

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

**EICOSANÓIDES NO AUMENTO DE PERMEABILIDADE
VASCULAR E COMPONENTE CELULAR DA
INFLAMAÇÃO AGUDA EM *Piaractus mesopotamicus***

Gustavo da Silva Claudiano
Médico Veterinário

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

2011

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

**EICOSANÓIDES NO AUMENTO DE PERMEABILIDADE
VASCULAR E COMPONENTE CELULAR DA
INFLAMAÇÃO AGUDA EM *Piaractus mesopotamicus***

Gustavo da Silva Claudiano

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

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

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

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
2011

C615e Claudiano, Gustavo da Silva
Eicosanóides no aumento de permeabilidade vascular e
componente celular da inflamação aguda em *Piaractus*
mesopotamicus / Gustavo da Silva Claudiano. -- Jaboticabal, 2011
xiii, 93 f.: il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Flávio Ruas de Moraes

Co-orientador: Marco Antonio de Andrade Belo

Banca examinadora: Rogério Salvador, Marileda Bonafim
Carvalho

Bibliografia

1. Inflamação. 2. Teleósteeo. 3. Alterações Vasculares. 4.
Mediadores Químicos. 5. Azul de Evans I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-002:597.2

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

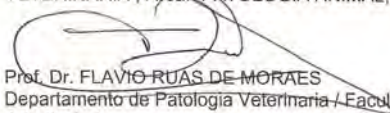
TÍTULO: EICOSANÓIDES NO AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR E COMPONENTE CELULAR DA INFLAMAÇÃO AGUDA EM *Piaractus mesopotamicus*

AUTOR: GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO

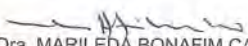
ORIENTADOR: Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

Co-Orientador: Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

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


Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR
Universidade Estadual do Norte do Paraná - Luiz Meneghel / Bandeirantes/PR


Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 20 de julho de 2011.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO- Natural de São Paulo – SP, nascido em 06 de janeiro de 1984, graduado em Medicina Veterinária em 2008, na Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP, Bandeirante – PR. Durante a graduação foi monitor nas disciplinas de Embriologia e Parasitologia Veterinária e fez estágios em diversas áreas do conhecimento, dentre elas, na área de Embriologia, Clínica Médica e Cirúrgica, Radiologia e Patologia. Professor voluntário de Química, no cursinho pró-vestibular CUP/Jaboticabal, durante 2009 a 2011. Monografia realizada sob orientação do Prof. Dr Rogério Salvador e co-orientação da Prof^a Fabiana Pilarsk, com o trabalho intitulado de “Avaliação da concentração letal CL 50% (CL (I) (50-96h)) do extrato aquoso de *Terminalia catappa* e sua eficácia em alevinos de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) parasitados por *Monogenea*, *Ichthyophthirius multifiliis* e *Piscinoodinium pillulare*”. Em março de 2009 ingressou no programa de pós-graduação em medicina veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp Campus de Jaboticabal sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes.

Dedico,

Ao meu Pai, **Sebastião**, não só pelo amor, carinho, paciência, compreensão, mas também por ser mais que um PAI, ser mais que grande amigo, ser o meu maior companheiro e maior incentivador, em todos os momentos da minha vida. Uma pessoa única, que jamais esquecerei e jamais poderei compensá-lo por tudo o que ele fez e tem feito por mim. Esta dedicação é pouca, ou quase nada, para demonstrar todo o amor e a gratidão que tenho por ele.

Sem sombra de dúvida, jamais poderia deixar de agradecer à mulher mais importante na minha vida, minha mãe, **Izilda**, pois sem ela nada disso seria possível, pessoa que admiro muito, tenho amor incondicional e jamais conseguirei compensá-la o que fez e tem feito por mim.

Duas outras pessoas que jamais vou esquecer-las, e não posso deixar de dedicar este trabalho, são meus irmãos, **Leonardo** e **Flávia**. Tenho muita gratidão e admiração por vocês.

à minha eterna protetora, in memoriam, minha avó Lourdes!!

A vocês, muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

... Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que, muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso me aborreceu deveras, e perguntei, então, ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque, nas horas em que eu mais necessitava de Ti, me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.

Agradeço

Ao meu Criador, pela minha vida e os meus caminhos e pela conclusão desta dissertação, fruto de minha vitória que não aconteceu pelo acaso. Foram momentos de incerteza, de silêncio, de busca, e de muita prece.

À minha família, em especial aos meus pais e aos meus irmãos, que sempre me ouviram e fizeram-me ver que entre o a realidade e o sonho há planície, montanhas, mas também abismos, incertezas medos e dúvidas.

Ao Prof^o, Dr. Flávio Ruas de Moraes, meu reconhecimento pela orientação segura, incentivo, confiança, dedicação e presença sempre amiga, ouvindo-me, corrigindo-me e apontando caminhos, em todas as fases da realização deste trabalho;

Ao Co-orientador, Prof^o Dr. Marco Antonio de Andrade Belo, pela disponibilidade oferecida, colaboração em todo o projeto, uma grande colaboração na minha formação;

À Prof^a, Dr. Julieta Rodini Engracia de Moraes, que pacientemente colaborou com o desenvolvimento do projeto em diversas ocasiões;

Aos companheiros de laboratório, Thalita, Wilson, Hurzana, Marcelo e Fernando, pela amizade conquistada, pelo diálogo, apoio e por me acolherem em todos os momentos;

Aos companheiros do Caunesp, José, Roberson, Eduardo e à Prof^a Dr. Fabiana Pilarsk, que me orientou no início de minha formação científica;

Aos professores de minha graduação, Prof^o Dr. Rogério Salvador, Prof^a Dr. Marisa Rosa Cruz, Prof^o Dr. Marcelo Alves da Silva e Prof^o Dr. Rogério Barbosa Macedo que me mostraram a beleza do mundo da veterinária.

A todos os parceiros da república Tia Méri;

Aos meus eternos amigos, companheiros de todas as horas, Anderson, Juan, Felipe, Marcos, João, Diogo, Helen, Murilo, Fabiano e à Maira, pelas várias e várias horas de conversas, apoio. ;

Aos meus eternos amigos de Bandeirantes: Raphael, Cleber, David, Diogo, Marlon, Márcio (in memoriam), Daniel, Igor e Cristiano pela grande amizade, presença constante e companheiros de todas as horas

À Bruna Agy Loureiro, pelo carinho, apoio, compreensão e por dividir diversos momentos comigo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio regular do projeto de Pesquisa (Processo nº 2009/16178-8) e

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa.

'Aos meus eternos amigos

*“Todos nós tomamos diferentes trilhas na vida,
mas não importa aonde vamos, aproveitamos
um pouco de cada um em toda parte e nos
tornamos especiais na vida uns dos outros”*

-Tim Mcgrew-

“Educar é mostrar a vida a quem ainda não a viu.

