudo,

sofre dano ao serem afetados por estímulos contínuos decorrentes a processo infeccioso ou tensão do tipo abiótica ou biótica, e ainda, sofrem influência direta da idade e dos mecanismos contra-regulatórios (HADDAB; SAABÉ; SAFIEH-GARABEDIAN, 2002; JOHN; BUCKINGHAM, 2003; LEONARD, 2005).

Os processos infecciosos podem ser de etiologia viral, fúngica ou bacteriana. Dentre as bactérias amplamente distribuídas e com potencial patogênico destacam-se os microrganismos do gênero *Aeromonas* que têm como característica a capacidade de secretar vasta gama de enzimas associadas a patogenicidade e adaptabilidade ambiental. Dentre elas, as mais estudadas são as β -lactamases, proteases, lipases, enterotoxinas hemolíticas, quitinases, nucleases e amilases (PEMBERTON; KIDD; SCHMIDT, 1997).

Inicialmente, as *Aeromonas* foram reconhecidas apenas como causadoras de doenças sistêmicas em animais. Hoje, o gênero *Aeromonas* é considerado não só como um importante patógeno causador de doenças em peixes, mas como agente etiológico responsável por uma variedade de complicações infecciosas (JANDA; ABBOTT, 2010).

Recentemente, estudos realizados por Ni et al. (2016) demonstraram os efeitos de lipídios na dieta sobre o crescimento e imunidade em infecção por *A. hydrophila* sobre a resposta imunológica nos tecidos do rim e do baço em *Carpas* capim (*Ctenopharyngodon idella*). Portanto, a identificação dos fatores responsáveis pela resposta imunológica à infecção por *A. hydrophila* tem grande importância para prevenção e controle de doenças em *Ctenopharyngodon idella* (YANG et al., 2016).

A bexiga natatória do peixe é uma vesícula cheia de gás com função hidrostática, envolta por uma membrana colagenosa fina e bem vascularizada. Esta estrutura possui característica ideais para se estudar a administração de fármacos em peixes por não causar maiores danos ao organismo, uma vez que a membrana circulante impede o refluxo e o espalhamento dos agentes injetados. Considera-se método útil para outros estudos imunológicos, já que é possível isolar grandes números de células de defesa sem contaminantes (ENDO et al., 1995).

A cinética celular inflamatória induzida pela carragenina na bexiga natatória de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), demonstrou processo inflamatório por congestão, edema de sua parede e migração de células predominantemente

mononucleares na luz do órgão (MATUSHIMA; MARIANO, 1996; MARTINS et al., 2006). Após inoculação de lipopolissacarídeos (LPS) em bexiga natatória de Tilápia do Nilo houve a formação de exsudato contendo principalmente neutrófilos após 24 horas de aplicação (ENDO et al., 1997).

Castro et al (2014), estudaram a resposta inflamatória e a cinética de seus componentes em tilápias do Nilo, alimentadas com dietas suplementadas como carboquelato de cromo (18mg/kg), parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (0,3%) e sua associação com a resposta inflamatória aguda induzida na bexiga natatória dos inoculados com *Streptococcus agalactiae* inativado observaram maior acúmulo de linfócitos no foco inflamatório.

A utilização de *A. hydrophila* inativada em estudos com inflamação em peixes *Piaractus mesopotamicus* e *O. niloticus* sugere predominância de células como trombócitos e linfócitos (BOZZO et al., 2007; CASTRO, 2008; REQUE et al., 2010). Todavia, elementos celulares deste processo ainda não estão determinados e muitas dúvidas ainda existem. Pouco se sabe sobre a mediação química nesta classe de animais, interferência da resposta imunológica, relação dos agentes infecciosos e patogênese da inflamação (MATUSHIMA; MARIANO, 1996). Variáveis como a espécie de peixes e sua posição filogenética dificulta a distinção entre diferentes tipos celulares (JORGENSEN et al., 1993).

3.2. Fisiologia do estresse em teleósteos

O cortisol é o principal corticosteroide do peixe teleósteo. Sua síntese e secreção ocorrem pelo tecido inter-renal situado na região superior dos rins ou prónefrons. As células cromafins, homólogas à adrenal dos mamíferos, secretam catecolâminas que são misturadas dentro das ilhotas situadas ao longo dos seios da veia cardinal (HONTELA, 1998).

Quando secretado pelas células inter-renais, o cortisol provoca imunossupressão, catabolismo proteico no músculo, e a síntese de glicose no fígado a partir de aminoácidos e ácidos graxos (gliconeogênese) durante exposição ao estresse. Os teleósteos quando expostos à situação estressantes, liberam serotonina pelo sistema nervoso central. A serotonina estimula o hipotálamo a liberar

o fator liberador de corticotrofina (CRF), o qual aumenta a liberação de hormônio adenocorticotrófico ou corticotrofina (ACTH) pela adenoipófise. O ACTH atua nas células inter-renais, secretando o cortisol. A urotensina I (UI) age como neurotransmissor e é liberado pelo Hipotálamo e atua na adenoipófise (Figura 1). Os níveis de cortisol aumentam no sangue até que, por retroalimentação negativa, inibem a liberação de CRF e UI pelo Hipotálamo, que leva a redução da liberação de ACTH e do cortisol (BALDISSEROTTO, 2013).

O cortisol, juntamente com as catecolâminas liberadas pelos tecidos cromafins adrenérgicos, permitem aos animais lidarem com situações estressantes ao ativarem um conjunto de respostas fisiológicas como diminuição do glicogênio hepático, aumento da glicose plasmática, aumento na frequência cardíaca, aumento no fluxo sanguíneo para as guelras e mudança em eletrólitos plasmáticos (HONTELA, 1998). Os sítios específicos dos receptores de ligação ao cortisol estão localizados nas brânquias, fígado, cérebro e intestino de peixes teleósteos (MAULE; SCHRECK, 1991; POTTINGER; KNUDSEN; WILSON, 1994).

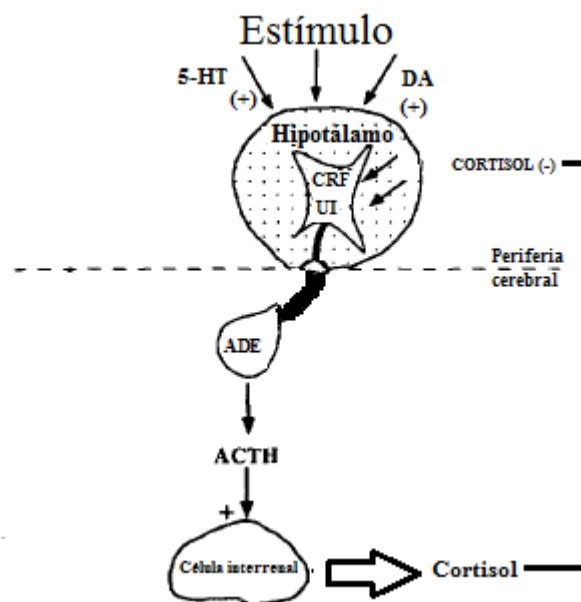


Figura 1. Representação esquemática do controle da liberação do cortisol pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-interrenal (IH) no peixe teleósteo.

DA: Dopamina, 5-HT: serotonina, CRF: Fator liberador de corticotrofina, UI: Urotensina I, ADE: adenoipófise, ACTH: hormônio adenocorticotrófico, (+): estimulação, (-): inibição (TURNBULL; RIVIER, 1995).

O eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal (IH) no peixe é estimulado em todas as formas de estresse ambiental. A elevação do cortisol plasmáticos é utilizada como medida quantitativa da magnitude da resposta ao estresse. Este hormônio na resposta ao estresse está relacionado à sua mobilização de energia, principalmente a gliconeogênese (JANSSENS; WATERMAN, 1988; PICKERING, 1993).

Os estresses em peixes pode ser agudo ou crônico. O estresse agudo é caracterizado pelo aumento dos níveis séricos de cortisol durante algumas horas e retorna aos valores basais, durante o manuseio destes animais (PICKERING, 1993; PICKERING; POTTINGER, 1989). No estresse crônico, os níveis de cortisol podem permanecer elevados por dias ou semanas, sob condições de superlotação por exemplo, e podem retornar aos valores basais apesar de ainda permanecerem na presença do agente estressor (PICKERING; STEWART, 1984; PICKERING, 1993).

Os peixes respondem ao estresse refletindo sua severidade e a duração do estímulo. Estas respostas preparam o organismo para a fuga e a luta. As consequências das reações fisiológicas dos peixes a este tipo agudo de estresse necessita ser analisada, tanto a resposta ao tipo de estresse, como sua intensidade (BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006) (Figura 2).

O estresse em peixes é uma consequência inevitável da prática de manejo normal dentro da aquicultura. Em casos extremos, uma variedade de estressores, incluindo a captura e manipulação, densidade de estocagem, e estado nutricional podem ter efeitos negativos sobre reprodução, taxa de crescimento e qualidade de carne, além da susceptibilidade a agentes infecciosos (WELLS; PANKHURST, 1999). Existem três respostas integradas ao estresse do peixe, cita-se a primária, secundária e terciária (PICKERING, 1981; WEDEMEYER; BARTON; Mc LEAVY, 1990; PICKERING; POTTINGER, 1995; BARTON, 2002; LIMA et al., 2006).

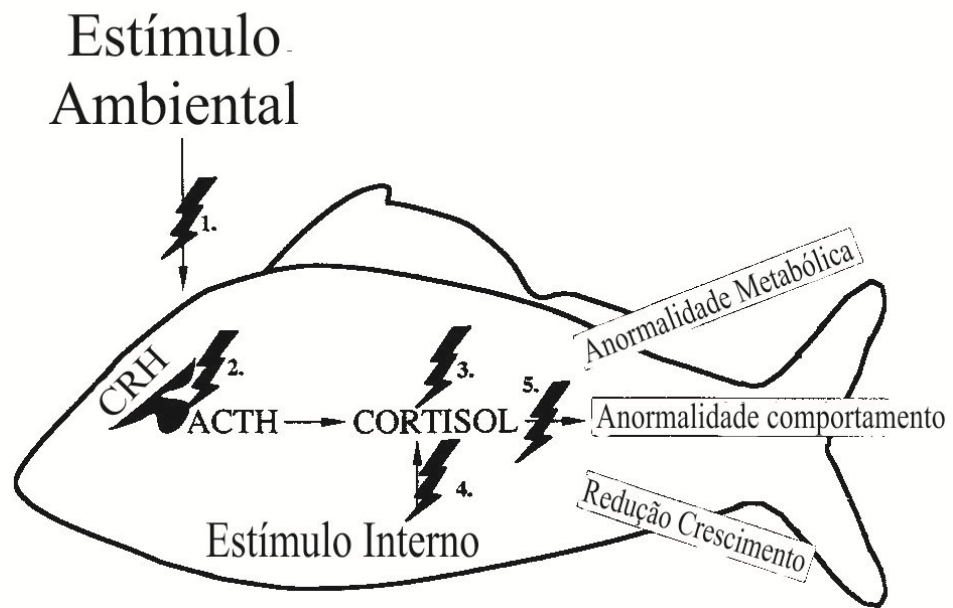


Figura 2. Consequências orgânicas da fisiologia do estresse em peixe teleosteo. As setas irregulares mostram a interrupção potencial do processo normal. (1) Percepção de estímulo. (2) Síntese e secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). (3) Síntese e secreção do cortisol. (4) Percepção de estímulos internos. (5) Funções fisiológicas (HONTELA, 1998).

A resposta primária a tais perturbações é fisiológica de origem endócrina (WELLS; PANKHURST, 1999), compreendendo a ativação dos centros cerebrais, resultando em liberação de catecolâminas e corticosteróides (LIMA et al., 2006), em que transitoriamente hormônios adrenérgicos dão lugar a elevação dos níveis de corticosteroides quando o estresse persiste como uma condição crônica (WELLS; PANKHURST, 1999). O cortisol é principal corticosteroide para ativação do estresse primário (MOMMSEN et al., 1999).

Os efeitos secundários do estresse são definidos como a canalização das ações e dos efeitos imediatos desses hormônios no sistema circulatório e nos tecidos (LIMA et al., 2006) alterando o equilíbrio homeostático do metabolismo (WELLS; PANKHURST, 1999; BARTON, 2002), causando ainda perturbação no equilíbrio hidromineral (LIMA et al., 2006). Podem ocorrer mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos (MOMMSEN et al., 1999). Os efeitos terciários são o comprometimento no desempenho, mudanças no comportamento e aumento da suscetibilidade à doenças (MOMMSEN et al., 1999; BARTON, 2002). A limitação da

capacidade do animal tolerar agentes estressores subsequentes ou adicionais é atribuída à manifestações da resposta terciária (LIMA et al., 2006).

Estímulos estressantes são amplamente utilizados como um índice de confiança para ativação de resposta neuroendócrina após alterar o nível de cortisol no sangue de peixes (BARTON; IWAMA, 1991; POTTINGER; CARRICK, 1999). O eixo Hipotálamo-pituitária-interrenal é estimulado pelo estresse ambiental. A elevação do cortisol no plasma é amplamente utilizado como medida quantitativa da magnitude da resposta ao estresse. O cortisol possui várias funções em peixes teleósteos e a provável função deste hormônio para a resposta adaptativa ao estresse relaciona-se à sua propriedade de mobilizar energia (gliconeogênese primária). Os efeitos catabólicos do cortisol em peixes com estresse crônico são responsáveis pela supressão do crescimento nestes animais (PICKERING, 1993).

Os glicocorticóides mobilizam energia para promover o catabolismo e a redistribuição desta energia em recursos energéticos endógenos para processos fisiológicos tais como imunidade e reprodução, e redistribui estas energias em recursos no sentido de restaurar a homeostase (MOMMSEN et al., 1999; ZOLDERDO et al., 2016). O aumento agudo do glicocorticóide inicializa a função imune, aumentando a disponibilidade de energia (DHABHAR; Mc EWEN, 1997; DHABHAR, 2000). No entanto, o aumento crônico de glicocorticóide suprime a função imune. Especificamente, o glicocorticóide estimulado cronicamente eleva a concentração e redistribuição de leucócitos no corpo e altera os receptores de glicocorticóide em células linfáticas e outros leucócitos (CIDLOWSKI et al., 1996; LEONARD; SONG, 2002; FRENCH et al., 2007). A elevada concentração do estresse oxidativo aumenta a respiração e o metabolismo, consequentemente, causam danos significativos às biomoléculas (ZOLDERDO et al., 20016).

A resposta ao estresse é um processo dinâmico e tomadas de medições fisiológicas durante o curso de tempo são apenas representações instantâneas deste processo. A medição de cortisol plasmático sozinho pode não refletir necessariamente o grau de estresse experimentado pelo peixe naquele instante, mas é provável ser representativa da extensão aguda ou resposta inicial do ocorrido. Fatores que afetam a magnitude, duração e recuperação do cortisol e outras alterações fisiológicas em peixe durante a resposta ao estresse são importante para

a interpretação adequada dos experimentos. Além disso, a compreensão da mudança que ocorre nos peixes em resposta a alterações, manifesta no seu desempenho da população prejudicando sua saúde e sobrevivência (BARTON, 2002).

3.3 Efeito anti-inflamatório do cortisol

Um medicamento padrão ouro para terapia anti-inflamatória é a dexametasona. É um potente glicocorticóide utilizado no tratamento de muitas doenças pois inibe eficazmente a expressão de mediadores da inflamação como citocinas/ quimiocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-2 e IL-6. Possuindo diversos mecanismos complexo de ação que envolvem a interação com alvos tanto no citosol, quanto no núcleo (SIMION et al., 2016).

O cortisol é um hormônio anti-inflamatório que limita o aumento da permeabilidade nos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, o acúmulo de células no local da inflamação (BELO et al., 2005). Em resposta a uma lesão, o cortisol, tem efeito anti-inflamatório, inibindo a ativação de células imunes inatas e adaptativas, induz a apoptose em linfócitos, e a liberação de neutrófilos pela medula óssea (LORD et al., 2014).

A farmacocinética do glicocorticóide inclui absorção, distribuição e eliminação, importantes determinantes da magnitude e duração da ação. Os regimes de dosagem do glicocorticóide não são dependentes de parâmetros farmacocinéticos. O clearance pode ser alterado por estado de algumas doenças, desta forma, alguns pacientes necessitam de doses mais elevadas, uma vez que o clearance está aumentado, resultando sempre em benefícios terapêuticos (SPAHN, 1999).

A administração de glicocorticóides há muito tempo é usada nas doenças inflamatórias e em resposta imune deletéria. Os esteróides utilizados em terapia glicocorticóide são análogos ao cortisol (GARCIA-LEME; FARSKY, 1993). Elevados níveis de glicocorticóide suprimem os fatores responsáveis pela resposta inflamatória, inibindo leucócitos no local da inflamação, reduzindo leucócitos e linfócitos circulantes (MAULE; SHRECK, 1991; ENGELSMA et al., 2003) e efetivamente inibe a expressão de muitos mediadores como citocinas/quimiocinas:

fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-2, e IL-6 (FRANCHIMONT et al., 1998; SIMION et al., 2016).