O educar diz: “*Veja!*”

- e, ao falar aponta.

O aluno olha na direção e vê o que nunca viu.

Seu mundo se expande. Ele fica mais rico interiormente.

“E ficando mais rico interiormente, ele pode sentir mais alegria e dar mais alegria – que é a razão pela qual vivemos”

(Rubens Alves)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO DE LITERATURA	03
3.1 Inflamação	03
3.1.1 Considerações gerais	03
3.1.2 Mediadores da inflamação	07
3.2 Inflamação por <i>Aeromonas hydrophila</i> inativada	12
3.3 Alteração de permeabilidade vascular: método do azul de Evans (AE)	13
3.4 Anti-inflamatórios	15
3.4.1 Anti-inflamatórios esteroidais	15
3.3.2 Anti-inflamatórios não esteróidais	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Animais e modelos experimentais	24
4.2 Obtenção da bactéria	25
4.3 Indução da aerocistite por <i>A. hydrophila</i> inativa	25
4.4 Experimento I: Avaliação prévia de doses crescentes dos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais sobre as alterações do aumento da permeabilidade vascular e componentes celular na inflamação	26
4.5 Experimento II: Avaliação da inibição da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o aumento da permeabilidade vascular na aerocistite induzida pela <i>Aeromonas hydrophila</i> inativada na bexiga natatória de pacus	27
4.6 Experimento III: Avaliação da ação da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o componente celular da inflamação aguda induzida na bexiga natatória inoculada com <i>A. hydrophila</i> inativada	29
4.7 Soluções	30
4.8 Análise Estatística	31
5. RESULTADOS	31

5.1 Experimento I: Avaliação prévia de doses crescentes dos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais sobre o aumento de permeabilidade vascular e componente celular na inflamação aguda.....	31
5.1.1 Efeito de drogas anti-inflamatórias sobre o aumento de permeabilidade vascular	31
5.1.2 Efeito de drogas anti-inflamatórias sobre o acúmulo de células totais.....	32
5.2 Experimento II: Avaliação da ação farmacológica da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o aumento da permeabilidade vascular na aerocistite induzida pela <i>Aeromonas hydrophila</i> inativada na bexiga natatória de pacus.....	33
5.3 Experimento III: Avaliação da ação da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o componente celular da inflamação aguda na bexiga natatória inoculada com <i>Aeromonas hydrophila</i> inativada	36
5.3.1 Contagem de células totais no exsudato inflamatório	36
5.3.2 Contagem diferencial em valores absolutos no exsudato inflamatório	38
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo e liberação do ácido araquidônico	10
Figura 2 – Mecanismo de ação dos glicocorticóides.	15
Figura 3 – Estrutura molecular do glicocorticóide dexametasona	17
Figura 4 – Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (Aines).....	19
Figura 5 – Estrutura molecular do Aines indometacina	20
Figura 6 – Estrutura molecular do Aines meloxicam	22
Figura 7 – Efeito do pré-tratamento com dexametasona (DEXA), meloxicam (MEL) e indometacina (INDO) sobre o aumento de permeabilidade vascular, 180 min. após o desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> . Os resultados estão expressos com a média \pm desvio padrão (N=6), * no histograma indica diferença significativo ($p < 0,05$) do grupo controle positivo (Cp) em relação aos outros grupos, pelo teste Tuckey.....	32
Figura 8 – Efeito do pré-tratamento com DEXA, MEL e INDO sobre o acúmulo de células totais, 24 horas após o desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> . Resultados estão expressos com médias \pm desvio padrão (N=6).	33
Figura 9 – Cinética das alterações da permeabilidade vascular e o efeito do pré-tratamento com anti-inflamatórios na aerocistite em pacús. Os resultados estão expressos com média \pm desvio padrão.	35
Figura 10 – Efeito do pré-tratamento com DEXA, MEL e INDO sobre o acúmulo de células , nos tempos de seis, 24 e 48 horas após a indução da inflamação aguda com <i>Aeromonas hydrophila</i> . Os resultados estão expressos com a média \pm desvio padrão (N=6).....	37
Figura 11 – Valores médios expressos com a média \pm desvio padrão (N=6) da contagem diferencial de granulócitos absolutos presentes no exsudato seis, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório em pacus.	39
Figura 12 – Valores médios expressos com a média \pm desvio padrão (N=6) da contagem diferencial de trombócitos absolutos presentes no exsudato seis, 24 e 48 após o estímulo inflamatório em pacus.	40
Figura 13 – Valores médios expressos com a média \pm desvio padrão (N=6) da contagem diferencial de linfócitos absolutos presentes no exsudato seis, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório em pacus.	42

Figura 14 – Valores médios expressos com a média \pm desvio padrão (N=6) da contagem diferencial de macrófagos absolutos presentes no exsudato seis, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório em pacus. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos (minuto de sacrifício pós-estímulo)	26
Tabela 2 – Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos (horas de sacrifício pós-estímulo)	28
Tabela 3 – Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos (minuto de sacrifício pós-estímulo)	29
Tabela 4 – Valores médios ¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem total de células presente no exsudato inflamatório de pacus desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	33
Tabela 5 – Valores médios ¹ (respectivos desvios padrão) da densidade óptica e análise de variância para as alterações de permeabilidade vascular e o efeito das drogas anti-inflamatória na aerocistite induzida pela <i>Aeromonas hydrophila</i>	35
Tabela 6 – Valores médios ¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem total de células presente no exsudato inflamatório de pacus desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	37
Tabela 7 – Valores médios ¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem de granulócito presentes no exsudato inflamatório de pacus desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	38
Tabela 8 – Valores médios ¹ (respectivos desvios-padrão) e análise de variância para contagem de trombócito presentes no exsudato inflamatório de pacus desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	40
Tabela 9 – Valores médios ¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem de linfócitos presentes no exsudato inflamatório de pacus desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	41
Tabela 10 – Valores médios ¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem de macrófagos presentes no exsudato inflamatório de pacus desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido araquidônico
AE – Azul de Evans
AINES – Antiinflamatório não esteroideal
CA – Carragenina
COX – Enzima cicloxigenase
COX-1 – Cicloxigenase –1
COX-2 – Cicloxigenase – 2
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DEX – Dexametasona
Eets – Ácido epoxyeicosatrienóico
EP – Extravasamento Plasmático
HPE – Horas pós-estímulo
IL – Interleucina
INDO – Indometacina
LOX - Lipoxigenases
LPS – Lipopolissacarídeo
LTs – Leucotrienos
LXs – Lipoxinas
PGs – Prostaglandinas
PGDs – Prostaglandina D sintetase
PGEs – Prostaglandina E sintetase
PGE2 – Prostaglandina E2
PGI2 – Prostaciclina
PLA2 – Fosfolipase A2
RNA – Ácido Ribonucléico
SIGP – Prostaglandina sintetase I

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TXs – Tromboxanos

TXA2 – Tromboxano A2

TXAs – Tromboxano A sintetase

EICOSANÓIDES NO AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR E COMPONENTE CELULAR DA INFLAMAÇÃO AGUDA EM *Piaractus mesopotamicus*

RESUMO - Neste trabalho, investigou-se a cinética das alterações vasculares e celulares na aerocistite, induzida pela inoculação da *Aeromonas hydrophila* inativada em *Piaractus mesopotamicus* e inibição da atividade enzimática da fosfolipase A2 e ciclooxigenase na inflamação aguda. Para tanto, foram utilizadas a indometacina, meloxicam e a dexametasona, aplicados por via parenteral, 30 minutos antes do estímulo lesivo. As alterações de permeabilidade vascular foram avaliadas nos tempos de 30, 90, 120, 180 e 240 minutos pós-estímulo, observando-se que o máximo da exsudação plasmática ocorre com 180 MPE. O pré-tratamento com indometacina ou meloxicam, neste tempo, inibiu significativamente o aumento de permeabilidade vascular e a dexametasona apresentou um bloqueio mais precoce e efetivo do que os outros AINES, inibindo nos tempos de 120 e 180 MPE. O exsudato celular inflamatório foi avaliado seis, 24 e 48 horas após estímulo, verificando-se que a inoculação da bactéria causou aumento progressivo do acúmulo de células, atingindo o máximo após 24 HPE, sendo maior que nos outros grupos estudados. Neste tempo, verificou-se que todas as drogas testadas foram efetivas para a redução significativa do acúmulo celular. A contagem diferencial das células presentes no foco inflamado demonstrou predomínio de linfócitos e trombócitos, seguida de macrófagos e granulócitos, com acúmulo mais tardio destas últimas. O pré-tratamento com indometacina e dexametasona causou bloqueio no acúmulo de todas as células identificadas. Os resultados demonstraram que, entre as diferentes doses de cada droga testada, não foram observadas diferenças significativas. As avaliações sugeriram que os eicosanoides, assim como acontece em mamíferos, participam ativamente dos fenômenos vasculares e têm papel relevante na quimiotaxia de leucócitos.

Palavras-chave: alterações vasculares, Azul de Evans, inflamação, mediadores químico, teleósteo

EICOSANOIDS IN INCREASED VASCULAR PERMEABILITY AND CELLULAR COMPONENT OF ACUTE INFLAMMATION IN *Piaractus mesopotamicus*

ABSTRACT – In this teaching we investigated the kinetics of vascular and cellular changes in aerocistite induced by inoculation of inactivated *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus* and pharmacological effect of the enzymatic activity of phospholipase A2 and cyclooxygenase in acute inflammation. To this end, we used indomethacin, meloxicam and dexamethasone, applied intraparenteral 30 minutes before stimulation harmful. Changes in vascular permeability were evaluated in 30, 90, 120, 180 and 240 minutes post-stimulation, we observed that the maximum plasma exudation occurs with 180 MPE and pretreatment with indomethacin or meloxicam at this time significantly inhibited the increase vascular permeability and dexamethasone had a lock early and effective than other NSAIDs inhibited at 120 and 180MPE. The cellular inflammatory exudate was assessed with six, 24 and 48 hours after stimulation, verifying that the bacteria caused a progressive increase in accumulation of cells, peaking at 24 HPE, higher than the other groups analyzed, and this time all tested drugs were effective in significantly reducing the buildup. The differential count of cells present in the exudate showed a predominance of lymphocytes and thrombocytes, and granulocyte macrophage followed with a later accumulation of the latter. Pretreatment with indomethacin and dexamethasone caused a blockage in the migration of all cells evaluated. The results showed that among the different doses of each drug tested was not observed any significant difference. Analysis of those exposed, suggest that eicosanoids, with in mammals, participate actively in the vascular phenomena and has important role in chemotaxis of leukocytes in acute inflammatory process induced by *A. hydrophila* in pacu.

Keywords: Chemical mediators, Evans Blue, inflammation, teleost, vascularchanges

1. Introdução

A inflamação é a reação do organismo contra agressões causadas por agentes biológicos, físicos e químicos. Uma das suas principais características é o acúmulo de leucócitos no local da injúria e sua mobilização em tempo hábil e adequado, da microcirculação ao foco inflamado.

A fase aguda é caracterizada por vasodilatação arteriolar, capilar e venular; aumento de permeabilidade vascular acompanhada de formação de edema; aumento da viscosidade sanguínea e quimiotaxia, marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia e fagocitose por células competentes.

A inflamação é estereotipada e complexa, havendo vários mecanismos propostos para explicar seus eventos, que envolvem agentes de regulação local, como os mediadores químicos autacóides e moduladores diversos de ação autócrina, parácrina e endócrina, além de substâncias liberadas por nervos sensitivos. Esses mecanismos de controle fazem com que a inflamação seja ajustada à intensidade e persistência do estímulo lesivo que a desencadeou. Além da ação local de mediadores farmacológicos, a inflamação aguda sofre influências de moduladores que exercem efeitos estimulatórios ou supressivos, adaptando sua amplitude à intensidade e persistência do estímulo injuriante. A insulina atua como hormônio pró-inflamatório, o qual é antagonizado fisiologicamente pelos glicocorticóides endógenos que exercem efeito anti-inflamatório.

Portanto, a inflamação é um fenômeno multimediado e seus sinais e sintomas representam a manifestação dos efeitos farmacológicos de substâncias endógenas. Tais efeitos podem ser bloqueados com drogas que ajam seletivamente para inibir essas ações, permitindo indiretamente a identificação da (substância(s) responsável (is) por ele(s).

Dentre os diversos protocolos experimentais empregados para elucidação da fisiopatologia da inflamação, incluem-se os bloqueios com glicocorticoides ou anti-inflamatórios não esteroidais.

Os glicocorticóides agem por meio de um mecanismo dependente da ocupação de receptores e da síntese de lipocortina que inibindo a atividade da fosfolipase A2, bloqueia a síntese de eicosanóides e do fator ativador de plaquetas (FAP), derivados do ácido araquidônico. Além disso, os glicocorticóides podem bloquear a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral e a interleucina 1 por macrófagos.