Estudos adicionais descreveram a correlação entre níveis de cortisol, imunossupressão e aumento da suscetibilidade à doenças baseado na administração exógena de cortisol (SIITERI et al., 1982; FAST et al., 2008).

A dexametasona é um corticosteroide sintético mais potente que os esteroides naturais na supressão da função adrenal em mamíferos, amplamente utilizados no estudo do eixo Hipotálamo-Hipófise-interrenal (DONALDSON; McBRIDE, 1967; SIMION et al., 2016). Os esteroides reduzem a vasodilação, edema e hemorragia. Ou seja, reduzem a Hipersensibilidade tardia e reações imunológicas mediadas por células, este efeito deve-se a uma diminuição do acúmulo de macrófagos e linfócitos no local da inflamação. A diminuição no número de linfócitos explica parcialmente a diminuição do poder microbida do macrófago em tratamentos com corticosteróides (DANNENBERG, 1979).

3.4. Cetoconazol

O cetoconazol é uma medicamento de primeira linha usado para supressão da esteroidogênese no tratamento médico da doença de Cushing, uma vez que, em determinados pacientes humanos o procedimento cirúrgico é contraindicado. Desta forma, o cetoconazol, derivado de imidazole, possui capacidade de bloquear as enzimas CYP450 11- β -hidroxilase e 17- α -hidroxilase e ajuda a controlar e melhorar as características de pessoas com a doença de Cushing (BURNS et al., 2016).

Alterações no metabolismo da droga devido a farmacocinética da interação medicamentosa no organismo ocorrem pela ação da enzima de indução ou pela ação de enzima de inibição. O cetoconazol, por exemplo, é uma fármaco que inibe a enzima CYP, fazendo com que haja acúmulo de medicamentos. Os resultados são efeitos adversos fatais da droga co-administrada (SASAKI; SHIMODA, 2015).

O cetoconazol é um derivado do imidazol utilizado pela primeira vez como terapia anti-fúngica. Observou-se, adicionalmente, que pacientes desenvolveram insuficiência na adrenal em altas doses (CUEVAS-RAMOS; LIM; FLESERIU, 2016). Por sua vez, reduz, também, os níveis de cortisol pela sua atividade adrenolítica

e/ou inibição direta enzimática, além de bloquear a ação do cortisol no seu receptor (NIEMAN, 2002) ou ainda, competir com o cortisol nos receptores para glicocorticóides (VILAR et al., 2000). Drogas que inibem a síntese de esteroide, como o cetoconazol, pode ser usada para reduzir, farmacologicamente, altos níveis de cortisol sérico (McQUADE; YOUNG, 2000; ALHURA; BRASIL, 2005).

Os efeitos endócrinos do cetoconazol resultam da interação do anel imidazólico com o citocromo P-450 constituinte de vários sistemas de enzimas esteroidogênicas dos mamíferos. *In vivo*, a administração de baixas doses de cetoconazol levam a uma redução significativa nas concentrações de androgênio sérica, em doses mais altas, a secreção de cortisol fica suprimida (FELDMAN, 2004). O cetoconazol apresenta propriedades antiinflamatórias provavelmente medidas pela inibição da atividade 5-lipoxigenase (TABOADA, 2004).

É postulado que determinada dose de cetoconazol inibe a liberação de cAMP basal, que por sua vez, age negativamente no CRF diminuindo a secreção corticotrófica de ACTH (basal e estimulada) (STALLA et al., 1988; VILAR et al., 2000; FEELDERS; HOFLAND, 2013). Atuam em várias etapas da esteroidogênese, logo os efeitos colaterais apresentado pelo uso do cetoconazol são decorrentes do bloqueio das reações catalisadas pelo citocromo P₄₅₀ (CYP3A4). O principal efeito é sobre a atividade adrenal de 11- β -hidroxilase, enzima 17- α -hidroxilase e 17,20 liase, 18-hidroxilase e a colesterol desmolase. Acredita-se que a ação do cetoconazol é benéfica em situações que a finalidade seja a inibição da esteroidogênese como meta terapêutica (LOOSE et al., 1983; ENGELHARDT; JACOB; DOERR, 1989; VILAR et al., 2000).

O cetoconazol e o itraconazol são bases fracas que necessitam de ambientes ácidos para absorção oral máxima. Estes farmacos concentram-se na pele, sendo a distribuição realizada via sebo. Além de serem amplamente metabolizados no fígado e excretados na bile e, em um menor grau, na urina (TABOADA, 2004).

A hepatotoxicidade é grave na maioria dos tratamentos (elevação > 5 vezes das transaminases e aparecimento de insuficiência hepática), por isso recomenda-se que sempre a função hepática seja monitorada. Sugere-se a redução da dose, descontinuação ou associação com outra droga (NIEMAN et al., 2015; CUEVAS-RAMOS; LIM; FLESERIU, 2016). Outros efeitos adversos incluem hipogonadismo

em homens e sintomas gastrointestinais como diarreia e náuseas na primeira semana de tratamento (FEELDERS; HOFLAND, 2013; FLESERIU, 2014).

3.5. Hematologia e bioquímica em peixes

Devido aos avanços tecnológicos associados às pesquisas, médicos veterinários e demais profissionais da saúde dispõem de inúmeras ferramentas para auxílio do diagnóstico das enfermidades que acometem seres humanos e animais. Entretanto, muitas delas não são desenvolvidas ou aplicadas para o diagnóstico de doenças em peixes (HRUBEC; CARDINALE; SMITH, 2000).

O avanço da indústria da aquicultura é acompanhado de desafios à criação, manutenção da qualidade da água e estado de saúde dos peixes. Dentre os principais desafios, podemos citar o adensamento populacional, ocorrência de endo e ectoparasitos, alterações das condições de qualidade ambiental, variáveis físicas e químicas da água do viveiro, presença de agentes tóxicos, danos provocados por manejos periódicos inadequados, e dietas não balanceadas (RANZANI-PAIVA, 1991; RANZANI-PAIVA et al., 2013). Logo, existe a crescente necessidade de aprimoramento de ferramentas para auxílio ao diagnóstico.

A hematologia clínica é uma ferramenta aplicada a produção de peixes, pois permite a avaliação das condições de defesa orgânica e permite ao pesquisador identificar as respostas dos peixes frente aos desafios de criação (RANZANI-PAIVA, 1991; RANZANI-PAIVA et al., 2013). Os valores hematológicos somados aos bioquímicos podem proporcionar substanciais informações diagnósticas (HRUBEC; CARDINALE; SMITH, 2000).

Os parâmetros bioquímicos metabólicos e hematológicos, além de serem usados como indicadores biológicos no monitoramento da saúde dos peixes e do ambiente, servem para identificar de forma rápida o estresse que o ambiente pode impor a esses animais. Portanto, permitem avaliar e controlar o estado fisiológico de determinados peixes, padronizando as condições ideais de seu cultivo (CENTENO et al., 2007; TAVARES-DIAS et al., 2007; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007; ARAÚJO et al., 2009). Segundo, Tavares-Dias et al. (1999) a análise hematológica de peixes são de grande valia na piscicultura, já que podem ser utilizados como

indicadores do seu estado fisiológico, no controle de patologias e estresse de manipulação.

Os parâmetros clínicos correspondentes ao estado hígido dos peixes podem apontar importantes informações para diagnóstico e prognóstico auxiliando a identificar enfermidades ou ainda problemas relacionados ao estresse (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2007; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007; DRUMOND et al., 2010). Os parâmetros hematológicos, por sua vez, variam devido as diferentes espécies, forma de coleta ou método analítico, idade ou sexo dos animais, temperatura da água, estação do ano ou fotoperíodo (TOCIDLOWSKI; LEWBART; STOSKOPF, 1997).

As avaliações hematológicas estão se tornando práticas rotineiras para avaliar a saúde dos peixes criados intensivamente. O número de leucócitos e trombócitos são indicadores importantes do estado de saúde dos peixes e úteis para a avaliação do sistema imune (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007). Segundo o estudo realizado por Tavares-Dias (2015) demonstrou que o eritrograma é de grande importância na identificação de processos anemiantes. Por outro lado, o leucograma e trombograma auxiliam no diagnóstico nos processos infecciosos. Assim, os leucócitos podem fornecer informações sobre o sistema imunológico auxiliando no diagnóstico e prognóstico em peixes de ambientes naturais e ambiente de produção.

O conteúdo iônico do fluido corporal pode variar de acordo com o ambiente, e outros fatores. Deste modo, parâmetros bioquímicos sanguíneos de peixes podem ser usados para análise, tais como, identificar dano celular por exposição de substâncias tóxicas, infecções por patógenos, manipulação traumática, efeitos da dieta e resposta ao estresse (TAVARES-DIAS, 2015).

A aquicultura precisa de informações para identificar e controlar situações de estresse e/ou doença com a finalidade de garantir e manter a sanidade na produção. A avaliação dos parâmetros sanguíneos é a maneira mais rápida de detectar esses sinais clínicos (TAVARES-DIAS, MORAES, 2006).

3.6 Proteínas de fase aguda

A resposta de fase aguda é uma resposta não específica e complexa do hospedeiro que ocorre logo após qualquer lesão tecidual. Tem por objetivo restaurar a homeostase e remover a causa da lesão. É considerada também como parte do sistema de defesa inato responsável pela sobrevivência do hospedeiro durante a fase inicial do ataque (PETERSEN et al., 2004; CERÓN et al., 2005).

Estudos com ratos albinos Wistar machos tratados por injeção intraperitoneal com diferentes doses de dexametasona para avaliara as respostas de fase aguda foi possível verificar aumento nas concentrações de haptoglobina e ceruloplasmina enquanto que as concentrações de albumina tenderam a diminuir (ULUTAS et al., 2007). Níveis séricos de ceruloplasmina sob diferentes tipos de condições inflamatórias aguda e crônica induzida experimentalmente em ratos tratados com oxifenilbutazona e hidrocortizona apresentaram aumento concomitante do nível sérico de ceruloplasmina durante as condições inflamatórias o que sugere o envolvimento sérico desta proteína com um dos mecanismos denfensivos inerentes ao corpo contra as respostas nocivas ou a inflamação (DESHMUKH et al., 1985). A presença de aumento de ceruloplasmina sérico pode ser usado como critério para determinar a gravidade ou quantificar a inflamação (SWEENEY, 1967).

Em uma pesquisa sobre a atividade de ceruloplasmina em soro de recém-nascido a termo e prematuros foi medida nos primeiro dia de vida. Os recém-nascidos prematuros que receberam tratamento com corticosteróides pré-natal tiveram atividade da enzima equivalente à dos bebês a termo. Pouco ou nenhuma ceruloplasmina sérica foi encontrada naqueles prematuros que nasceram sem profilaxia esteroides. Logo, foi observada correlação significativa entre a atividade inicial de ceruloplasmina e a morbidade e mortalidade da síndrome do desconforto respiratório (SZABÓ et al., 1987). Ao examinar a imunossupressão induzida por administração por dexametasona em resposta imunológica em bovino por vacina polivalente multivalente respiratória contendo agentes de replicação e não replicação obtiveram como resultados o aumento da replicação dos agentes vacinais e a imunossupressão induzida por dexametasona atenuou a resposta das proteínas de fase aguda (Ceruloplasmina e haptoglobina) e de anticorpos contra os agentes não

replicantes (RICHESON et al., 2016). Em estudo realizado por Higuchi et al. (1995) a partir do isolamento de células do parênquima do fígado de vitelos machos, realizado cultura em monocamadas tratadas com dexametasona, foi possível concluir que há liberação da haptoglobina pelo fígado e o uso desta droga sugere o desenvolvimento de esteatose hepática em bovinos.

Em cães com inflamação o nível sérico de haptoglobina é moderado. Esta proteína é particularmente sensível aos efeitos corticosteróides, logo, seus níveis séricos permanecem elevados após tratamento com corticoides ou em cães com hiperadrenocorticism (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2004; McGROTTY et al., 2005; ECKERSALL; BELL, 2010). Ademais, a haptoglobina tem efeito inibidor na quimiotaxia de granulócitos, fagocitose e atividade bactericida (ROSSBACHER et al., 1999; MURATA et al., 2004).

A transferrina é uma proteína do plasma sanguíneo está associada à imunidade inata. Além de, ser encontrada na mucosa e ligada ao ferro, criando assim um ambiente pobre em ferro onde poucas bactérias são capazes de sobreviver. Os níveis de transferrina diminuem na inflamação, isto é aparentemente contraditório à sua função, porém, esta diminuição está relacionada à quantidade de transferrina que resultaria em hemossiderina no fígado (JAIN et al., 2011). Pesquisas com hepatócitos fetais de ratos tratados com dexametasona verificou-se aumento nos níveis de transferrina (KRAEMER et al., 1986; LESCOAT et al., 1987).

3.7. Burst - Atividade Respiratória

A atividade oxidativa de leucócitos é um indicador da imunidade inata em mamíferos. Foi observada pela primeira vez em 1930 quando alguns pesquisadores perceberam que a fagocitose está relacionada ao elevado consumo de oxigênio. Atualmente, está relacionada diretamente com a liberação de citocinas e a resposta inflamatória em peixes (BILLER-TAKAHASHI et al., 2013). O mecanismo mais importante de defesa é a fagocitose. Logo, pode ocorrer em leucócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos (TAVARES-DIAS et al., 2007b). Os monócitos, macrófagos e neutrófilos são fagócitos profissionais, no entanto, outras células pode executar a

fagocitose de modo que a célula requera a detecção da partícula externa através de receptores de membrana (STUART; EZEKOWITZ, 2005; MATHIAS et al., 2009).

Agentes microbicidas são liberados após fagocitose de partículas estranhas ou bactérias após processo de atividades respiratórias (SECOMBES, 1996). Neste processo o oxigênio é reduzido via sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Nadph-oxidase) ao ânion superóxido, após ação da enzima superóxidodismutase (SOD), transformando em peróxido de hidrogênio (CASTRO, 2008). Sua complexidade está relacionada ao controle espacial e temporal que sua atividade está sujeita. Na célula em repouso, os componentes da oxidase são distribuídos entre o citosol e a membrana plasmática, no entanto, quando a célula é exposta a um estímulo, os componentes citosólicos deslocam-se para a membrana plasmática para reunir ativa oxidase (BABIOR, 1991).

De todas as substâncias oxidantes produzidas durante a atividade respiratória o peróxido de hidrogênio é o mais estável e fácil de mensurar (MORITOMO et al., 2003). A atividade respiratória burst é usado como indicador de imunidade inata em peixes (SAHOO et al., 2005). Em relação a espécies de peixes nativos brasileiros, muito pouco se sabe sobre a resposta imune inata (BELO et al., 2005; BILLER-TAKAHASHI et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais - CEUA, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Câmpus de Jaboticabal - SP, em reunião ordinária do dia 16 de fevereiro de 2016 (Protocolo nº 22098/15).

A parte experimental foi desenvolvida nas dependências do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, NEPEAM, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, SP.

4.1. Peixes e acondicionamento

Durante o estudo foram utilizadas 91 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio 300g oriundas da mesma desova. Após o transporte (Figura 3 A), foram acondicionadas em 13 mesocosmos com capacidade de 500L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano, com vazão de 1 L/min. Após o transporte para os mesocosmos, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltarem aos níveis basais (Figura 3B). Nos primeiros três dias de aclimatização, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L para diminuição da resposta fisiológicas do estresse (CARNEIRO; URBINATI, 2001). Receberam ração comercial peletizada (32% de proteína bruta), constituindo a dieta basal. O arraçoamento dos animais foi realizado duas vezes ao dia sendo alimentados pela manhã e a tarde. A quantidade oferecida correspondeu 3% da biomassa das caixas. A medição dos parâmetros físico-químicos da água (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica e pH) foram realizados todos os dias do estudo às 14:00 horas utilizando o aparelho YSI, modelo 63.



Figura 3. Transporte de Tilápias do Nilo - *Oreochromis niloticus* (A) e acondicionamento nos microcosmos (B). FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017.

4.2. Delineamento experimental

Os peixes foram distribuídos em cinco grupos, constituindo os seguintes tratamentos, conforme Tabela 1. Foram avaliados sete animais por grupos, sendo amostrados em quatro períodos, isto é: zero, seis; 24; 48 horas pós-inoculação (HPI) de *A. hydrophila* na bexiga natatória, para a avaliação da resposta no tempo.

Todas as coletas de amostras foram realizadas no mesmo dia. E os procedimentos laboratoriais foram iniciados imediatamente após as coletas das amostras.

Tabela 1- Distribuição das tilápias no estudo da administração do cetoconazol sobre o efeito glicocorticóide em tilápias do Nilo durante aerocistite infecciosa induzida por *Aeromonas hydrophila*. FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017.