Outro grupo de fármacos é o dos anti-inflamatórios não esteróidais, que embora possuam diferentes estruturas químicas, agem fundamentalmente pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX) de metabolização do ácido araquidônico. O meloxicam, do grupo dos oxicans, age seletivamente sobre a COX-2, inibindo-a. A indometacina, do grupo químico indol, é cerca de 60 vezes mais seletiva para COX-1, é a droga de escolha para inibir estados dolorosos, enquanto outras AINES são ineficazes.

A bexiga natatória auxilia na flutuabilidade do peixe e transmissão de sons, e, sendo um órgão tubular, irrigado e oco, é adequada como modelo experimental para estudos de inflamação, pois permite a fácil indução do processo e coleta de exsudato para avaliação, tanto qualitativa como quantitativa. Além disso, a bexiga natatória não contém células inflamatórias residentes, sendo necessária a sua estimulação para que se acumulem, ao contrário da cavidade celomática. Nesse caso, bactérias inativadas ou não, ou substâncias químicas ou corpos estranho antigenicamente inertes podem ser usadas como estímulos inflamatórios.

Em função da sua posição filogenética, a utilização de peixes, como modelo experimental, traz contribuições relevantes para a área da patologia comparada. Além disso, o conhecimento dos mecanismos básicos da inflamação pode auxiliar na compreensão de vários fenômenos mórbidos de peixes. Assim, o presente trabalho procurou elucidar a participação dos eicosanóides no processo inflamatório agudo de pacus.

2. Objetivos

1. Avaliar previamente doses crescentes dos anti-inflamatórios esteroidais dexametasona e não esteroidais indometacina e meloxicam sobre as alterações da permeabilidade vascular e componente celular inflamatório;

2. Avaliar a ação farmacológica de eicosanoides sobre o aumento de permeabilidade vascular na inflamação induzida pela *Aeromonas hydrophila* inativada, na bexiga natatória de pacus;

3. Avaliar a ação farmacológica de eicosanoides sobre o acúmulo de células na inflamação aguda da bexiga natatória do pacu pela inoculação de *A. hydrophila* inativada.

3. Revisão da Literatura

3.1 Inflamação

3.1.1 Considerações Gerais

A descoberta do significado biológico da fagocitose por Elie Metchnikoff (1845-1916) está intimamente ligada à história da noção de *self*, o indivíduo dotado de unidade e identidade biológica. Em 1921, ele observou, em estrela-do-mar, o acúmulo de macrófagos e a fagocitose como processos ativos em resposta a estímulo. Assim, demonstrou o significado biológico da migração e acúmulo de células na cavidade celomática no foco inflamatório, assim como a fagocitose (METCHNIKOFF 1893, TAUBER E CHERNYAK, 1991; TAUBER 1994). A partir de suas observações, criou-se o conceito de fagocitose (do gr. *phagein*, comer), como se entende atualmente.

A teoria da fagocitose elaborada por Metchnikoff, em 1883, trouxe o conceito de que a fagocitose seria principal elemento da inflamação para eliminação do agente agressor. Este fenômeno seria, então, uma reação do organismo contra os agentes nocivos, observado tanto em vertebrados como em invertebrados.

Entretanto, este conceito entrou em choque com a teoria humoral, prevalente na época, na qual os fatores séricos eram considerados os mais importantes no processo

de neutralização dos agentes infecciosos. Paul Erlich considerou que, na natureza química e nos mecanismos de produção de anticorpos, não haveria inflamação sem a participação dos vasos sanguíneos. No entanto, em 1903, quando houve a descoberta das opsoninas, por Wright, concluiu-se que tanto os fatores humorais como os celulares são importantes e complementares no mecanismo de defesa orgânica.

Por desempenhar papel relevante na sobrevivência dos indivíduos frente à agressão, a inflamação pode ser observada em todos os seres vivos, desde os mais primitivos, tornando-se, no entanto, mais complexa à medida que se evolui na escala filogenética. Entretanto, a ação isolada do fenômeno inflamatório não se revela eficiente durante a agressão específica. Neste caso, a ação da resposta imune específica reforça e amplia ao máximo a sua eficácia (PERSON, 1992).

Em peixes, o primeiro fenômeno inflamatório descrito foi à fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares (METCHNIKOFF, 1893; 1905). Posteriormente, vários autores tentaram caracterizar as células presentes na inflamação, induzida por vários tipos de flogógenos, em diversas espécies de peixes e tempos de observação, mostrando-se, também, que, durante o processo inflamatório, o agente fagocítico é diversificado, podendo apresentar variações morfológicas, ontogenéticas e em sua cinética (WEINREB, 1958; JANSSON WAALER, 1967; GRIFFIN, 1953; FINN, 1970; BOZZO et al. 2007). A cinética do processo inflamatório também é bastante variável entre os diferentes modelos animais estudados, assim como num mesmo animal sob diferentes estímulos (SILVA et al., 2007).

A inflamação ou processo inflamatório (do grego *phlogosis*, calor, e do latim *flamma*, fogo), reveste-se de grande importância médica por ser o substrato morfo-fisiológico de mais de 70% das enfermidades que ocorrem no homem e nos animais. Nos papiros egípcios, 2.000 a.C., já há referência sobre a inflamação, quando se faziam relatos à formação de pus. Cornelius Celsus, no início da era Cristã, enunciou os quatro sinais cardinais: rubor, tumor, calor e dolor (dor) e, posteriormente, Rodolf Virchow acrescentou a estes um quinto, o *functio laesa*, (RYAN e MAJNO, 1977; TAUBER e CHERNYAK 1991), que indica perda de função da área afetada pela injúria, adicionado no final do século XIX.

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

A inflamação divide-se em aguda e crônica. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, perdurando por minutos, horas, por um ou dois dias, e se caracteriza por vasodilatação arteriolar, capilar e venular; aumento de permeabilidade vascular e instituição de edema; aumento da viscosidade sangüínea e marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes (GARCIA LEME, 1989; KUMAR, 2004; MORAES e MORAES, 2009). Este quadro pode sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal, da intensidade da agressão e do nível de especificidade da resposta (GARCIA LEME, 1989). Independente da natureza do estímulo que a tenha iniciado, a inflamação aguda é estereotipada, isto é, obedece a um padrão semelhante de desenvolvimento e tem como finalidade diluir, destruir ou circunscrever e isolar o agente lesivo (GARCIA LEME, 1989).

Reação semelhante, mas menos complexa, ocorre em peixes teleósteos, havendo, também, o acúmulo de células no foco lesado e fagocitose por células competentes. Outros mecanismos de defesa envolvem a produção de peptídeos para controle microbiano, atividade de lisozima, sistema complemento e outras proteínas sanguíneas (COLONNA et al., 2006). Diversos estudos constataram estes fenômenos com aplicação de diferentes estímulos flogógenos na bexiga natatória de *Piaractus mesopotamicus*, avaliando-se o acúmulo de leucócitos e trombócitos no local do inflamado (BOZZO et al., 2007; BOZZO et al., 2008; CASTRO et al., 2008) ou pela inoculação de carragenina na bexiga natatória de tilápias, *Oreochromis niloticus* e *P. mesopotamicus*, induzindo-se a reação inflamatória, caracterizada por congestão vascular, acúmulo de células mononucleares semelhantes aos trombócitos, raros granulócitos e edema (MATUSHIMA e MARIANO, 1996; MARTINS et al., 2000, MARTINS et al., 2006; 2008).

KATZENBACK e BELOSEVIC (2009) mostraram que em teleósteo, assim como em mamíferos, ocorre degranulação de neutrófilos sobre diferentes estímulos, como

Aeromonas salmonicida em “goldfish” (*Carassius auratus*). MACARTHUR et al., 1984, demonstraram que a injeção de diferentes estímulos na cavidade celomática provoca acúmulo de fluido com presença de neutrófilos e macrófagos.

Em solha (*Pleuronectes platessa*), a inoculação de lipopolissacarídeo B de *Escherichia coli* na cavidade peritoneal induziu o acúmulo de leucócitos totais e de fluido rico em neutrófilos e de macrófagos (MACARTHUR et al., 1984). Em outros estudos, como os de SUZUKI e HIBIYA (1988) a inoculação de goma arábica na órbita de carpas, *Cyprinos carpio*, provocou rápida infiltração de neutrófilos no sítio lesado, neutrofilia no sangue circulante e diminuição do número de neutrófilos no tecido linfóide renal, com monócitos, basófilos e linfócitos migrando para o foco lesado, porém em menor quantidade.

A inflamação crônica tem maior duração (dias, meses ou anos) e caracteriza-se pelo predomínio de células mononucleares e proliferação de tecido conjuntivo e vasos (KUMAR et al., 2004). Outra característica é a formação de granulomas, que pode ser composto de várias células, como macrófagos, células epitelióides, macrófagos poliariontes, linfócitos, fibroblastos e granulócitos (GAUTHIER, 2004). Os granulomas classificam-se em: "granulomas por corpo estranho" e "granulomas imunes ou epitelióides" (TIZARD et al., 2002).

As células envolvidas na resposta inflamatória crônica e, conseqüentemente, na formação dos granulomas de teleósteos possuem morfologia semelhante às células epitelióides de mamíferos, envolvendo alta atividade metabólica, fagossomos, interdigitações entre células adjacentes e formação de granulomas epitelióides (NOGA et al., 1989). Em diferentes espécies de peixes, foi evidenciado o encapsulamento de diferentes tipos de parasitos, como os monogenéticos, digenéticos, cestóides, nematóides, acantocéfalos e crustáceos (BUCHMANN et al, 2001; ALVAREZ, RAMIRO PELLITERO et al, 2004; DYKOVA e FERGUSON, 2006; LOM, 2007; RAMIRO PELLITERO-ALVAREZ, 2008).

Outros estudos, como os de MACARTHUR et al. 1984; NAKAYASU et al., 2005, demonstraram o acúmulo de macrófagos com formação de células gigantes em *P. mesopotamicu* ao serem submetidos à implante de lamínulas de vidro no tecido

subcutâneo e a suplementação com vitamina C (PETRIC et al., 2003a) e vitamina E (BELO et al., 2005) favoreceram a evolução dessa resposta em pacus. Em tilápias, do Nilo, suplementadas com ácidos graxos essenciais ômega 3, SAKABE (2007), os resultados foram semelhantes .

3.1.2 Mediadores da Inflamação

A característica estereotipada da inflamação levou à idéia de que fosse uma reação autorregulada e vários mecanismos foram propostos para explicar os fenômenos inflamatórios. Estes envolvem agentes de regulação local, como os mediadores químicos autacóides e moduladores diversos de ação autócrina, parácrina e endócrina, além de substâncias liberadas por nervos sensitivos. Esses mecanismos e as condições do organismo como um todo e a desnutrição (PECOITS-FILHO et al., 2002), disfunções hormonais (MARTINS, 2000), leucopenia (GARCIA LEME et al., 1976), estresse (MARTINS et al., 2000; BELO et al., 2005) determinam a resposta inflamatória, fazendo com que o processo seja ajustado à intensidade e persistência do estímulo lesivo que a desencadeou (GARCIA LEME, 1989).

A primeira evidência da ação dos mediadores químicos foi descrita por Lewis, em 1927, em sua clássica demonstração da resposta tríplice da pele humana. Verificou que, ao aplicar diferentes estímulos via intradérmica na pele humana, ocorria eritema primário no ponto de aplicação por ação vasodilatadora na microcirculação local, eritema secundário, a distância, graças aos reflexos axônicos vasodilatadores e formação de edema por aumento da permeabilidade vascular. Graças a essa série de efeitos, suspeitou-se que as alterações vasculares eram produzidas pela liberação local de substâncias químicas, ficando, posteriormente, demonstrada a ação da histamina e de outros mediadores (GARCIA LEME, 1989; KUMAR et al., 2004).

Para que uma substância seja considerada como mediador químico da inflamação, deve preencher cinco requisitos básicos : a) reproduzir, total ou parcialmente, uma reação inflamatória quando inoculada no organismo; b) ser isolada e identificada nos fluídos inflamatórios; c) estar presente no organismo, ser sintetizada ou ativada em quantidades adequadas, quando for necessário; d) com o desfalque de

suas reservas ou precursores, deve causar a inibição do processo e e) com o uso de antagonistas específicos ou bloqueadores de sua síntese deve reduzir a resposta inflamatória. Um único mediador pode contribuir para diferentes fenômenos, assim como um único fenômeno pode ser induzido por diferentes mediadores (GARCIA LEME, 1989)

A histamina e a serotonina são aminas vasoativas que induzem vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular, sendo esta última restrita às vênulas (MAJNO *et al.*, 1961; KUMAR *et al.*, 2004). A atividade relativa desses dois mediadores é espécie-dependente (KUMAR *et al.*, 2004).

O sistema de cininas é constituído por peptídeos liberados de cininogênios plasmáticos por ação de proteases (RAMALHO, 2000), do qual resulta um peptídeo ativo, a bradicinina, potente vasodilatador que provoca rápido aumento de permeabilidade em pequenos vasos sangüíneos, edema e dor. A bradicinina não possui atividade quimiotáxica e sua ação é de curta duração, pois é rapidamente inativada pela cininase. O sistema das cininas está inter-relacionado de maneira complexa com o sistema de coagulação, fibrinólise e do complemento que produz várias frações biologicamente ativas. Entre elas, destacam-se: C₃a e C₅a, como anafilatoxinas, que provocam aumento de permeabilidade vascular; C₅a, uma potente quimiotaxina para leucócitos e C₃b, opsonina importante no fenômeno de fagocitose; C_{5b67}, com ação quimiotáxica; C_{5b-9}, o componente lítico final (MOLLNES *et al.*, 2002).