Grupos	Protocolos terapêuticos	Horas após inóculo (HPI)			
		0	6	24	48
Padrão Fisiológico (PF)		N= 07			
NN	Não tratada com DEXA + Não tratado com CETO		N= 07	N= 07	N= 07
ND	Tratada com DEXA 2mg/kg + Não tratado com CETO		N= 07	N= 07	N= 07
CN	Não tratada com DEXA + Tratado com CETO (200 UI/kg)		N= 07	N= 07	N= 07
CD	Tratada com DEXA 2 mg/kg + Tratado com CETO (200 UI/kg)		N= 07	N= 07	N= 07

4.3. Anestesia dos peixes

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 (sedação para captura dos animais, para tratamento e no momento do desafio bacteriano) e 1:500 (momento da eutanásia). Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (WEDEMEYER, 1970). Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados nos mesocosmos com fluxo de água contínuo e aeração.

4.4. Isolamento da *Aeromonas hydrophila*

A estirpe de *Aeromonas hydrophila* foi isolada de peixes naturalmente infectados e foram fornecidas pelo laboratório de Imunologia de Peixe, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP). A identificação foi realizada segundo Popoff (1984), acrescido de outras provas recomendadas por Buchanan e Palumbo (1985) e Abeyta Júnior et al. (1986).

Utilizaram o meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) para crescimento da bactéria. Após o crescimento, as colônias características foram repicadas em meios de cultura e submetidas às provas bioquímicas para identificação da espécie.

Para a confirmação da espécie bacteriana foi feita extração do DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene 16SrDNA e sequenciamento do PCR.

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

Com a ferramenta BLASTn ([ang://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), o fragmento foi comparado com as sequências depositadas no GenBank ([ang://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)), admitindo-se concordância de no mínimo 99% para confirmação da especificidade da sequência. O resultado do

sequenciamento confirmou a espécie como *Aeromonas hydrophila* subespécie *dinakensis*.

4.5. Preparação do inóculo e indução do processo inflamatório

As colônias puras, foram semeadas em meio líquidos TSB e após 24 horas de incubação a 28°C, o material foi centrifugado a 3.000 rpm/5 minutos, em centrífuga clínica, desprezando-se o sobrenadante. A massa bacteriana precipitada foi diluída em solução salina (0,65%), esterilizada até a obtenção da concentração 3×10^9 UFC/mL *Aeromonas hydrophila*, utilizando-se o padrão de turvação entre 3 a 4 na escala de MacFarland (BOZZO, 2007). Com os peixes anestesiados, realizou-se a inoculação de 3×10^9 UFC/mL de *A. hydrophila* inativada em 1 mL de solução salina a 0,65% na cavidade celomática (Figura 4).



Figura 4. Administração do inóculo de *A. hydrophila* na bexiga natatória em Tilápias do Nilo.FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017.

4.6. Administração de dexametasona (DEXA) e cetoconazol (CETO)

Imediatamente após a inoculação de *A. hydrophila* nos grupos correspondentes, realizou-se a aplicação das drogas de acordo com os protocolos

terapêuticos. Portanto, em tratamentos com administração de glicocorticóide¹, a mesma foi realizada pela via intramuscular na região dorso-lateral esquerda, na dose única de 2mg/kg conforme Belo et al. (2011) e administração de cetoconazol² via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda na dose única de 200 UI/kg de peso vivo de acordo com padronização em ensaio piloto. Nas figuras 5 A e 5 B pode ser ver os locais de aplicações do glicocorticóide e do cetoconazol respectivamente.

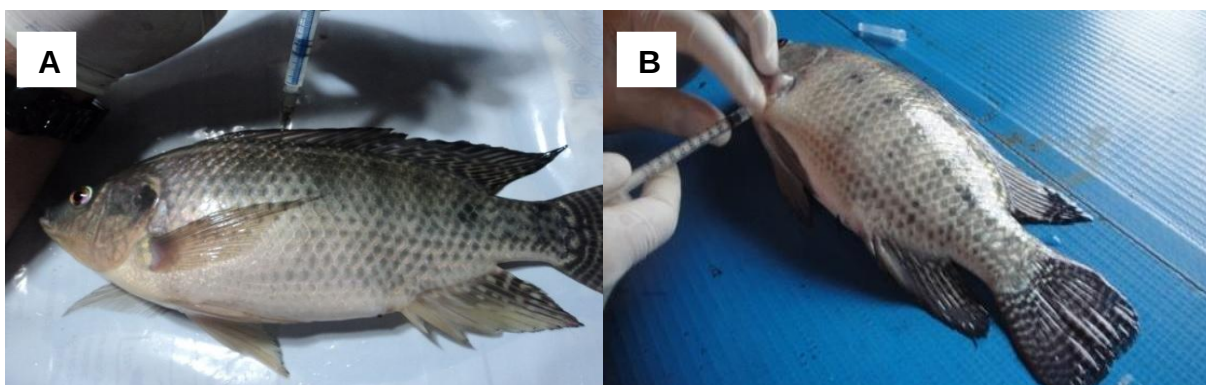


Figura 5. Administração de glicocorticóide (Alcort®) por via intramuscular na região dorso - lateral esquerda (5A). E administração de cetoconazol (ceto-C®) via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda (5B) em Tilápias do Nilo. FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017.

4.7. Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória

Os animais foram eutanasiados 6, 24 e 48 HPI (conforme item 4.3). Logo em seguida, foi injetado 1 mL de solução gelada de PBS, contendo EDTA a 0,065%, à esquerda do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa estéril de 1mL para atingir a bexiga natatória.

Os peixes foram dissecados para ter acesso à bexiga natatória (Figura 6A e 6B). Desta forma, o volume total do exsudato inflamatório foi recolhido com micropipeta estéril e descartável, (Figura 6C) e transferido para tubo tipo eppendorf

¹ Alcort®

² Ceto-C®

e mantidos posteriormente em temperatura de refrigeração. A solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada a 1.000 rpm por cinco minutos em centrífuga clínica. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento total ressuspendido com a adição de volume conhecido (PBS) e uma alíquota desse volume transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz (Figura 6D). Em seguida, multiplicou-se o valor de células encontrado na câmara de Neubauer pelo fator de diluição.

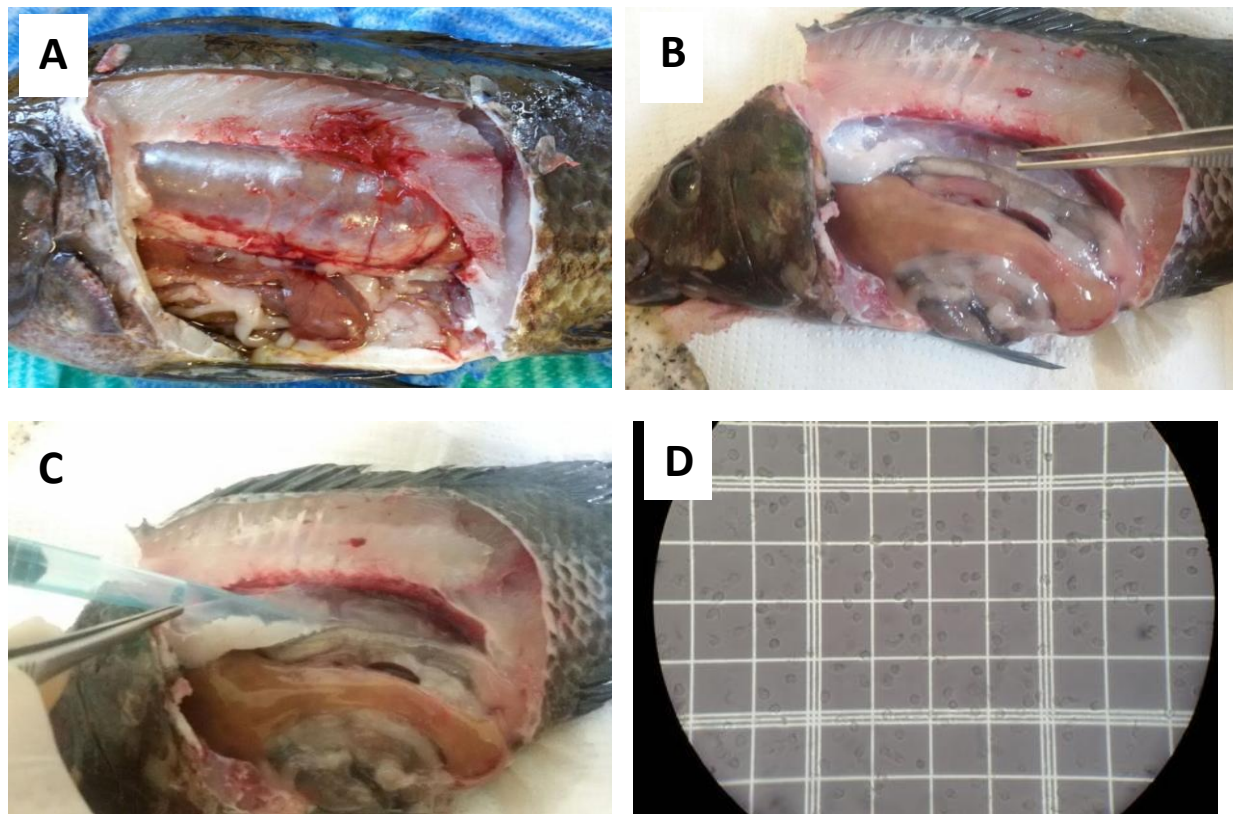


Figura 6. Necropsia de Tilápias do Nilo - *Oreochromis niloticus* com corte longitudinal ventral e corte longitudinal ventro-lateral-dorsal para acesso a bexiga natatória (6A e 6B). Acesso a bexiga natatória para coleta do exsudato com pipeta de Pasteur estéril (6C). Contagem de células na câmara de Neubauer pelo fator de diluição (6D) para o estudo da administração do cetoconazol sobre o efeito glicocorticóide em Tilápias do Nilo. FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017.

Para a contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos realizou-se a extensão de uma gota do sedimento total ressuspendido em lâmina histológica. Nesta lâmina previamente foi feito uma extensão de soro de tilápia. Após fixou-se em álcool metílico, por um minuto e posterior coloração. Com corante “May-Grunwald-Giemsa-Wright” (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003) para

posterior contagem em microscopia de luz de até 200 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório (Figura 7).

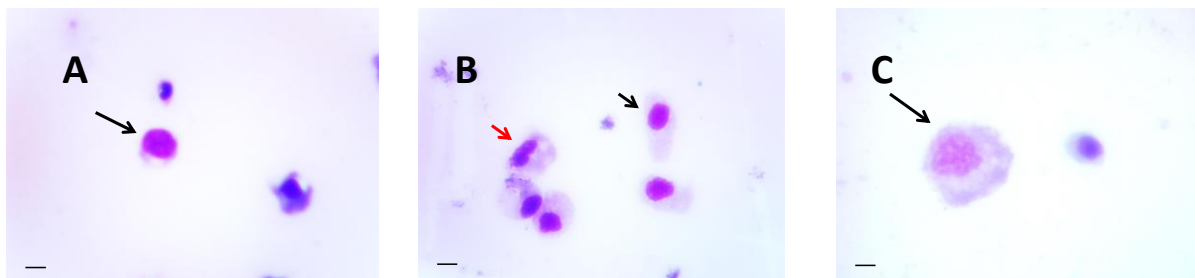


Figura 7. Diferentes tipos de células provenientes do exsudato de Tilápias do Nilo - *Oreochromis niloticus*. 5µm Linfócito (7A). Neutrófilos (7B - seta vermelha). Trombócitos (7B- seta preta). Macrófago (7C). Estudo da administração do cetoconazol sobre o efeito glicocorticóide em Tilápias do Nilo. FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017.

4.8. Avaliação hematológica

Foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal após desafio bacteriano (Figura 8A). A determinação da contagem global de células vermelhas e brancas foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando a solução de Natt e Herrick (1952) com diluente na proporção de 1:100 (Figura 8B). Os eritrócitos foram quantificados nos cinco quadrantes secundários em diagonal do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 5.000. Em relação à determinação total de leucócitos e trombócitos foram quantificados todos juntos nos 25 quadrantes secundários do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 1.000. Para determinação da proporção de trombócitos e leucócitos no sangue foram realizadas extensões sanguíneas em lâmina. Depois de secas, foram coradas com “May-Grunwald-Giemsa-Wright” segundo Tavares-dias e Moraes (2003).

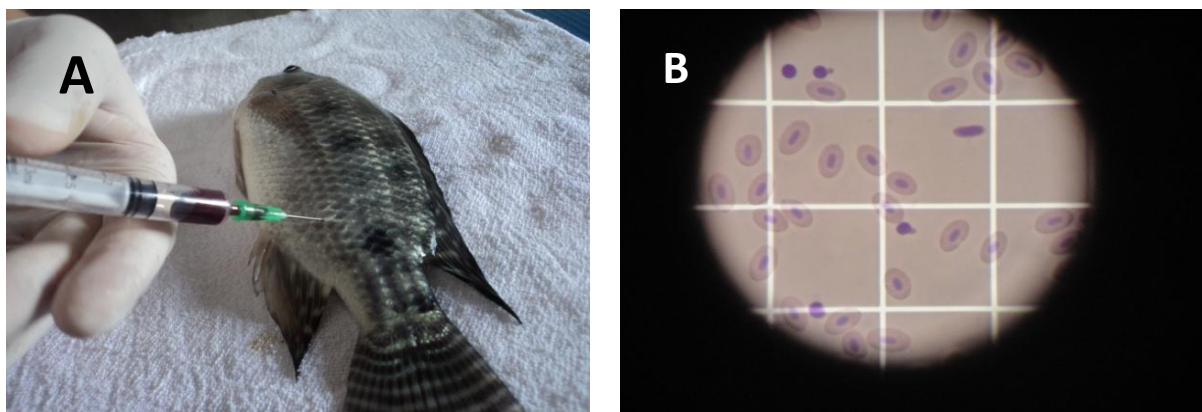


Figura 8. Coleta de amostra de sangue por punção do vaso caudal (A) em Tilápias Tilápias do Nilo - *Oreochromis niloticus*. Determinação da contagem global de células sanguíneas realizadas em câmara de Neubauer (B) durante estudo da administração do cetoconazol sobre o efeito glicocorticóide em Tilápias do Nilo. FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017

4.9. Avaliação da atividade respiratória dos leucócitos (burst respiratório)

O sangue coletado para as análises hematológicas e bioquímicas também foi utilizado para a análise da atividade respiratória dos leucócitos (burst respiratório), segundo o protocolo de Anderson e Siwichi (1995) modificado por Biller (2008). O método consistiu em determinar as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo burst respiratório por meio do ensaio colorimétrico baseado na redução do corante Nitroblue Tetrazolium (NBT) que formam grânulos de formazan, que são precipitados de material insolúvel e apresentam coloração escuro no interior dos fagócitos (KLEIN, 1990). Uma alíquota de 0,1 mL de sangue heparinizado foi colocado em tubos com 0,1 mL de NBT (Sigma, St.Louis, MO, USA). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 min em 25°C. Após esse período, 50 µL da suspensão formada foi colocada em tubos de ensaio com 1 mL de n,n-dimetil-formamida (DMF< Sigma, St. Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 minutos. O DMF produziu a lise da parede celular dos grânulos de formazan e assim liberaram na solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (SAHOO et al., 2005).

4.10. Determinação das proteínas de fase aguda

O fracionamento eletroforético foi realizado em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A técnica utilizada é descrita por Laemmli (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI-VERTICALELECTROPHORESIS CELLS®- BIO-RAD) com amostra de soro. Para polimerização do gel adicionou 15 µL de tetrametiletilenodiamina e 0,3 µL de persulfato de amônia a 10%. A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão de pH 8,5 constituída de 36,30 g de tris-base, 112,50 g de glicina, 10 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. A parte superior da placa que contém o gel entrou em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10g de SDS, em um litro de água destilada estéril. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando 10 µL de soro sanguíneo diluídos em 30 µL de tampão-fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL das referidas amostras foram depositadas no fosso do gel. A placa foi colocada em suporte apropriado, em contanto com solução tampão com pH 8,5 e submetida à corrente elétrica a 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel foi colocado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uma coloração uniforme e, em seguida, retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentassem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinadas por densitometria computadorizada (SHIMADZU CS-930) através do escaneamento das amostras. Para a identificação das proteínas foram utilizados marcadores (SIGMA MARKER™, wide range, 6,5 a 200 KD) de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 KD, além das proteínas purificadas albumina, alfa-1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e IgG. Para a avaliação densitométrica das bandas protéicas foram feitas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

4.11. Índice Somático

Após a necropsia, fígado e baço foram coletados para avaliação morfométrica que foi realizada de acordo com Weibel et al. (1969), (Figura 9A e 9B) através da proporção entre peso do órgão (PO) e peso corporal (PC), Figura 9C, expressos como índice somático hepático e esplênico calculado pela fórmula: Índice somático (IS) = $PO \times 100/PC$.