Citocinas são compostos semelhantes a hormônios que têm efeitos em suas células de origem, em células do microambiente e em células a distância. Ou seja, possuem efeitos autócrino, parácrino e endócrino (RAMALHO, 2000).

Os efeitos biológicos de muitas citocinas podem se sobrepor, contrapor ou serem sinérgicos (BEDNAR *et al.*, 2000). Além disso, a sua produção e liberação são influenciadas por mecanismos de retroalimentação positivo ou negativo da própria citocina produzida ou por outras (FLEMING, 2007). Os fatores mais importantes para o efeito das citocinas são a extensão e tempo de liberação, sua vida média e distribuição pelo organismo, além da presença de inibidores naturais (RAMALHO, 2000). Também devem ser considerados o estado nutricional, a idade e o equilíbrio dos sistemas imune e endócrino (INACIO, 2005).

O ácido araquidônico (AA) contém 20 carbonos, sendo o principal precursor de eicosanóides, componente básico de todas as células, estando presente nos fosfolípídeos de membrana celular (VANES et al., 1971). Embora não esteja livremente disponível, são liberados das reservas de fosfolípídios de membrana através da atividade de várias enzimas fosfolipase (predominantemente PLA₂), através da ação de estímulos químicos ou mecânicos, que promovem sua liberação e conseqüente metabolização, dando origem às substâncias biologicamente ativas, denominadas, genericamente, eicosanóides, como as prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂), tromboxanas (TXs) e leucotrienos (LTs) (VANES et al., 1971; KOROLKOVAS, 2001). Uma vez no citosol, o AA pode ser metabolizado por três principais vias para formar as prostaglandinas (PGs); tromboxanos (coletivamente denominados prostanóides), pela ação de duas formas da ciclooxigenase (COX). Os LTs e lipoxinas (LXs) são gerados pelas lipoxigenases (LOX) (SAMUELSSON et al., 1987; SERHAN et al., 1984), e ácidos epoxieicosatrienoico (Eets) por enzimas do sistema citocromo P450 hepático (CAPDEVILA et al., 1990).

As prostaglandinas I₂ e E₂ possuem efeito vasodilatador prolongado e potencializam o aumento de permeabilidade vascular, induzido pela histamina e bradicinina (BRUNE e HINZ, 2004). A PGE₂ potencia a dor induzida pela bradicinina (HILÁRIO, 2006); o leucotrieno B₄ é um dos potentes agentes quimiotáxicos (SILVEIRA e YOSHIDA, 2004) e juntamente com as PGE₂ e PGI₂, potencializam o aumento da permeabilidade vascular, induzida pela bradicinina (LITALIEN e JACQZ-AIGRAIN, 2001). A tromboxana A₂ (TXA₂), cuja principal fonte são as plaquetas, provoca a agregação destas células e possui ação vasoconstritora, enquanto a PGI₂, produzidas pelas células endoteliais, tem efeito inibitório sobre a agregação plaquetária e provoca vasodilatação (KUMAR et al., 2004).

A formação de prostanóides biologicamente ativos da PGH₂ ocorre pela ação de um conjunto de enzimas sintetases, que são expressas em tecidos e células de tipo específico. Nestas enzimas, incluem-se a prostaglandina D sintetases (PGDS) (SHIMIZU et al. 1982), prostaglandina E sintetase (PGE) (TANAKA et al., 1987), a prostaglandina (PGFS) (HAYASHI et al., 1989), a prostaglandina sintase I (SIGP) (DEWITT e SMITH, 1983), e tromboxano A sintase (TXAS) (ULLRICH e HAURAND,

1983), que formam a PGE₂, PGF_{2a}, PGI₂ (prostaciclina) e TXA₂, respectivamente (Fig. 1). O diferencial de expressão dessas enzimas nas células é a determinação do perfil da produção do prostanóide. Por exemplo, mastócitos predominantemente produzem PGD₂, enquanto o macrófago, o PGE₂ e o TXA₂. Além disso, podem ocorrer alterações no perfil de síntese dos prostanóides, após a ativação da célula, pois o macrófago, em repouso, produz mais TXA₂ do que PGE₂, porém, após a ativação da célula, essa passa a produzir mais PGE₂ (BEZUGLA et al., 2006).

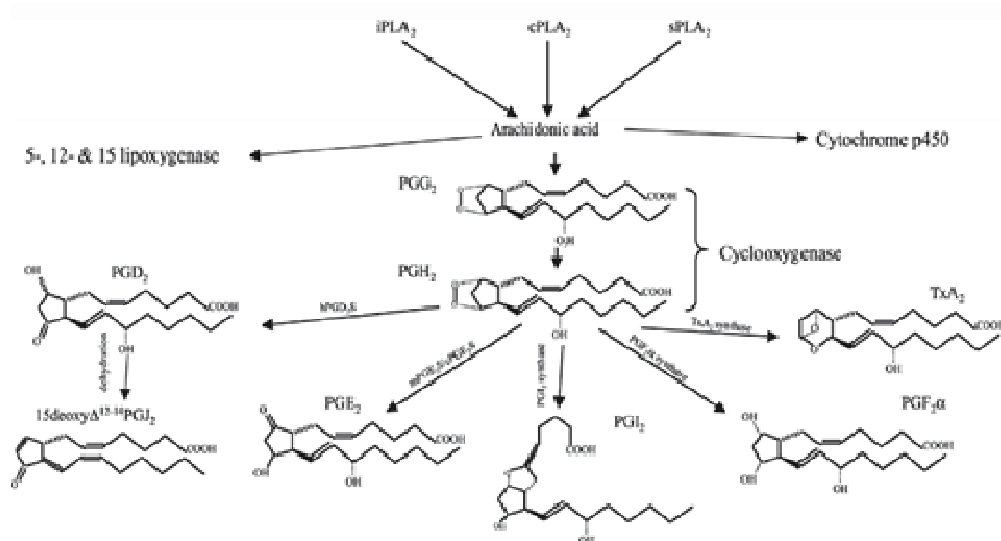


Fig. 1. Metabolismo do ácido araquidônico (Stables e Gilroy, 2011)

Há evidências de que as duas isoformas da COX podem, preferencialmente, contribuir para a síntese de prostanóides distintos. Por exemplo, estudos de macrófagos do peritônio de ratos, que expressam todas as sintases terminal, sugerem que a COX-1 produz equilíbrio na produção de prostanóides (ou seja, PGE₂, PGD₂, PGI₂ e TXA₂) preferencialmente, e a COX-2 gera, predominantemente, PGE₂ (BROCK et al., 1999). Dentre outras hipóteses, há estudos que sugerem a interferência do ambiente celular nessas reações (JAKOBSSON et al., 1999).

Além da ação local dos mediadores, o processo inflamatório sofre influências de moduladores que exercem efeitos estimulatórios ou supressivos sobre o fenômeno, adaptando-se sua amplitude à intensidade e à persistência do estímulo injuriante (GARCIA LEME, 1989). Desta forma, por exemplo, a insulina atua como um hormônio pró-inflamatório, o qual é antagonizado fisiologicamente pelos glicocorticóides

endógenos que exercem efeito anti-inflamatório (MORAES e GARCIA LEME, 1982; MORAES et al., 1987). Portanto, a inflamação é um fenômeno multimediado e complexo. Seus sinais e sintomas podem ser interpretados como a manifestação dos efeitos farmacológicos de substâncias endógenas (MORAES e GARCIA LEME, 1982).

Em resumo ao acima exposto, é fundamental a participação dos eicosanóides e de outros mediadores na resposta inflamatória e imune em todas as espécies, indiferente da posição filogenética. Decorrentes disso, diversos estudos têm mostrado a participação destes na resposta inflamatória e imune de muitas espécies.

ZHAO et al. (2009) demonstraram a participação dos eicosanóides no processo de modulação da resposta inflamatória de mosca varejeira, *Chrysomya megacephala*. Neste estudo, verificou-se que a inibição da ciclooxigenase com piroxicam diminui a modulação da resposta contra agentes bacterianos, sem haver inibição da via lipoxigenase, já, a utilização de dexametasona inibiu a cascata do AA, reduzindo a resposta contra agentes bacterianos.

Em outro estudo sobre a presença e a participação de eicosanóides na resposta inflamatória de estrela-do-mar, *Asterias Rubens*, feito por POPE et al. (2007) constataram, através do método de cromatografia gasosa, líquida e radioimunoensaio, que a presença de 8-HETE e PGE2 e PGD2, quando desafiada com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* ou *Salmonella abortus* não ocorre a participação destes mediadores na resposta contra tais estímulos.

Em peixes, já foram encontrados diversos mediadores químicos, no entanto, devido à diversidade de espécies, nota-se alguma variedade na apresentação de certos mediadores. Estudos de PETTIT et al. (1991), com truta arco-íris, demonstraram que leucócitos do sangue e macrófagos do rim cefálico geram quantidade significativa de lipoxigenase, bem como 12HET, LTB e PGs. Em “catfish (*Pleuronectes platessa*), “rudd” (*Scardinius erythrophthalmus*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), foram notadas que macrófagos produzem LTs e nono-HETEs (ROWLEY, 1991). Neutrófilos do sangue periférico da solha, *Pleuronectes platessa*, parecem ser atraídos por derivados da lipoxigenase semelhantes dos que ocorrem em fagócitos mononucleares de outras espécies (TOCHER e SARGENT, 1987), sugerindo que os monócitos / macrófagos,

granulócitos, trombócitos têm capacidade de geração de eicosanóides significativa nos peixes.

SECOMBES et al. (1994) utilizando inibidor de COX1, em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, constataram uma redução na produção de PGE, o que confirma a presença dos mesmos. MATSUYAMA e IIDA (2001) demonstraram que mastócitos de tilápias do Nilo, assim como em mamíferos, causam um aumento da permeabilidade vascular, sugerindo a hipótese de que estas células liberam mediadores para desencadear o aumento permeabilidade vascular.

3.2 Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativada

As bactérias do gênero *Aeromonas* são agentes infecciosos cosmopolitas, encontradas em fontes naturais de água, no solo e em animais de água doce (DAVIS et al., 1990). Bactéria Gram negativa, não encapsulada, com respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa, tem forma de bastonete móvel, possui flagelos polares e não produz esporos (STOSKOPF, 1993).

A doença causada pelo complexo *Aeromonas* se apresenta como septicemia hemorrágica, apresentando lesões hemorrágicas localizadas, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, abscessos, exoftálmica, distensão abdominal, ascite, anemia e processo congestivo hemorrágico no fígado e rins (AUSTIN e AUSTIN, 1987; NOGA, 1995). Por ser Gram negativa, possui lipopolissacarídeos na membrana externa (LPS), o qual é descrito como potente quimiotáxico de neutrófilos (FREUNDENBERG et al., 1984). Entretanto, em altas doses causam bloqueio da quimiotaxia destas células (DELAUNAY e PAGES, 1945).

Os peixes são menos sensíveis que os mamíferos à injeção de LPS, suportando doses maiores. Essa resistência é atribuída a menor habilidade dos macrófagos em produzir Interleucina (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e por possuírem menor quantidade de receptores para o complexo LPS (SWAIN et al., 2008).

Por estas características, a *A. hydrophila* é utilizada em diversos estudos experimentais de inflamação aguda. KLONTZ et al. (1966) inocularam *A. salmonicida* em

Salmo irideus, as quais desenvolveram furunculose, cujos achados microscópicos constituíram-se de macrófago, linfócito, neutrófilos e material necrótico.

BOZZO et al. (2007) demonstraram, na aerocistite induzida por diferentes estímulos, que a *A. Hydrophila*, inativada pelo calor, desencadeia inflamação aguda, com acúmulo de trombócitos, macrófagos, linfócitos e poucos granulócitos e líquido, formando o exsudato inflamatório em *Piaractus mesopotamicus*.

3.3. Alterações de permeabilidade vascular: Método do Azul de Evans (AE)

RAWSON, em 1943; LEVEEN e FISHMAN, em 1947, e FREEDMAN e JOHNSON, em 1969, estudaram o corante AE. O corante conhecido, também, como T-1824, é utilizado em estudo experimental de alterações vasculares causadas na inflamação. Este corante apresenta algumas características, como inocuidade (WOODS et al., 1988, BOLETA-CERANTO, 2005) e alta solubilidade em água e afinidade pela albumina, sendo um sal orgânico, diazo-tetrassódico, com peso molecular de 960,8 (CANOVA et al., 2002).

A inflamação aguda provoca alterações no fluxo sanguíneo, no calibre dos vasos e na permeabilidade vascular. O exsudato produzido, quando existe aumento da permeabilidade vascular, contém elevada concentração de proteínas plasmáticas, principalmente albumina (GUYTON, 1976). Quando injetado por via endovenosa, o AE forma complexos corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial (STEELE e WILHELM, 1966). Na inflamação aguda de média intensidade, as células endoteliais se contraem sob o efeito de mediadores químicos, permitindo a saída do complexo AE-albumina para o espaço intersticial. Este complexo pode ser extraído dos tecidos ou coletados em cavidades, onde houve derrame de exsudato, determinando-se sua quantidade por espectrofotometria (MORAES e GARCIA LEME, 1982; MORAES et al., 1987; BACCARO et al., 1990; CANOVA, 2002).