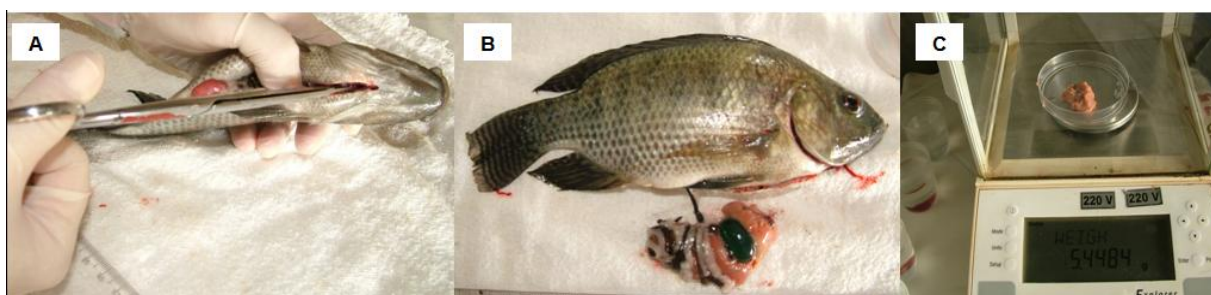


Figura 9. Necropsia em Tilápias do Nilo - *Oreochromis niloticus*. Abertura da cavidade celomática (A), separação dos órgãos (B), e pesagem dos órgãos para cálculo de índice somático (C) realizadas durante estudo da administração do cetoconazol sobre o efeito glicocorticóide em Tilápias do Nilo. FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017.

4.12. Avaliação da bioquímica sérica

Amostras de sangue colhidas sem anticoagulante (conforme item 4.8) foram centrifugadas a 5.000 rpm por cinco minutos para obtenção de soro (Figura 10 A e 10 B). O estudo do bioquímico sérico de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais, albumina, glicose, colesterol, triglicerídeos e foram determinadas enzimaticamente e colorimetricamente em analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest-Bioplus) (Figura 10 C).

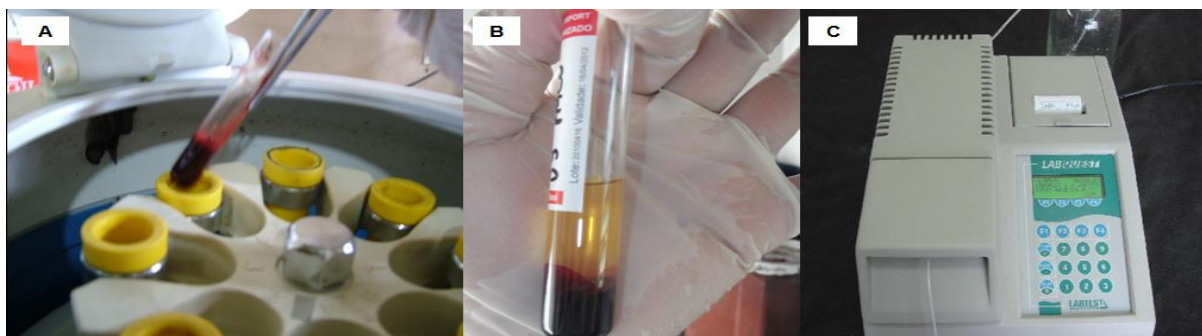


Figura 10. Análise bioquímica sérica do soro sanguíneo de Tilápias do Nilo - *Oreochromis niloticus*. Centrifugação do sangue (A). Dissociação sanguínea (B) e analisador bioquímico Lab Quest (C) utilizado no estudo da administração do cetoconazol sobre o efeito glicocorticoide em Tilápias do Nilo. FCAV- Unesp Jaboticabal, 2017.

4.13. Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância através de delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com parcela subdividida no tempo “Split Plot Design” (2 tratamentos com cetoconazol x 2 tratamentos com dexametazona x 4 tempos), utilizando-se o pacote estatístico SAS, pelo procedimento PROC GLM, versão 8.2 (SAS, 2001). As comparações múltiplas foram aferidas pelo Teste de Tukey ao nível de 99% de confiança, de acordo com Snedecor e Cochran (1974).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do exsudato

O pico de acúmulo celular presente no exsudato ocorreu 24 HPI em todos os grupos experimentais (Figura 11). Porém, não se observou variações significativas no tempo para peixes tratados somente com cetoconazol (CN).

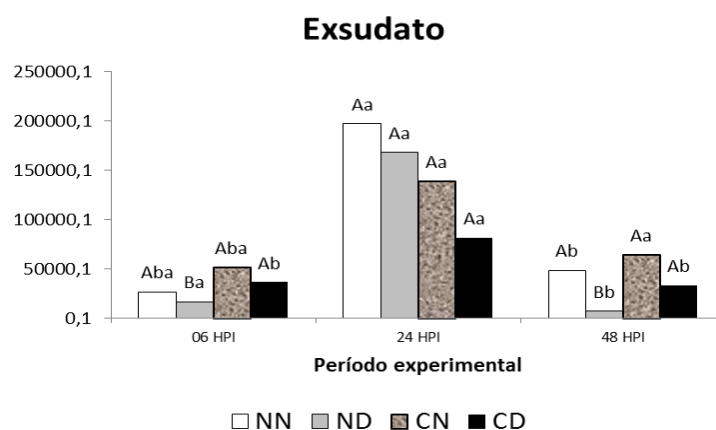


Figura 11. Contagem absoluta do acúmulo celular presente no exsudato da bexiga natatória de tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas hydrophila*. Média (n=7) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T ($P < 0,05$). A análise de variância estatística é representada por letras maiúsculas que comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais. NN (não tratado com cetoconazol e não tratado com dexametasona); ND (tratado com 2m/kg de dexametasona); CN (tratado com 200UI/kg de cetoconazol); CD (tratado com 2 mg/Kg de dexametasona e com 200 UI/Kg de cetoconazol).

Ambos os grupos tratados com dexametasona (ND e CD) apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) no acúmulo celular 48 HPI (Figura 11), entretanto somente no grupo ND houve redução significativa no acúmulo celular na fase mais aguda (6 HPI).

A Tabela 2 apresenta os resultados observados na contagem diferencial relativa de acúmulo celular no foco inflamado.

Tabela 2. Valores médios¹ e ANOVA² observados no estudo da contagem relativa do exsudato de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametasona durante aerocistite por *A. hydrophila*.

Tempo	Tratamento ³	Linfócitos Relativo (%)	Trombócitos Relativo (%)	Granulócitos Relativo (%)	Macrófagos Relativo (%)
06 HPI	NN	2.35 Ab	3.14 Aa	94.14 Aa	0.35 Ab
	ND	2.45 Aa	2.20 ABb	94.65 Aa	0.81 Ab
	CN	2.62 Aab	1.40 Bb	95.58 Aa	0.67 Ab
	CD	1.67 Aa	1.45 Bb	94.72 Aa	2.58 Ab
24 HPI	NN	2.92 Ab	1.50 Bb	90.40 ABa	5.60 Aa
	ND	1.65 Aa	1.28 Bb	91.14 Aa	5.61 Aa
	CN	1.97 Ab	1.97 ABab	86.55 Bb	9.50 Aa
	CD	3.72 Aa	2.55 Aa	87.38 ABb	6.12 Ab
48 HPI	NN	9.97 Aa	2.27 Abab	80.01 Bb	7.77 Ba
	ND	3.75 BCa	3.27 Aa	85.60 Ab	7.60 Ba
	CN	4.87 Ba	2.54 ABa	78.87 Bc	13.90 Aa
	CD	2.24 Ca	2.12 Bab	78.37 Bc	17.41 Aa
C		3.95 *	1.57 NS	6.31 *	14.36 **
D		9.27 **	0.00 NS	1.20 NS	0.76 NS
T		13.67 **	3.98 *	72.32 **	38.24 **
C x D		3.37 NS	0.09 NS	1.64 NS	0.09 NS
D x T		8.33 **	1.14 NS	0.69 NS	1.12 NS
C x T		5.44 **	8.21 **	2.74 NS	4.71 *
C x D x T ⁴		2.10 NS	3.24 *	0.94 NS	1.12 NS
C.V. ⁵		68.93	45.96	4.98	69.62

¹Média (n=7) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05).

²A análise de variância estatística é representada por letras maiúsculas que comparam os diferentes tratamentos experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³NN (não tratado com cetoconazol e não tratado com dexametasona); ND (tratado com 2m/kg de dexametasona); CN (tratado com 200UI/kg de cetoconazol); CD (tratado com 2 mg/Kg de dexametasona e com 200 UI/Kg de cetoconazol).

⁴C (cetoconazol); D (dexametasona); T (tempo). Valor de F com significância estatística: NS (não significativo), *(P<0,05) e ***(P<0,01).

⁵C.V.= Coeficiente de Variação.

Peixes tratado com cetoconazol apresentaram diminuição significativa (P<0,05) na contagem de trombócitos 6 HPI, diminuição significativa (P<0,05) no percentual de granulócitos 24 HPI e aumento significativo (P<0,05) na contagem de macrófagos 48 HPI quando comparados com peixes tratados infectados e não tratados (NN). Peixes tratados apenas com dexametasona apresentaram aumento nas contagens de granulócitos nas fases mais tardias 24 e 48 HPI quando

comparados aos peixes infectados e não tratados (NN) que apresentaram aumento significativo na contagem de linfócitos 48 HPI (Tabela 2).

5.2. Avaliação do hemograma na aerocistite

Na contagem global de eritrócitos (Tabela 3), não observou alterações significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos quando comparados dentro de cada dia experimental. No entanto, o estudo comparativo da evolução de cada tratamento ao longo do tempo revelou que peixes tratados com cetoconazol apresentaram aumento na contagem global de eritrócitos, sendo este aumento verificado 24 HPI para peixes tratados com associação de dexametasona e cetoconazol e 48 HPI para peixes tratados somente com cetoconazol.

O tratamento com cetoconazol resultou em diminuição significativa ($P < 0,05$) dos valores de percentuais de hematócrito 6 e 24 HPI, sendo inclusive muito inferiores aos observados no padrão fisiológico. Na fase inicial do processo inflamatório (6 HPI), ocorreu aumento transitório significativo no VCM de peixes tratados com cetoconazol e dexametasona. No entanto, com a evolução do processo inflamatório ocorreu diminuição significativa ($P < 0,05$) no tamanho das hemácias de peixes tratados somente com cetoconazol (CN) 48 HPI (Tabela 3).

No hemograma das tilápias, observou-se menores valores circulantes de hemoglobina em todos os grupos de peixes infectados em relação ao padrão fisiológico (Tabela 3). Nesta análise vale ressaltar que peixes somente infectados apresentaram diminuição significativa na fase inicial (6 HPI) e foram recuperando os valores circulantes de hemoglobina ao longo do período experimental. Da mesma forma, a análise de CHCM demonstrou significativa diminuição neste grupo controle infectado 6 HPI. Peixes tratados com a associação de dexametasona e cetoconazol também apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) de CHCM 6 HPI.

Tabela 3. Valores médios¹ e ANOVA² observados no estudo da contagem hematológica de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametasona durante aerocistite por *A. hydrophila*.

Tempo	Tratamento ³	Eritrócito (x 10 ⁶ /μL)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	VCM (fl)	CHCM (g/dL)
Padrão Fisiológico		1.99 ± 0.24	39.5 ± 3.2	14.52 ± 1.76	195.5 ± 51.7	37.05 ± 6.35
06 HPI	NN	1.91 Aa	36 ABa	9.65 Ba	196 Ba	26.51 Ba
	ND	2.01 Aa	35 ABa	12.04 Aa	177 Ba	33.62 Aa
	CN	1.82 Ab	33 Ba	12.1 Aa	184 Ba	37.34 Aa
	CD	1.68 Ab	39 Aa	9.98 Bb	236 Aa	25.50 Bb
24 HPI	NN	2.06 Aa	36 ABa	10.88 ABa	184 Aa	30.13 Aa
	ND	2.01 Aa	35 ABa	9.12 Bb	180 Aa	28.71 Aa
	CN	2.01 Ab	32 Ba	9.08 Bb	167 Aa	26.92 Ab
	CD	2.22 Aa	38 Aa	12.27 Aa	173 Ab	32.46 Aa
48 HPI	NN	2.13 Aa	38 Aa	11.28 Aa	181 Aa	29.77 Aa
	ND	2.04 Aa	37 Aa	11.88 Aa	186 Aa	32.92 Aa
	CN	2.34 Aa	34 Aa	13 Aa	148 Bb	36.06 Aab
	CD	2.06 Ab	36 Aa	12.62 Aa	176 Ab	33.68 Aa
C		0.04 NS	0.96 NS	2.55 NS	0.20 NS	1.39 NS
D		0.31 NS	1.84 NS	0.49 NS	2.10 NS	0.00 NS
T		4.04 *	0.31 NS	6.43 **	4.06 *	2.08 NS
C x D		0.13 NS	4.98 *	0.05 NS	4.70 *	4.03 *
D x T		0.68 NS	0.28 NS	0.21 NS	0.45 NS	0.78 NS
C x T		1.62 NS	0.37 NS	0.50 NS	3.05 *	0.44 NS
C x D x T ⁴		0.75 NS	0.62 NS	9.27 **	1.38 NS	6.50 **
C.V. ⁵		1.31	14.64	17.34	19.15	19.65

¹Média (n=7) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05).

²A análise de variância estatística é representada por letras maiúsculas que comparam os diferentes tratamentos experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³NN (não tratado com cetoconazol e não tratado com dexametasona); ND (tratado com 2m/kg de dexametasona); CN (tratado com 200UI/kg de cetoconazol); CD (tratado com 2 mg/Kg de dexametasona e com 200 UI/Kg de cetoconazol).

⁴C (cetoconazol); D (dexametasona); T (tempo). Valor de F com significância estatística: NS (não significativo), *(P<0,05) e ** (P<0,01).

⁵C.V.= Coeficiente de Variação.

5.3. Leucograma e trombograma

Os resultados observados no estudo leucocitário e trombocitário das tilápias estão expressos na Tabela 4. Verifica-se que ocorreu aumento circulante de trombócitos durante todo estudo em animais infectados quando comparados às contagens observadas no padrão fisiológico, exceto peixes tratados somente com cetoconazol que apresentaram trombocitopenia 24 HPI.

Tabela 4. Valores médios¹ e ANOVA² observados no estudo da contagem absoluta de leucócitos e trombócitos no sangue de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametasona durante aerocistite por *A. hydrophila*.

Tempo	Tratamento ³	Trombócitos (/μL)	Leucócitos totais (/μL)	Linfócitos (/μL)	Monócitos (/μL)	Neutrófilos (/μL)
Padrão Fisiológico		7188 ± 3264	47006 ± 3264	37408 ± 5275	848 ± 538	8017 ± 4542
06 HPI	NN	10972 ^{Aa}	25274 ^{Bb}	16307 ^{Ab}	929 ^{Aa}	7931 ^{Ba}
	ND	8950 ^{Aa}	37457 ^{Aa}	21146 ^{Aa}	1251 ^{Aa}	15021 ^{ABa}
	CN	9796 ^{Aa}	42649 ^{Aa}	24596 ^{Aa}	841 ^{Aa}	17093 ^{Aa}
	CD	9989 ^{Aa}	25574 ^{Bb}	16866 ^{Ab}	1020 ^{Aa}	18598 ^{Aa}
24 HPI	NN	10511 ^{Aa}	24497 ^{Bb}	17900 ^{Aa}	429 ^{Ba}	6169 ^{Aa}
	ND	9609 ^{ABa}	40793 ^{Aa}	23753 ^{Aa}	854 ^{Ba}	10680 ^{Aab}
	CN	4374 ^{Ba}	31984 ^{ABa}	24112 ^{Aa}	600 ^{Ba}	7341 ^{Ab}
	CD	14332 ^{Aa}	37517 ^{Abab}	25998 ^{Aa}	2524 ^{Aab}	8995 ^{Ab}
48 HPI	NN	15472 ^{Aa}	38475 ^{Aa}	26489 ^{Aa}	2120 ^{Aa}	9654 ^{Aa}
	ND	10803 ^{Aa}	37609 ^{Aa}	31615 ^{Aa}	667 ^{Ba}	5295 ^{Ab}
	CN	9031 ^{Aa}	49438 ^{Aa}	43002 ^{Ab}	1617 ^{Aa}	8315 ^{Aab}
	CD	14386 ^{Aa}	48301 ^{Aa}	37523 ^{Aa}	3028 ^{Ab}	7644 ^{Ab}
	C	1.43 ^{NS}	1.72 ^{NS}	2.78 ^{NS}	2.06 ^{NS}	1.66 ^{NS}
	D	0.31 ^{NS}	0.55 ^{NS}	0.01 ^{NS}	2.83 ^{NS}	0.07 ^{NS}
	T	0.48 ^{NS}	3.26 [*]	7.51 ^{**}	3.35 [*]	6.56 ^{**}
	C x D	4.67 [*]	5.54 [*]	1.80 ^{NS}	1.92 ^{NS}	0.69 ^{NS}
	D x T	0.82 ^{NS}	1.42 ^{NS}	0.02 ^{NS}	2.96 [*]	2.13 ^{NS}
	C x T	0.02 ^{NS}	0.40 ^{NS}	0.13 ^{NS}	1.65 ^{NS}	0.06 ^{NS}
	C x D x T ⁴	0.53 ^{NS}	2.30 ^{NS}	0.64 ^{NS}	0.15 ^{NS}	2.26 ^{NS}
	C.V. ⁵	9.15	4.18	5.50	30.71	7.39

¹Média (n=7) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05).

²A análise de variância estatística é representada por letras maiúsculas que comparam os diferentes tratamentos experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³NN (não tratado com cetoconazol e não tratado com dexametasona); ND (tratado com 2m/kg de dexametasona); CN (tratado com 200UI/kg de cetoconazol); CD (tratado com 2 mg/Kg de dexametasona e com 200 UI/Kg de cetoconazol).

⁴C (cetoconazol); D (dexametasona); T (tempo). Valor de F com significância estatística: NS (não significativo), *(P<0,05) e **(P<0,01).

⁵C.V.= Coeficiente de Variação.

No estudo leucocitário (Tabela 4), peixes infectados apresentaram diminuição dos valores circulantes de leucócitos quando comparados aos animais do grupo padrão fisiológico, exceto peixes tratados com cetoconazol que apresentaram recuperação das contagens basais 48 HPI. Na comparação entre os grupos, verificou-se que peixes infectados e não tratados (NN) sofreram diminuições significativas (P<0,05) nas contagens de leucócitos 6 e 24 HPI, sendo inclusive estatisticamente significativo a evolução desta resposta no tempo. Este perfil leucocitário dos peixes foi fortemente influenciado pelas contagens de linfócitos circulantes (Tabela 4) que apresentaram a mesma tendência.

O estudo circulante de monócitos revelou aumento diminuição significativa ($P<0,05$) destas células em peixes tratados com dexametasona 48 HPI, enquanto peixes quando se associou o cetoconazol à dexametasona verificou-se aumento significativo de monócitos 24 e 48 HPI (Tabela 4).

As contagens de neutrófilos na fase inicial do processo inflamatório foram fortemente influenciadas pelo tratamento com dexametasona, e principalmente pelo cetoconazol quando comparadas a peixes infectados e não tratados (NN) e ao padrão fisiológico (Tabela 4).

5.4. Bioquímica sérica

Os resultados observados nas análises bioquímicas séricas das tilápias estão expressos na Tabela 5. Tilápias infectadas e não tratadas (NN) apresentaram diminuição transitória significativa ($P<0,05$) dos níveis séricos de colesterol 6 HPI quando comparados aos demais peixes tratados com dexametasona e cetoconazol. Porém os valores circulantes deste lipídio voltaram aos níveis basais 24 e 48 HPI em todos os grupos experimentais.

Peixes infectados apresentaram aumento dos valores séricos de glicose na fase inicial do processo inflamatório 6 HPI quando comparados aos animais do grupo padrão fisiológico (Tabela 5). Na comparação entre os animais infectados, observou-se aumento significativo ($P<0,05$) em tilápias tratadas com a associação de cetoconazol e dexametasona. Os valores circulantes de glicose observados nos animais infectados voltaram aos níveis basais 24 e 48 HPI.

A análise da atividade enzimática de ALT revelou aumento significativo em peixes tratados com dexametasona e cetoconazol quando comparados a peixes somente infectados 6 HPI. Com a evolução da reação inflamatória (24 HPI), peixes somente infectados (NN) apresentaram aumento significativo de atividade enzimática sérica de ALT quando comparados aos demais tratamentos.

Aumento da atividade enzimática sérica de fosfatase alcalina foi observado na fase inicial da inflamação (6 HPI) em todos os grupos quando comparadas ao padrão fisiológico (Tabela 5). Na comparação entre os peixes infectados, verificou-

se aumento significativo fosfatase alcalina em peixes tratados com cetoconazol 48 HPI.

Tabela 5. Valores médios¹ e ANOVA² observados no estudo da contagem absoluta do bioquímico sanguíneo de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametasona durante aerocistite por *A. hydrophila*.

Tempo	Tratamento ³	Colesterol (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	ALT (U/L)	FA (U/L)
Padrão Fisiológico		152.57 ± 19.12	50.42 ± 7.93	23 ± 15.45	30.83 ± 15.14
06 HPI	NN	112 Bb	88 ABa	22 Aa	53 Aa
	ND	150 Aa	96 ABa	62 Aa	43 Aa
	CN	143 Aa	80 Ba	62 Aa	40 Aa
	CD	143 Aa	104 Aa	89 Aa	60 Aa
24 HPI	NN	156 Aa	59 Ab	114 Ab	22 Aa
	ND	167 Aa	67 Ab	58 Ba	34 Aa
	CN	165 Aa	57 Ab	13 Ba	32 Aa
	CD	157 Aa	61 Ab	45 Ba	46 Aa
48 HPI	NN	146 Aa	65 Aa	22 Aa	18 Ba
	ND	160 Aa	65 Ab	19 Aa	27 Ba
	CN	170 Aa	65 Aa	78 Aa	64 Aa
	CD	154 Aa	74 Ab	13 Ab	25 Ba
C		1.09 NS	0.00 NS	0.00 NS	1.95 NS
D		1.14 NS	3.32 NS	0.09 NS	0.02 NS
T		5.80 **	15.79 **	1.45 NS	1.55 NS
C x D		5.23 *	0.47 NS	0.04 NS	0.09 NS
D x T		1.00 NS	0.61 NS	2.15 NS	1.11 NS
C x T		0.33 NS	0.26 NS	5.28 **	0.52 NS
C x D x T ⁴		0.18 NS	0.36 NS	2.92 NS	1.95 NS
C.V. ⁵		18.82	29.67	92.92	92.71

¹Média (n=7) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05).

²A análise de variância estatística é representada por letras maiúsculas que comparam os diferentes tratamentos experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³NN (não tratado com cetoconazol e não tratado com dexametasona); ND (tratado com 2m/kg de dexametasona); CN (tratado com 200UI/kg de cetoconazol); CD (tratado com 2 mg/Kg de dexametasona e com 200 UI/Kg de cetoconazol).

⁴C (cetoconazol); D (dexametasona); T (tempo). Valor de F com significância estatística: NS (não significativo), *(P<0,05) e ***(P<0,01).

⁵C.V.= Coeficiente de Variação.

5.4. Proteinograma

O proteinograma das tilápias revelou diminuição nos valores séricos de proteínas totais em peixes infectados e não tratados (NN) na fase inicial do processo inflamatório 6 HPI. Tais achados foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando comparados a peixes infectados e tratados com a associação de dexametasona e cetococanazol (Tabela 6).

Não se observou alterações significativas nos valores séricos de albumina entre os diferentes grupos de animais infectados e também quando comparados aos valores observados no padrão fisiológico (Tabela 6). Variações significativas ($P < 0,05$) nos níveis de albumina foram observadas somente na evolução do tratamento com cetoconazol (CN), pois peixes apresentaram diminuição transitória dos valores circulantes com 24 HPI.

Peixes infectados apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) nos valores circulantes de globulinas na fase inicial 6 HPI, exceto tilápias tratadas com a associação de cetoconazol e dexametasona (Tabela 6). Com a evolução do processo infeccioso (24 e 48 HPI), os valores séricos de globulinas voltaram aos níveis basais observados nos animais do padrão fisiológico.

Tilápias infectadas e não tratadas (NN) apresentaram diminuição significativa nos valores séricos de ceruloplasmina 6 HPI quando comparadas aos peixes tratados com a associação de dexametasona e cetoconazol (Tabela 6). Com 24 HPI, peixes somente infectados apresentaram aumento dos valores séricos de ceruloplasmina, sendo estatisticamente significante ($P < 0,05$) quando comparados aos demais grupos de peixes infectados e tratados.

A análise da transferrina revelou que peixes tratados com dexametasona apresentaram diminuição nos níveis séricos circulantes na fase inicial 6 HPI. Com a evolução da resposta de defesa (24 HPI), ocorreu aumento significativo desta proteína em peixes tratados dexametasona quando comparados a peixes somente infectados (Tabela 6).

O estímulo infeccioso com *A. hydrophila* resultou em aumento circulante de haptoglobina (Tabela 6) quando comparados aos valores observados nos peixes do grupo padrão fisiológico, porém na fase inicial do processo de defesa com 6 HPI,

peixes tratados com cetoconazol apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) de haptoglobina quando comparados aos animais tratados com dexametasona (DN) ou somente infectados (NN).

Tabela 6. Valores médios¹ e ANOVA² observados no estudo da análise somática das proteínas de fase aguda de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametasona durante aerocistite por *A. hydrophila*.

Tempo	Tratamento ³	PPT (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina ⁴ (g/dL)	CERU (UI/dL)	TRANS (mg/dL)	HAPTO (mgHBC/dL)
Padrão Fisiológico		2.91 ± 0.50	0.89 ± 0.18	2.01 ± 0.38	0.042 ± 0.031	0.046 ± 0.015	0.071 ± 0.032
06 HPI	NN	2.62 Ba	0.89 Aa	1.89 Ba	0.017 Bb	0.042 Aa	0.072 Ba
	ND	3.01 ABa	0.93 Aa	1.78 Bb	0.049 ABa	0.016 Ab	0.050 Bb
	CN	2.82 ABa	0.99 Aa	1.83 Ba	0.072 ABa	0.021 Ab	0.112 ABa
	CD	3.25 Aa	0.81 Aa	2.44 Aa	0.121 Aa	0.048 Aa	0.172 Aa
24 HPI	NN	3.02 Aa	0.94 Aa	2.08 Aa	0.091 Aa	0.029 Ba	0.091 Aa
	ND	3.21 Aa	0.89 Aa	2.31 Aa	0.034 Ba	0.060 Aa	0.125 Aa
	CN	2.78 Aa	0.76 Ab	2.02 Aa	0.020 Ba	0.053 ABab	0.133 Aa
	CD	3.12 Aa	0.83 Aa	2.29 Aa	0.025 Bb	0.054 ABa	0.135 Aa
48 HPI	NN	2.85 Aa	0.81 Aa	2.04 Aa	0.055 Aab	0.056 Aa	0.125 Aa
	ND	2.81 Aa	0.80 Aa	2.00 Aab	0.014 Aa	0.080 Aa	0.091 Aab
	CN	3.18 Aa	0.94 Aab	2.29 Aa	0.045 Aa	0.063 Aa	0.116 Aa
	CD	3.18 Aa	0.99 Aa	2.19 Aa	0.050 Ab	0.053 Aa	0.150 Aa
	C	1.38 NS	0.05 NS	1.89 NS	0.81 NS	0.05 NS	9.16 **
	D	3.55 NS	0.06 NS	2.33 NS	0.01 NS	1.12 NS	0.70 NS
	T	0.30 NS	0.36 NS	1.16 NS	1.13 NS	5.29 **	0.63 NS
	C x D	0.12 NS	0.02 NS	1.53 NS	2.43 NS	0.05 NS	1.87 NS
	D x T	1.20 NS	0.35 NS	0.82 NS	2.06 NS	0.40 NS	0.21 NS
	C x T	1.82 NS	2.96 *	0.90 NS	4.84 **	0.76 NS	1.37 NS
	C x D x T ⁵	0.03 NS	1.10 NS	1.14 NS	0.21 NS	3.07 *	1.72 NS
C.V. ⁶		17.52	24.58	22.08	112.74	56.91	48.81

¹Média (n=7) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T ($P < 0,05$).

²A análise de variância estatística é representada por letras maiúsculas que comparam os diferentes tratamentos experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³NN (não tratado com cetoconazol e não tratado com dexametasona); ND (tratado com 2m/kg de dexametasona); CN (tratado com 200UI/kg de cetoconazol); CD (tratado com 2 mg/Kg de dexametasona e com 200 UI/Kg de cetoconazol).

⁴Valores estimados obtidos pela fórmula: Globulina= PPT

⁵C (cetoconazol); D (dexametasona); T (tempo). Valor de F com significância estatística: NS (não significativo), * ($P < 0,05$) e ** ($P < 0,01$).

⁶C.V.= Coeficiente de Variação.

CERU = Ceruloplasmina

TRANS = Transferrina

HAPTO = Haptoglobina

5.6. Estudo do índice hepático e esplênico

A avaliação do índice hepatossomático (IHS) demonstrou aumento relativo do tamanho do fígado dos peixes infectados quando comparados aos animais do

padrão fisiológico. Na comparação entre os tratamentos, peixes tratados com dexametasona (ND) e somente infectados (NN) apresentaram recuperação do tamanho do órgão com 48 HPI, apresentando valores próximos aos observados nos peixes do padrão fisiológico. A análise nefrossomática (IES) não apresentou variações significativas ($P>0,05$) ao longo do estudo na comparação entre os tratamentos e quando comparados ao valores basais observados no padrão fisiológico.

Tabela 7. Valores médios¹ e ANOVA² observados no estudo da análise somática hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias tratadas ou não com cetoconazol e/ou dexametasona durante aerocistite por *A. hydrophila*.

Tempo	Tratamento ³	IHS %	IES %
Padrão Fisiológico		1.04 ± 0.23	0.093 ± 0.04
06 HPI	NN	1.51 Aa	0.111 Aa
	ND	1.99 Aa	0.103 Aa
	CN	1.49 Aa	0.104 Aa
	CD	1.75 Aa	0.076 Aa
24 HPI	NN	1.69 Aa	0.092 Aa
	ND	1.52 Aa	0.080 Aa
	CN	1.40 Aa	0.107 Aa
	CD	1.52 Aa	0.096 Aa
48 HPI	NN	1.15 Ba	0.059 Aa
	ND	1.20 Bb	0.089 Aa
	CN	1.30 ABa	0.116 Aa
	CD	1.75 Aa	0.116 Aa
C		0.05 NS	1.10 NS
D		3.73 *	0.14 NS
T		3.57 *	0.05 NS
C x D		0.58 NS	0.41 NS
D x T		1.30 NS	0.60 NS
C x T		2.54 NS	1.75 NS
C x D x T ⁴		0.87 NS	0.13 NS
C.V. ⁵		25.98	52.07

¹Média (n=7) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T ($P<0,05$).

²A análise de variância estatística é representada por letras maiúsculas que comparam os diferentes tratamentos experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³NN (não tratado com cetoconazol e não tratado com dexametasona); ND (tratado com 2m/kg de dexametasona); CN (tratado com 200UI/kg de cetoconazol); CD (tratado com 2 mg/Kg de dexametasona e com 200 UI/Kg de cetoconazol).

⁴C (cetoconazol); D (dexametasona); T (tempo). Valor de F com significância estatística: NS (não significativo), *($P < 0,05$) e **($P < 0,01$).

⁵C.V.= Coeficiente de Variação.

IHS - Índice hepatossomático IES - Índice esplenossomático

5.7. Burst oxidativo

Os resultados da análise atividade respiratória dos leucócitos revelaram diminuição dos valores após o estímulo infeccioso, ocorrendo recuperação ao longo do estudo (Figura 12). O estudo da evolução dos tratamentos no tempo demonstrou que peixes tratados com cetoconazol não apresentaram variações significativas na quantidade de ROS produzidos durante os três períodos analisados.

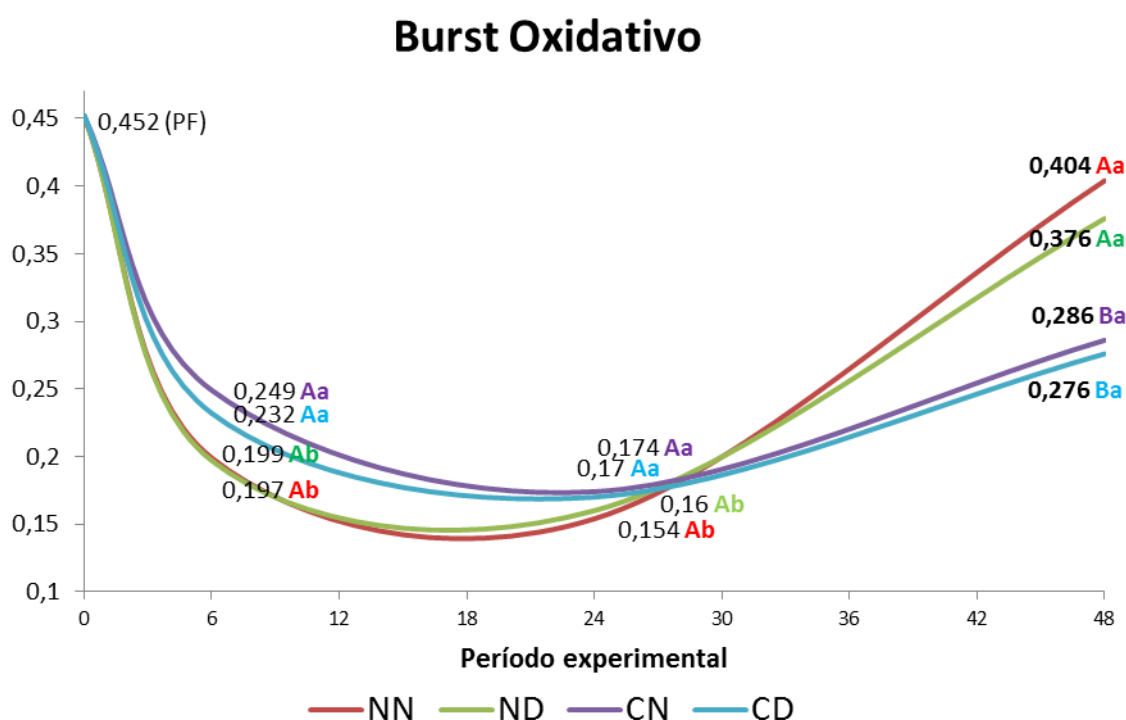


Figura 12. Valores médios (ANOVA) observados na produção de espécies de oxigênio reativos (ROS) em tilápias infectadas com *Aeromonas hydrophila* e tratadas com dexametasona e/ou cetoconazol. Média (n=7) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T ($P < 0,05$). A análise de variância estatística é representada por letras maiúsculas que comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais. NN (não tratado com cetoconazol e não tratado com dexametasona); ND (tratado com 2m/kg de dexametasona); CN (tratado com 200UI/kg de cetoconazol); CD (tratado

com 2 mg/Kg de dexametasona e com 200 UI/Kg de cetoconazol). PF (padrão fisiológico $0,452 \pm 0,061$).

Enquanto, peixes tratados com dexametasona (ND) e somente infectados apresentaram recuperação dos níveis basais 48HPI (Figura 12), com valores muito próximos aos observados em animais do grupo padrão fisiológico, sendo estes significativamente superiores aos observados nos animais tratados com cetoconazol (CN e CD).

6. DISCUSSÃO

A avaliação do acúmulo celular do foco inflamatório demonstrou ser maior em 24 HPI após indução do processo por *A. hydrophila* com redução do acúmulo de células 48 horas após, corroborando os achados de Claudiano et al. (2013), Moraes (2014), Castro et al. (2014) e Prado (2014) que verificaram um acúmulo progressivo de células inflamatórias em bexiga natatória no tempo de 24 horas pós inoculação por *A. hydrophila* em tilápias do Nilo. Endo et al. (1997) verificaram predominância significativa nas populações de neutrófilos na fase mais aguda da aerocistite infecciosa. Enquanto, Bozzo et al. (2007) observaram maior participação de trombócitos na análise do processo inflamatório induzido por *A. hydrophila* em *P. mesopotamicus*.

A indução do processo inflamatório nas tilápias foi determinada pela inoculação de *A. hydrophila* viva na bexiga natatória dos peixes, favorecendo os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na quimiotaxia e recrutamento de leucócitos no sangue, assim como seu acúmulo no foco inflamado, permitindo avaliar os efeitos modulatórios dos tratamentos com cetoconazol e dexametsona. Os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) favorecem o estímulo de respostas induzidas por neutrófilos no organismo mediadas por fatores do complemento como C5a, e em menor grau, para leucotrienos B4 e fatores ativadores de plaquetas (FITTSCHEEN et al., 1988). De acordo com Nolasco (2013), o LPS das bactérias gram-negativas exerce um papel preponderante na amplificação e ativação da resposta inflamatória, favorece a participação de proteínas da fase aguda, formando um complexo mais

ativo que liga-se ao CD14, expresso por monócitos e macrófagos. Lewis et al (2012) afirma que há dois faros que explicam a rapidez com o qual o sistema imune inato responde à invasão de patógenos. O primeiro associado à presença de receptores, como os TLR, que reconhecem alguns marcadores de microrganismos como o LPS, e o segundo seria a vasta distribuição destes receptores em células de defesa (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos).

No exsudato das tilápias verificou-se maior acúmulo de granulócitos em todos os períodos analisados, sendo o maior percentual observado na fase inicial do processo inflamatório com 6 horas após a inoculação da *Aeromonas hydrophila*. O principal granulócito que migra para o foco inflamado é o neutrófilo. Os resultados observados no exsudato apresentam correlação ao aumento significativo de neutrófilos observados no leucograma nesta mesma fase do processo inflamatório principalmente em peixes tratados com cetoconazol. Os neutrófilos são células de defesa diferenciadas e abundantes que circulam no sangue e que apresentam atividade fagocítica. São atraídos para o foco inflamado por um gradiente quimiotático (BRINKMANN et al., 2004; PIETERSE et al., 2016). De acordo com Wright et al. (2010) e Kolaczowska e Kubis (2013), neutrófilos são células de defesa resistentes encontradas em quantidades elevadas nos locais da inflamação, uma vez que possuem um enorme potencial para implicar diretamente danos aos tecidos através da secreção de proteases e metabolitos tóxicos de oxigênio, como também, de dirigir-se para a inflamação através da apresentação de antígenos e secreção de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e leucotrienos.

Tilápias tratadas com cetoconazol apresentaram diminuição significativa da quantidade de granulócitos acumulados no exsudato na fase mais tardia com 48 horas, quando comparadas aos peixes do grupo apenas infectados ou tratados com dexametasona. Tais resultados parecem estar associados ao fato deste derivado do imidazol favorecer o acúmulo de macrófagos na fase mais tardia da inflamação. O estudo leucocitário corrobora tais achados, pois peixes tratados com cetoconazol apresentaram aumento significativo de monócitos no sangue circulante nesta fase da reação inflamatória. Assim como mamíferos, peixes apresentam aumento da participação de macrófagos nas fases mais tardias da resposta inflamatória, sendo esta célula derivadas de monócitos circulantes que se diferenciam em macrófagos

após o processo de diapedese (BELO, 2002; SAKABE et al., 2013; BELO et al., 2014; MANRIQUE et al., 2015a,b; JERÔNIMO et al., 2016).

Tilápias tratadas com dexametasona apresentaram diminuição significativa nas contagens de monócitos no sangue 48 após o estímulo inflamatório, acompanhado de diminuição de macrófagos e linfócitos presentes no foco inflamado. Tais achados corroboram alterações inflamatórias observadas por BELO et al. (2005; 2012) em pacus, pois os elevados níveis de cortisol resultaram em supressão do acúmulo de macrófagos e da formação de gigantócitos em resposta inflamatória tipo corpo estranho. Contudo, estudos demonstraram que a dexametasona revelou ser bastante eficaz na redução da inflamação. Este glicocorticóide interfere em vários fenômenos da inflamação, como na redução da tenascina-C, proteína presente na matriz extracelular de tecido lesionados que atua na adesão e migração celular, além de, reduzir a expressão endotelial das moléculas de adesão intracelular, fatores que dificultam a migração leucocitária ((BOUMPAS et al., 1993; MARCHIONNI et al., 2006; SHI et al., 2016).

Os trombócitos participam dos mecanismos de coagulação sanguínea e auxiliam no processo de restauração da integridade do endotélio vascular na área da lesão (BELO et al., 2013). Tilápias tratadas com cetoconazol apresentaram diminuição significativa do acúmulo de trombócitos no sítio inflamado na fase mais aguda da reação (6 HPI). Estes animais apresentaram trombocitopenia e aumento do acúmulo de trombócitos no exsudato 24 horas após a indução do processo inflamatório, demonstrando a influência deste derivado do imidazol sobre a dinâmica de participação desta célula branca na defesa da tilápia. O trombograma revelou aumento dos níveis circulantes de trombócitos na fase mais tardia com 48 horas de evolução da reação inflamatória, corroborando os achados de Stokes e Granger (2012); Pankratz et al (2016). De acordo com Tavares-Dias et al. (2007) e Castro et al. (2014a,b), os trombócitos de peixes teleósteos, além de participarem do processo de coagulação sanguínea, representam um elo entre a imunidade inata e adaptativa, ocorrendo mobilização destas células para participar dos mecanismos de defesa orgânica.

Durante a infecção com *Aeromonas hydrophila*, tilápias apresentaram significativa diminuição da produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) nas

fases iniciais da reação inflamatória, possivelmente associado à exsudação celular para o foco inflamado. O incremento do “burst oxidativo” por leucócitos está associado principalmente ao aumento de atividade respiratória de monócitos e neutrófilos na circulação. Farias et al. (2016a) verificaram correlação positiva entre o aumento do número circulante de monócitos e neutrófilos à produção de ROS em tilápias durante infecção por *A. hydrophila*. Tilápias tratadas com cetoconazol não apresentaram variações significativas ao longo do estudo, resultados da baixa atividade oxidativa observada 48 horas após a indução da infecção. Giltinan et al. (1986) verificaram que o cetoconazol apresentou efeitos inibitórios sobre o burst oxidativo em experimentos com células de baço de camundongo *in vitro*. Enquanto peixes tratados com dexametasona apresentaram nesta fase da reação inflamatória recuperação dos níveis basais da produção de ROS, possivelmente associado à baixa exsudação celular para o foco inflamado.

Peixes tratados com cetoconazol apresentaram aumento dos níveis séricos de ceruloplasmina e haptoglobina na fase inicial do processo inflamatório (6 HPI), sendo estatisticamente superiores aos animais somente infectados quando associado à dexametasona, em peixes somente infectados e não tratados o incremento da ceruloplasmina só ocorreu 24 horas após o estímulo inflamatório. A ceruloplasmina é uma enzima sintetizada no fígado, contendo seis átomos de cobre na sua estrutura, tem função de oxidar o ferro de Fe^{2+} (ferroso) em Fe^{3+} (férico), auxiliando assim seu transporte no plasma em pela transferrina, que transporta ferro somente no estado férico (SONG & DUNAIEF, 2013). A análise de transferrina demonstrou que peixes tratados com dexametasona e/ou cetoconazol apresentaram elevados níveis desta proteína 24 horas após o estímulo, diferentemente de peixes controles infectados, corroborando os achados da ceruloplasmina. Pois ambas as proteínas atuam no controle das concentrações de ferro circulantes no organismo, tendo em vista que o sequestro deste íon representa uma estratégia de defesa do organismo para diminuir a disponibilidade para a replicação bacteriana (GANZ & NEMETH, 2015).

O aumento de haptoglobina ocorreu primariamente em peixes tratados com cetoconazol, porém os seus níveis foram elevados em todos os grupos 24 e 48 após a inoculação de *A. hydrophila* quando comparados aos animais controles do grupo

padrão fisiológico. Esta proteína de fase aguda se liga a hemoglobina livre facilitando que enzimas degradativas tenham acesso à hemoglobina e, ao mesmo tempo, evitando a perda de ferro através dos rins e protegendo os rins de danos causados pela hemoglobina (WASSELL, 2000). A haptoglobina é produzida principalmente por células hepáticas, mas também em outros tecidos, como pele, rim e no adipócito (SAREMI et al., 2012). A aeromonose induz septicemia hemorrágica, resultando em destruição eritrocitária, fato que justificaria o aumento de haptoglobina em todos os animais infectados. O aumento de haptoglobina na fase inicial da infecção (6 HPI) em peixes tratados com cetoconazol, corroboram os achados do estudo hematológico que demonstrou diminuição do número de eritrócitos nestes animais.

O tratamento com cetoconazol resultou em diminuição dos valores percentuais de hematócrito, associado à diminuição do volume corpuscular das hemácias. Tais resultados foram amenizados quando os peixes foram tratados simultaneamente com dexametasona. De acordo com Belo (2006), Clauss et al. (2008) e Faria et al. (2016b), as alterações microcíticas com diminuição dos valores de hematócrito e CHCM ocorrem em casos de deficiência de ferro ou anemia por alterações na síntese de hemoglobina (talassemias), corroborando os achados observados no aumento das proteínas de fase aguda ceruloplasmina e haptoglobina que participam do sequestro deste íon circulante.

As tilápias tratadas com cetoconazol durante aerocistite infecciosa apresentaram níveis de colesterol semelhantes aos observados nos peixes do grupo padrão fisiológico. Diferentemente, Miettinen (1988) e Dang e Trainer (2007) relataram que o uso de cetoconazol para tratamento de super produção da adrenal ou gonadal, pode ser eficaz também para diminuição dos níveis de colesterol no soro, porque interferem na síntese do colesterol através da inibição 14 α -desmetilação da síntese de colesterol, podendo ser usado para tratamento de hipercolesterolemia. Liberman (2003) afirma que o cetoconazol é um bloqueador da síntese de colesterol, podendo reduzir os níveis de colesterol circulantes.

O cetoconazol possui alguns efeitos adversos. O principal e mais reconhecido é a sua hepatotoxicidade. Embora geralmente varie de leve a moderada, há riscos de insuficiência hepática grave em pacientes que fazem uso desta medicação (BURNS et al., 2016). A hepatotoxicidade pode ser previsível ou

imprevisível. As reações previsíveis normalmente são doses relacionadas, isto é, ocorrer na maioria das pessoas que ingerem a medicação e logo após atingem o limiar para toxicidade. Por outro lado, reações adversas ocorrem sem aviso, e não estão relacionadas à dose, podendo ter período de latência variável de dias a 12 meses (NAVARRO, SENIOR, 2006).

Tilápias tratadas com cetoconazol e dexametasona apresentaram aumento de ALT e fosfatase alcalina na fase inicial da infecção, e níveis elevados destas enzimas 48 após a indução da infecção foram observados em animais somente tratados com cetoconazol, possivelmente alterações transitórias resultantes do processo de degradação hepática destes compostos. O efeito do tratamento contínuo com cetoconazol provoca alteração na produção das atividades das enzimas hepáticas levando a um quadro assintomático de necrose hepática aguda que pode ser fatal (OUTEIRO, HOHMANN, MIKUS, 2016). Conforme Janssen & Symoens (1983), alterações nas enzimas hepáticas com aumento assintomático dos níveis de transaminase ou fosfatase alcalina podem ocorrer durante o tratamento com cetoconazol em pacientes humanos, principalmente durante os primeiros meses de tratamento. O primeiro relato descrito em literatura da toxidade hepática com o uso do cetoconazol ocorreu na década de 90 em uma mulher jovem portadora do vírus da AIDS que recebia terapia de manutenção com cetoconazol para a meningite criptocócica. Os autores relatam um aumento do fígado, com bastante infiltração gordurosa (GRADON & SEPKOWITZ, 1990).

No presente estudo, as tilápias tratadas com cetoconazol e dexametasona apresentaram aumento do IHS (Índice hepatossomático) em relação aos demais grupos e ao padrão fisiológico. Vinodraj et al. (2015) relatou hepatomegalia, associada a esteatose hepática, dislipidemia e hiperglicemia em ratos albinos após o uso da dexametasona.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da administração exógena de cetoconazol sobre a resposta glicocorticoide de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, durante aerocistite infecciosa por *Aeromonas hydrophila* permite extrair as seguintes inferências:

- Na fase inicial da infecção (6HPI), o tratamento subcutâneo das tilápias com 200 UI-kg^{-1} de cetoconazol resultou em atividade pró-inflamatória caracterizada pelo aumento do acúmulo de granulócitos e diminuição de trombócitos no exsudato, associado à neutrofilia e aumento dos níveis séricos de haptoglobina e ceruloplasmina.
- No quadro eritrocitário inicial de tilápias tratadas com cetoconazol, observou-se diminuição do número de hemácias com diminuição do hematócrito e do volume corpuscular médio, caracterizando alterações microcíticas comuns em deficiências por ferro, corroborando os aumentos observados nos níveis séricos das proteínas de fase aguda haptoglobina e ceruloplasmina.
- No pico de exsudação celular para o foco inflamado 24 HPI, tilápias tratadas com cetoconazol apresentaram aumento do acúmulo de trombócitos associado à trombocitopenia e aumento dos níveis séricos de transferrina.
- Na fase tardia da infecção (48 HPI), o tratamento subcutâneo das tilápias com 200 UI-kg^{-1} de cetoconazol resultou em atividade pró-inflamatória caracterizada pelo aumento do acúmulo de macrófagos no exsudato associado ao quadro de monocitose, porém com diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio na atividade respiratória leucocitária.

8. REFERÊNCIAS³

ABEYTA JÚNIOR, C., KAYSNER, C.A., WEKEL, M.M. et al. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. **Journal food protection**, v.49, p.643-646, 1986.

ADAMS-CHAPMAN, I.; STOLL, B. J. Systemic Inflammatory Response Syndrome. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 5-16, 2001.

ALHURA, F.V.; BRASIL, M. A. A. O papel dos glicocorticóides na expressão dos sintomas de humor- uma revisão. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**. v. 27, n. 2, p.177-186, 2005.

ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K. Basic hematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J. R.; SUBASINGLE, R. P. (Ed.). **Diseases in Asian Aquaculture II. Manilla: Fish Health Section**, Asian Fisheries Society, p. 185-202, 1995.

ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. Editora Roca LTDA. 2. ed. 2002. p. 67.

ARAÚJO, C. S. O.; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; LEMOS, J. R. G.; OLIVEIRA, A. T.; RIBEIRO CRUZ, W. R.; AFONSO, E. A. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* SCHINZ, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). **Manejo e Sanidade de peixes em cultivo**. Embrapa Amapá, Macapá. p. 389-424, 2009.

BABIOR, B.M. The Respiratory Burst Oxidase. **Molecular Aspects of Inflammation**. v. 42, p. 41-47, 1991.

BACHMANN, P. A.; AHNE, W. Isolation and characterization of Agent causing swim bladder inflammation in carp. **Nature**, v. 244, p. 235-237. 1973.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3º ed. Editora: UFSM. Santa Maria. 2013.

³ Normalizada de acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS -ABNT-NR6023/ 2017 e as diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses. Unesp- *campus* de Jaboticabal, 2016.

BARTON, B.A.; SCHERECK, C.B.; BARTON, L.D. Effect of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions and stress responses in juvenile rainbow trout. **Disease of Aquatic Organisms**. v.2, p. 173-185, 1987.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Disease**. v.1, p. 3-26, 1991.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**. v.42, p. 517-525, 2002.

BELO, M.A.A. **Efeito do estresse por superpopulação e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. Dissertação de Mestrado: Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - FCAV - UNESP - Jaboticabal, 76p., 2002.

BELO, M.A.A. **Recrutamento de macrófago e formação de gigantócitos em *Oreochromis niloticus*, submetidas a diferentes estímulos moduladores**. Tese de Doutorado: Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - FCAV - UNESP - Jaboticabal, 146p., 2006.

BELO, M. A. A.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; CARDOSO, F.; MARINELLI, L. A.; GAGLIARDI, P.C.; MOTA, F. C. D.; PILARSKI, F. Somatic response of tilapia treated with exogenous corticosteroid during acute inflammatory process induced by *Aeromonas hydrophila*. **World Aquaculture Society**, Natal, Brasil, 2011. Disponível em: <[tps://www.was.org/WasMeetings/meetings/mobile/MG_Paprr.aspx?i=24808](https://www.was.org/WasMeetings/meetings/mobile/MG_Paprr.aspx?i=24808)>.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 146-154, 2005.

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

BELO, M. A. A.; SOARES, V. E. ; SOUZA, L. M. ; SOBREIRA, M. F. R. ; CASSOL, D. M. S. ; TOMA, S. B. . Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology** , v. 64, p. 155-165, 2012.

BELO, M. A. A.; SOUZA, D. G. F. ; FARIA, V.P. ; PRADO, E. J. R. ; MORAES, F. R. ; ONAKA, E. M. . Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus* , naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of Fish Biology**, v. 82, p. n/a-1403-1410, 2013.

BILLER, J. D. **Respostas fisio-patológica as e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com dieta suplementada com 1,3 β -glucano.** 2008. 114 f. Dissertação - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

BILLER-TAKAHASHI JD, TAKAHASHI LS, SAITA MV, GIMBO RY, URBINATI EC. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**. 73(2):425-429, 2013.

BLY, J. E.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. **Developmental and Comparative Immunology** . v.14, p. 211–221, 1990.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**. v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

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.

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

BOZZO, F. R. **Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativa e tioglicola em *Piaractus mesopotamicus* suplementados com vitamina C, E ou sua**

associação. Jaboticabal, 2007. 78 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária.

BRANDÃO, F.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante praticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, 36: 349-356, 2006.

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

BURNS, K.; DAVID-CHRISTIE, D.; GUNTON, J. E. Fluconazole in the treatment of Cushing's disease. **Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports**. Fev. 2016.

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

CASTRO, M.P. **Desempenho Produtivo e resposta inflamatória de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), alimentado com dieta suplementada com cromo trivalente**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.

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

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

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, p. 85-99, 2005.

CHAO, J.; VIETS, Z.; DONHAM, P.; WOOD, J. G.; GONZALEZ, N. C. Dexamethasone blocks the systemic inflammation of alveolar hypoxia at several sites in the inflammatory cascade. **America Journal of Physiological - Heart and circulatory physiology**. v. 303, p. 168-177, 2012.

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.

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

CIDLOWSKI, J. A.; KING, K. L.; EVANS-STORMS, R. B.; MONTAGUE, J. W., BORTNER, C. D.; HUGHES, F. M. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. **Recent Progress in Hormone Research**. v.51, p.457-491, 1996.

CENTENO, L.; SILVA-ACUÑA, R.; BARRIOS, R.; LUGO, R.S.; MATUTE, C.; PÉREZ, J.L. Hematological characteristics of cachama (*Colossoma macropomum*) in three phases of the growth in Delta Amacuro, Venezuela. **Zootecnia Tropical**, 25: 237-243 (In Spanish, with abstract in English), 2007.

CUEVAS-RAMOS, D.; LIM, D. S. T.; FLESERIU, M. Update on medical treatment for Cushing's disease. **Clinical Diabetes and Endocrinology**. v. 2, n. 16, p. 1-13, 2016. DANG, N. C.; TRAINER, P. Pharmacological Management of Cushing's Syndrome An Update. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**. v. 51, n. 8, p. 1339-1348, 2007.

DANNENBERG, A. M. The antiinflammatory effects of glucocorticosteroids. A brief review of the literature. **Inflammation**. v. 3, n. 3, p. 329-343, 1979.

DAVIS, K.B.; TORRANCE, P.; PARKER, N.C.; SUTTLE, M.A. Growth, body composition and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel cattish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of Fish Biology**. v. 27, n. 2, p. 177-184, 1985.

DE ANDRADE BELO, M. A.; DE MORAES, F. R.; YOSHIDA, L.; DA ROSA PRADO, E. J.; DE MORAES, J. R. E.; SOARES, V. E.; DA SILVA, M. G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. **Aquaculture** , v. 422-23, p. 124-128, 2014.

DESHMUKH, V. K.; RAMAN, P. H.; DHULEY, J. N.; NAIK, S. R.; Role of ceruloplasmin in inflammation: increased serum ceruloplasmin levels during inflammatory conditions and its possible relationsHPI with anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research Communications**. v. 17, n. 7, p. 633-642, 1985.

DIAS, M. K. R.; SAMPAIO, L. S.; PROIETTI-JUNIO, A. A.; YOSHIOKA, E. T. O.; RODRIGUES, D. P.; RODRIGUEZ, A. F. R.; RIBEIRO, R. A.; FARIA, F. S. E. D. V.; OZÓRIO, R. O, p. . A.; TAVARES-DIAS, M. Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. **Veterinary Microbiology**, v. 30, n.188, p. 12-15, 2016.

DHABHAR, F. S.; Mc EWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain, behavior, and Immunity**. v.11, n. 4, p. 286-306, 1997.

DHABHAR, F. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity – the role of stress hormones and leukocyte trafficking. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.917, p.876-893, 2000.

DRUMOND, G. V. F.; CAIXEIRO, A. P. A.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. **Acta Amazonica**. v. 40, n. 3, p. 591-596, 2010.

DONALDSON, E. M.; McBRIDE, J. R. The effects of hypophysectomy in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with special reference to the pituitary-interrenal axis. **General and Comparative Endocrinology**. v. 9, n. 1, p. 93-101, 1967.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**. v. 185, p. 23-27, 2010. ELLSAESSER, C. F.; CLEM, L. W. Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 87, n. 2, p. 405–408, 1987

ENDO, M.; YOSHIDA, T.; SAKAI, M.; IIDA, T. The swin bladder as a site for administration of chemical agents: application to fish immunology. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, p. 85-87, 1995.

ENGELHARDT, D.; JACOB, H.; DOERR, H. G. Different therapeutic efficacy of ketoconazole in patients with Cushing's syndrome. **Klinische Wochenschrift**. v.67, n. 4, p. 241–247, 1989.

ENGELSMA, M.Y.; HOUGEE, S.; NAP, D.; HOFENK, M.; ROMBOUT, J.H.W.M.; van MUISWINKEL, W.B.; LIDY, V-V.; KEMENADE, B.M. Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Fish & Shellfish Immunology**. v.15, n. 5, p.397-410, 2003.

ESPELID, S.; LOKKEN, G. B.; STEIRO, K.; BOGWALD, J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) **Fish & Shellfish Immunology**. v. 6, p. 95-110, 1996.

ESTRADA, J. G.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A. Spectroscopic Study of the Interactions of Ruthenium-Ketoconazole Complexes of Known Antiparasitic Activity with Human Serum Albumin and Apotransferrin. **Journal of the Mexican Chemical Society**. v. 57, n. 3, p. 169-174, 2013.

FARIAS, T. H. V. ; LEVY-PEREIRA, N. ; PADUA, S. B. ; ALVES, L. O. ; Sakabe, R. ; BELO, M. A. A. ; PILARSKI, F. . Na₂EDTA anticoagulant impaired blood samples from the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira** , v. 36, p. 431-435, 2016.

FARIAS, T. H. V.; LEVY-PEREIRA, N.; ALVES, L. O.; DIAS, D. C.; TACHIBANA, L.; PILARSKI, F.; BELO, M. A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology** , v. 211, p. 137-144, 2016.

FAST, M. D.; HOSOYA, S.; JOHNSON, S. C.; AFONSO, L. O.B. Cortisol response and immune-relates effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 24, p. 194-204, 2008.

FEELDERS, R. A.; HOFLAND, L. J. Medical Treatment of Cushing's Disease. The **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 98, n. 2, p. 425-438, 2013.

FELDMAN, E. C. **HPIeradrenocorticismo**. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004. p. 1562.

FITTSCHEN, C.; SANDHAUS, R. A.; WORTHEN, G. S.; HENSON, P. M. Bacterial lipopolysaccharide enhances chemoattractant-induced elastase secretion by human neutrophils. **Journal of leukocyte biology**. v. 43, n. 6, p. 547-556, 1988.

FLESERIU, M. Recent advances in the medical treatment of Cushing's disease. **F1000prime reports**. v. 6, n. 18, p. 1-9, 2014.

FRANCHIMONT, D.; LOUIS, E.; DEWE, W.; MARTENS, H.; VRINDTS-GEVAERT, Y.; De GROOTE, D.; BELAICHE, J.; GEENEN, V. Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures. **Regulatory Peptides**. v. 73, p. 59-65, 1998.

FRENCH, S. S.; McLEMORE, R.; VERNON, B.; JOHNSTON, G. I. H.; MOORE, M. C. Corticosterone modulation of reproductive and immune systems trade-offs in female tree lizards: long-term corticosterone manipulations via injectable gelling material. **The Journal of experimental biology**. v.210, p. 2859-2865, 2007.

GANZ T.; NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nature Review in Immunology**, v.15 (8): 500-510, 2015.

GARCIA-LEME, J. Regulatory mechanisms in inflammation: new aspects of autopharmacology. **General Pharmacology: The Vascular System**. v. 12, p. 15-24, 1981.

GARCIA-LEME, J.; FARSKY, S. P. Hormonal control of inflammatory responses. **Mediators of Inflammation**, n. 2, p. 181-198, 1993.

GILTINAN, D. M.; CAPIZZI, T. P.; ABRUZZO, G. K.; FROMTLING, R. A. Design and analysis considerations in evaluating the chemiluminescence response of mouse spleen cells. **Journal of clinical microbiology**. v. 23, n.3, p. 531-535, 1986.

GRADON, J. D.; SEPKOWITZ, D.V. Massive hepatic enlargement with fatty change associated with ketoconazole. **DICP: The annals of pharmacotherapy**. v. 24, n. 12, p. 1175-1176. 1990.

HADDAD, J. J.; SAADÉ, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of Neuroimmunology**. v. 133, p. 1-19, 2002.

HIGUCHI, H.; KATOH, N.; MIYAMOTO, T.; UCHIDA, E.; YUASA, A.; TAKAHASHI, K. Dexametasona-induced haptoglobin by calf liver parenchymal cells. **America Journal of Veterinary Research**. v. 55, n. 8, p. 1080-1085, 1994.

HOFFMANN-JAGIELSKA, M.; WINNICKA, A.; JAGIELSKI, D.; LECHOWSKI, R. Influence of dexamethasone on some cellular aspects of the immune system in cats. **Veterinary research communications**. v. 27, p. 643-652, 2003.

HONTELA, A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 17, n. 1, p. 44-48, 1998.

HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S. A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**. v. 29. n. 1, p- 7-12, 2000.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, p.118-127, 2011.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinival Microbiology Reviews**. v.23, n. 1, p.35–73, 2010.

JANSSEN, P. A.; SYMOENS, J. E. Hepatic reactions during ketoconazole treatment. **The American journal of medicine**. v. 24, n. 74, 1B, p. 80-85, 1983.

JANSSENS, P.A.; WATERMAN, J. Hormonal regulation of gluconeogenesis and glycogenolysis in carp (*Cyprinus carpio*) liver pieces cultured in vitro. **Compomparative Biochemistry Physiology Part A: Physiology**. v.91, n.3, p. 451-457, 1988.

JERÔNIMO, G. T.; DE PÁDUA, S. B.; BELO, M. A. A. ; CHAGAS, E. C.; TABOGA, S. R.; MACIEL, P. O.; MARTINS, M. L. Neoechinorhynchus buttnerae (Acanthocephala) infection in farmed Colossoma macropomum: A pathological approach. **Aquaculture**, v. 461, p. 124-127, 2016.

JOHN, C. D.; BUCKINGHAM, J. C. Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 3, p. 78-84, 2003.

JORGENSEN, J. B.; LUNDE, H.; ROBERTS, B. Peritoneal and head kidney cell response intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.) **Journal of Fish Disease**, v.16, p.313-325, 1993.

KERR, M. G. Exames laboratoriais em Medicina Veterinária. **Bioquímica clínica e hematologia**. 2º ed. 2003. editora Roca.

KIM, P. K.; DEUTSCHMAN, C. S. Inflammatory responses and mediators. **Critical care of the trauma patient**. v. 80, n. 3, p. 885-894, 2000.

KLEIN, J. **Immunology**. Blackwell Scientific Publications Inc., Massachusetts, USA, 1990, p.311-334.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 13, p. 159-175, 2013.

KRAEMER, M.; VASSY, J.; BRIGHTON, V.; FULLER, S.; YEOH, G. The effect of dexamethasone on transferrin secretion by cultured fetal rat hepatocytes. **European journal of cell biology**. v. 42, n. 1, p. 52-59, 1986.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEONARD, B. E. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. **European Psychiatry**. v. 20, p. S302-S306. 2005.

LEONARD, B. E.; SONG, C. Changes in the immune system in rodent models of depression. **International Journal Neuropsychopharmacology**. v.5, p. 345-356, 2002.

LESCOAT, G.; PASDELOUP, N.; KNEIP, B.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Modulation of alpha-fetoprotein, albumin and transferrin gene expression by cellular interaction and dexamethasone in cocultures of fetal rat hepatocytes. **European journal of cell biology**. v. 44, n. 1, p. 128-134, 1987.

LEWIS, J. H. ZIMMERMAN, H.J.; BENSON, G.D. ISHAK, K.G. Hepatic injury associated with ketoconazole therapy. Analysis of 33 cases. **Gastroenterology**. v. 86, n. 3, p. 503-513. 1984.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; MELO, D. C. Estresse em peixe. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3/4, p. 113-117, 2006.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

LOOSE, D.S.; KAN, P.B.; HIRST, M.A.; MARCUS, R.A.; FELDMAN, D. Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P450-dependent enzymes. **The Journal of Clinical Investigation**. v.71, n.5, p.1495–1499, 1983.

LORD, J. M.; MIDWINTER, M. J.; CHEN, Y-F.; BELLI, A.; BROHI, K.; KOVACS, E. J.; KOENDERMAN, L.; KUBES, P.; LILFORD, R. J. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. **The Lancet**. v. 18, n. 384, p. 1455-1465, 2014.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; GINEL, P. J.; CERON, J.J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. **Veterinary Record**. v. 154, p. 814-817, 2004.

McGROTTY, Y. L.; ARTEAGA, A.; KNTTENBELT, C.M.; RAMSEY, I. K.; ECKERSALL, P. D. Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 34, p. 255-258, 2005.

McQUADE, R.; YOUNG, A.H. Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor. **The British journal of psychiatry: the journal of mental**. v.177, p.390-395, 2000.

MALTAS, E.; OZMEN, M.; YILDIRIMER, B.; KUCUKKOLBASI, S.; YILDIZ, S. Interaction between ketoconazole and human serum albumin on epoxy modified

magnetic nanoparticles for drug delivery. **Journal of nanoscience and nanotechnology**. v. 13, n. 10, p. 6522-6528. 2013.

MARCHIONNI, A. M. T.; PAGNONCELLI, R. M.; REIS, S. R. A.; Influência do meloxicam e da dexametasona no processo inflamatório e no reparo tecidual. **Revista Odonto Ciência**. v. 21, n. 51, p. 22-29, 2006.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 32, n. 1, p. 31- 39, 2006.

MANRIQUE, W. G.; CLAUDIANO, G. S.; Petrillo, T.R. ; CASTRO, M.P. ; FIGUEIREDO, M. A. P. ; BELO, M. A. A. ; MORAES, J. R. E. ; MORAES, F. R. . Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* to inflammatory stimuli by BCG and foreign body. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, p. 1001-1006, 2014.

MANRIQUE, W. G.; CLAUDIANO, G. S.; CASTRO, MARCELLO PARDI ; PETRILLO, T.R. ; FIGUEIREDO, M. A. P. ; BELO, M. A. A. ; BERDEAL, M. I. Q. ; MORAES, J. R. E. ; Moraes, F. R. Expression of Cellular Components in Granulomatous Inflammatory Response in *Piaractus mesopotamicus* Model. **Plos One**, v. 10, p. e0121625, 2015.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; TAVARES-DIAS, M.; FENERICK, JR. J.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; MORAES, F. R. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). **Brazilian Journal of Biology**. v. 69, p. 957-962, 2009.

MATHIAS, JR., DODD, ME., WALTERS, KB., YOO, SK., RANHEIM, EA., HUTTENLOCHER, A. Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, vol. 33, no. 11, p. 1212-1217, 2009.

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

MAULE, A. G.; SCHRECK, C.B. Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. **General and comparative Endocrinology**. v. 84, n. 1, p. 83–93, 1991.

McLEAY, D. J. Effects of Cortisol and Dexamethasone on the Pituitary-Interrenal Axis and Abundance of White Blood Cell Types in Juvenile Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **General and comparative endocrinology**. v. 21, p. 441-450, 1973.

MIETTINEN, T. A. Cholesterol metabolism during ketoconazole treatment in man. **Journal of lipid research**. v. 29, p. 43-51, 1988.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. n.9, p. 211-268, 1999.

MORAES, A. C.; BELO, M. A. A.; PRADO, E. J. R.; MARINELLI, L.; GAGLIARD, P. C.; CARDOSO, F. Glucocorticoid activity of dexamethasone on cellular response in inflammatory exudate of tilapia, vaccinated and challenged with *Aeromonas hydrophila*. 2011. **Revista de Ciências Agropeveterinárias**, n. 815, 2011. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/indiceautor.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

MORAES, A.C.; PRADO, E.J.R.; FARIA, V.P.; GÍRIO, T.M.S.; MANRIQUE, W. G.; BELO, M. A.A. Clinical safety of dichlorvos (45%), cypermethrin (5%) and piperonyl butoxide (25%) administered by spray on the skin of cattle. **Revista MVZ Cordoba**, v. 20, p. 4873-4882, 2015.

MORAES, A. C. **Participação hepática e efeito glicocorticóide na resposta inflamatória aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápia do nilo, intoxicada por CCl₄**. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2014.

MORITOMO, T.; SERATA, K.; TESHIROGI, K.; AIKAWA, H.; INOUE, Y.; ITOU, T.; NAKANISHI, T. Flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst of ayu, *Plecoglossus altivelis*: comparison with other fresh water fish. **Fish and Shellfish immunology**, v.15, p. 29-38, 2003.

MULLER, W. A. Getting Leukocytes to the Sites of Inflammation. **Veterinary Pathology**. v. 50, n. 1, p. 7-22, 2013.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**. London, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluents for counting the Erythrocytes and Leucocytes of the chicken. **Poultry Science**. v. 31, n. 4, p. 735-738, 1952.

NAVARRO, V. J.; SENIOR, J. R. Drug-Related Hepatotoxicity. **The New england Journal of Medicine**. v. 354, p. 731-739, 2006.

NI, P. J.; JIANG, W. D.; WU, P.; LIU, Y.; KUANG, S. Y.; TANG, W. N.; ZHANG, Y. A.; ZHOU, X. Q., FENG, L. Dietary low or excess of lipids reduced growth performance, and impaired immune function and structure of head kidney, spleen and skin in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under the infection of *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 55, p. 28–47, 2016.

NIEMAN, L.K. Medical therapy of Cushing's disease. **Pituitary**. v. 5, p. 77–82, 2002.

NIEMAN, L.K.; BILLER, B.M.; FINDLING, J.W.; MURAD, M.H.; NEWELL-PRICE, J.; SAVAGE, M.O.; TABARIN, A. Treatment of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and metabolism**. v.100, n.8, p.2807–2831, 2015.

NOLASCO, E. L. **Estudo da sepse experimental em animais diabéticos e sadios, tratados ou não com insulina**. 2013.96f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo, 2013.

NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. **Immunity**. v. 41, n. 5, p. 694-707, 2014.

OUTEIRO, N.; HOHMANN, N.; MIKUS, G. No increased risk of ketoconazole toxicity in drug-drug interaction studies. **The Journal of Clinical Pharmacology**. v. 56, n. 10, p. 1203-1211, 2016.

PANKRATZ, S., BITTNER, S.; KEHREL, B. E.; LANGER, H. F.; KLEINSCHNITZ, C.; MEUTH, S. G.; GOBEL, K. The inflammatory role of platelets: Translational insights from experimental studies of autoimmune disorders. **International Journal of Molecular Sciences**. n. 17, pii: E1723, 2016.

PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHIMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p. 1-10, 1997.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. London: Academic Press, 1981.

PICKERING, A. D. Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. **General and Comparative Endocrinology**. v. 53, n. 2, p. 163–175, 1984.

PICKERING, A. D. Growth and stress in fish production. **Aquaculture**, v.111, p. 51-63, 1993.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. **Fish Physiology and Biochemistry**. v.7, n. 1-6, p. 253-258, 1989.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Biochemical effects of stress. In: HOCHACHKA, P. W. & MOMMSEN, T.P. **Environmental and ecological biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, p. 349-379, 1995.

PICKERING, A.D.; STEWART, A. Acclimation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress. **Journal of Fish Biology**. v. 24, n. 6, p. 731-740, 1984.

PIETERSE, E.; ROTHER, N.; YANGINLAR, C.; HILBRANDS, L. B.; VLAG, J. v.d. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. **Frontiers in immunology**. v. 7, n. 484, 2016.

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

POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsoveness in female rainbow trout. **Aquaculture**. v. 175, n.3-4, p. 351-363, 1999.

POTTINGER, T. G.; KNUDSEN, F. R.; WILSON, J. Stress-induced changer in the affinity and abundance of cytosolic cortisol-binding sites in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), are not accompanied by changes in measurable nuclear binding. **Fish physiology and biochemistry**. v. 12, n. 6, p. 499-511, 1994.

PRADO, E.J.R. **Insulina e dexametasona na aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Aloxano-diabéticas**. Jaboticabal, 2014. 78 p. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Características sanguíneas da Pirapitinga do sul, *Brycon* sp, sob condições experimentais de criação intensiva. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 28, n. 2, p. 141-153, 1991.

RANZANI-PAIVA, M. J.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1 ed. Maringá : Eduem, 2013, 140p.

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

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoid new mechanisms for Old drugs. **The New England journal of medicine**. v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

RICHESON, J. T.; CARROLL, J. A.; BURDICK SANCHEZ, N. C.; MAY, N. D.; HUGHES, H. D.; ROBERTS, S. L.; BROADWAY, P. R.; SHARON, K. P.; BALLOU, M. A. Dexamethasone treatment differentially alters viral shedding and the antibody and acute phase protein response after multivalent respiratory vaccination in beef steers. **Journal of Animal Science**. v. 94, n. 8, p. 3501-3509, 2016.

ROSSBACHER, J.; WAGNER, L.; PASTERNAK, M. S. Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 50, p. 399-404, 1999.

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

SAHOO, P. K.; KUMARI, J.; MISHRA, B. K. Non- specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal of Applied Ichthyology**, v.21, p.151-155. 2005.

SAREMI, B.; AL-DAWOOD, A.; WINAND, S.; MÜLLER, U.; PAPPRITZ, J.; VON SOOSTEN, D.; REHAGE, J.; DÄNICKE, S.; HÄUSSLER, S.; MIELENZ, M.; SAUERWEIN, H. Bovine haptoglobin as an adipokine: Serum concentrations and tissue expression in dairy cows receiving a conjugated linoleic acids supplement throughout lactation". **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 146 (3-4): 201–211, 2012.

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

SASAKI, K.; SHIMODA, M. Possible drug-drug interaction in dogs and cats resulted from alteration in drug metabolism: A mini review. **Journal of Advanced Research**. v. 6, p. 383-392, 2015.

SECOMBES, C.J. The fish immune system - the nonspecific immune system: cellular defenses. **Academic Press**. USA. p.63-103. 1996.

SWEENEY, S. C. Alterations in tissue and serum ceruloplasmin concentration associated with inflammation. **Journal of Dental Research**. v. 46, n. 6, p. 1171-1176, 1967.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v. 18, n. 3, p. 285-405, 2004.

SHI, W-L.; ZHANG, T.; ZHOU, J-R.; HUANG, Y-H.; JIANG, C-L. Rapid permissive action of dexamethasone on the regulation of blood pressure in a rat model of septic shock. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 84, p. 1119-1125, 2016.

SIITERI, P.K.; MURAI, J.T.; HAMMOND, G.L.; NISKER, J.A.; RAYMOURE, W.J.; KUHN, R.W. The serum transport of steroid hormones. **Recent Progress in Hormone Research**, v.38, p. 457-510, 1982.

SILVA, W. F.; EGAMI, M. I.; SANTOS, A. A.; ANTONIAZZI, M. M.; SILVA, M.; GUTIERRE, R. C.; PAIVA, M. J. R. Cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural observations on leukocytes and thrombocytes of fat snook (*Centropomus parallelus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 4, p. 571-577, 2011.

SIMION, V.; CONSTANTINESCU, C. A.; STAN, D.; DELEANU, M. TUCUREANU, M. M.; MANDUTEANU, I.; SIMIONESCU, M.; CALIN, M. P-Selectin Targeted Dexamethasone-Loaded Lipid Nanoemulsions: A Novel Therapy to Reduce Vascular Inflammation. **Mediators of Inflammation**. p. 1-15, 2016.

SONG, D.; DUNAIEF, J.L. Retinal iron homeostasis in health and disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**. 5: 24, 2013. doi:10.3389/fnagi.2013.00024

SPAHN, J. D. Glucocorticoid pharmacokinetics. **Immunology and allergy clinics of north america**. v. 19, n. 4. p. 709-723, 1999.

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

STALLA, G.K.; STALLA, J.; HUBER, M.; LOEFFLER, J.P.; HOLLT, V.; von WERDER, K.; MULLER, O.A. Ketoconazole inhibits corticotropic cell function in vitro. **Endocrinology**. v. 122, n.2, p. 618–623, 1988.

STOKES, K. Y.; GRANGER, D. N. Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction. **The Journal of Physiology**. v. 590, p. 1023-1034, 2012.

STUART, LM. and EZEKOWITZ, RAB. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, vol. 22, no. 5, p. 539-550, 2005.

SZABÓ, T.; OROSZLÁN, G.; LAKATOS, L.; DVORÁCSEK, E.; KARMAZSIN, L. Antenatal corticosteroid increases serum ceruloplasmin activity in premature neonates. **Acta paediatrica Hungarica**. v. 28, n. 3-4, p. 179-185, 1987.

TABOADA, J. **Micoses Sistêmicas**. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004. p. 481.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**. n. 16, v. 2, p. 423-431, 1999.

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

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematology of teleosts fish**. 1. ed.: Villimpress, Ribeirão Preto. 144 pp (In Portuguese), 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes:Characidae) intensively bred. **Hidrobiológica**. v. 16, n. 3, p. 271-274, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M.; MARCON, J.L; MENEZES, G.C.; ONO, E.A.; AFFONSO, E.G. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimidae) in net cage culture. **Electronic Journal of Ichthyology**, 2: 61-68, 2007.

TAVARES-DIAS M, ONO EA, PILARSKI F, MORAES FR. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A citochemical study and ultrasctrual analysis. **Journal of Applied Ichthyology**. 23: 709-712, 2007b.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf.), with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary Clinical Pathology**, V. 36, N. 1, P.49–54, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; LEMOS, J. R. G.; MARTINS, M. L. Parasitic fauna of eight species of ornamental freshwater fish species from the middle Negro River in the Brazilian Amazon region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 19, n. 2, p. 29-33. 2010.

TAVARES- DIAS, M. Parâmetros Sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS e MARIANO, W. S. **Aquicultura no Brasil: Novas perspectivas**. São Carlos: Pedro & João Editores, p.11-30, Vol. 1,429p, 2015.

TOCIDLOWSKI, M. E.; LEWBART, G. A.; STOSKOPF, M. K. Hematologic study of Red Pacu (*Colossoma brachypomum*). **Veterinary clinical pathology**. v. 26, n. 3, p. 119- 125, 1997.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. Regulation of the HPA axis by cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**. v.9, n. 4, p. 253–275, 1995.

ULUTAS, P. A.; UNSAL, H.; BALKAYA, M.; UNSAL, C. The short-term effects of dexamethasone on the blood concentrations of acute phase proteins (haptoglobin and ceruloplasmin) and trace elements in rats. **Revue de Médecine Vétérinaire: RevMedVet**. v. 158, n. 11, p. 579-584, 2007.

VIDAL-PUIG, A.; MUÑOZ-TORRES, M.; GARCÍA CALVENTE, C.; LARDELLI, P.; JÓDAR GIMENO, E.; CANO, M.; RUIZ REQUENA, M. E.; ESCOBAR-JIMÉNEZ, F. E. Lipid profile of hyperandrogenic women undergoing treatment with ketoconazole and its relationsHPI with the evolution of the hormone pattern. **Medicina clínica**. v. 11, n. 101 (20), p. 766-768, 1993.

VILAR, L.; NAVES, L.; FREITAS, M. C.; OLIVEIRA Jr, S.; LEITE, V.; CANADAS, V. Tratamento Medicamentoso dos tumores HPIofisários. Parte II: Adenomas Secretores de ACTH, TSH E Adenomas Clinicamente Não-Funcionantes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 44, n. 6, p.455-470, 2000.

VINODRAJ, K.; NAGENDRA NAYAK, I. M.; VIKRAM RAO, J.; MATHAI, P.; CHANDRALEKHA, N.; NITASHA, B.; RAJESH, D.; CHETHAN, T. K. Comparison of the efficacy of liraglutide with pioglitazone on dexamethasone induced hepatic steatosis, dyslipidemia and hyperglycaemia in albino rats. **India journal of Pharmacology**. v. 47, n. 2, p. 181-184, 2015.

WANG, C-N; McLEOD, R. S.; YAO, Z.; BRINDLEY, D. N. Effects of dexamethasone on the synthesis, degradation, and secretion of apolipoprotein B in cultured rat hepatocytes. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**. v. 15, p. 1481-1491, 1995.

WASSELL, J. Haptoglobin: function and polymorphism. **Clinical Laboratory** 46 (11–12): 547–52, 2000.

WEIBEL, E.R.; STAUBLI, W.; GNAGI, H.R.; HESS, F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. **Journal of Cell Biology**, p.68-91, 1969.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**. v. 27, n. 5, p. 909-914, 1970.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B.; MC LEAVY, D. Stress and acclimation. In: SCHERECK, C.; MOYLE, P. (Ed). Methods for fish biology. BETHESDA, M. D.: **American Fisheries Society**, 1990. p. 451-489.

WELLS, R. M. G.; PANKHURST, N. W. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. **Journal of the world aquaculture society**. v.30, n.2, june, 1999.

WEYTS, F. A. A.; COHEN, N.; FLIK, G.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 9, n. 1, p. 1-20, 1999.

WIJK, R.; ANDERSEN, K.; UGLENES, I.; EGIDIUS, E. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern. **Aquaculture**. v. 83, n. 3-4, p. 201–215, 1989.

WOLF, A. M.; TROY, G. C.; **Deep mycotic diseases**. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Text book of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat. 4 ed. Philadelphia:W. B. Saunders, 1995. p. 439-463.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Neutrophil functions in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**. n. 49, v. 9, p. 1618-1631, 2010.

YANG, Y.; YU, H.; LI, H.; WANG, A.; Transcriptome profiling of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 51, p. 329-336, 2016.

ZOLDERDO, A. J.; ALGERA, D. A.; LAWRENCE, J. M.; GILMOUR, K. M.; FAST, M. D.; THUSWALDNER, J.; WILLMORE, W. G.; COOKE, S. J. Stress, nutrition and parental care in a teleost fish: exploring mechanisms with supplemental feeding and cortisol manipulation. **Journal of experimental biology**, v. 219, p. 1237-1248, 2016.