LEVEEN e FISHMAN (1947), em estudo pioneiro das taxas de desaparecimento do corante na circulação em humanos, durante o período de 24 horas, verificaram que a média de saída do corante da circulação era de 46%. Os autores demonstraram, ainda,

que a quantidade do corante em que a albumina se ligava variava com o pH, numa reação reversível. Nas condições de estudo com pH de 2,5, a quantidade de moléculas de corante por molécula de albumina era de 70:1. Em outra fase do experimento, verificaram que uma solução contendo albumina e corante era na proporção de 7:29. Passando-se por uma resina, que aceita somente íons livres, foram removidos 50% do corante, concluindo-se que ocorreu dissociação do complexo albumina-corante e transferência deste para a resina. Esta seria a explicação do aparecimento do corante, sem estar acompanhado da albumina, nos tecidos e secreções, além de explicar o mecanismo de desaparecimento do corante da circulação.

Em 1970, TAKEUCHI e MOVAT quantificaram o aumento da permeabilidade capilar em coelhos, ratos e cobaias albinas que receberam AE por via intravenosa. Induziram-se várias lesões inflamatórias na pele. Os fragmentos lesados do tecido foram corados, removidos, cortados e colocados para extração da formamida e posterior avaliação por colorimetria. O trabalho constatou que as lesões inflamatórias têm sua permeabilidade vascular aumentada, evidenciada pelo AE (MORAES e GARCIA LEME, 1982).

MARIANO e MALUCELLI, em 1990, realizaram experimentos em ratos Wistar, produzindo lesões com histamina e BCG. Utilizaram plasma não ativado e inibiram os fenômenos com anti-inflamatório não esteróide. As alterações na permeabilidade vascular foram mensuradas pelos níveis de AE teciduais, validando o método.

Em estudo da inflamação induzida por nitrato de prata em córnea de coelhos, utilizou-se o método do AE para determinar o tempo de concentração máxima do corante que era de dez horas, após a injeção do corante por via endovenosa. Concluiu-se que o método de quantificação da permeabilidade vascular alterada na córnea de coelhos pelo corante era adequado (GEHLEN, 2004).

Em *Gallus gallus*, HARA e MORAES (1993), utilizaram o corante para avaliar a cinética das alterações vasculares na peritonite induzida pela carragenina e os efeitos de drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais. Demonstraram que aumento máximo da permeabilidade ocorreu após 150 minutos, após a indução da inflamação, sugerindo que os eicosanóides participam ativamente dos fenômenos vasculares.

3.4 Anti-inflamatórios

3.4.1 Anti-inflamatórios Esteroidais

Os glicocorticóides são hormônios esteróidicos sintetizados na zona fasciculada e reticular do córtex da glândula adrenal a partir de colesterol, capturado na circulação sob forma de lipoproteínas (BUTTGEREIT, 1999). Os glicocorticóides sintéticos são produzidos a partir do ácido cólico bovino ou de plantas das famílias *Lalaceae* e *Discoriaceae* (ACEROLD, 1976).

São substâncias com ação anti-inflamatória mais ampla do que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (JERICÓ e ANDRADE, 2008). Os corticóides têm a capacidade de inibir a atividade da PLA2, que reduz a liberação do AA (GILMAN, 2011). DI ROSE et al. (1985) sugeriram que o mecanismo de ação dos corticosteróides está centralizado na formação de um complexo receptor-esteróide citoplasmático e ligando-se a receptores citosólicos, exercem sua ação no interior do núcleo e interagem com o DNA (ação genômica), ou com outras proteínas implicadas no processo de transcrição (ação não genômica, específica ou inespecífica), em seguida, ocorre a liberação de um RNA, que induz a síntese de proteínas efetoras no citoplasma (Figura 2).

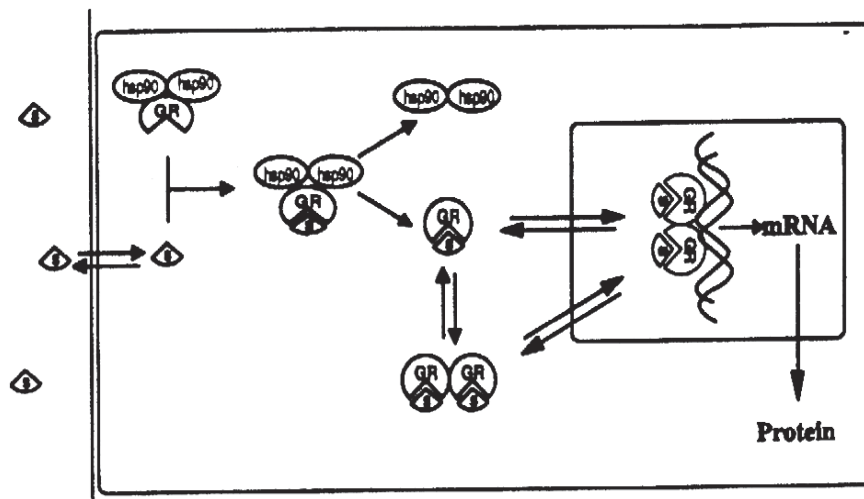


Fig. 2. Mecanismo de ação dos glicocorticóides (WRIGHT, 1992).

Esta proteína é a lipocortina, capaz de inibir a síntese de PLA2 e, conseqüentemente, dos principais derivados do AA (PGE2 e LTB4), das vasocortinas

(moduladoras da resposta vascular) e dos peptídeos que aumentam os níveis fisiológicos de cininase II (enzima conversora de angiotensina). A associação dos efeitos destas proteínas ocorre com o citosol em níveis fisiológicos e em doses supra-fisiológicas de corticosteróides sintéticos (DI ROSE et al., 1985).

Outro mecanismo proposto por BUTTGEREIT (1999) envolve a ação não dependente do genoma, isto é, não dependente de ação intranuclear. Este mecanismo foi observado por meio de efeitos "*in vitro*" na respiração, na síntese de proteínas e na ação da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ e $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ em timócitos. Este mecanismo de ação tem importância clínica, pois pode explicar a ação rápida de alguns glicocorticóides, o que justifica seu uso em corticoterapia "de pulso".

Portanto, estas drogas, em última análise, inibem a formação de PGs, TXs e LTs e, de maneira indireta, a PLA2 pela liberação de uma proteína inibitória, a lipocortina (WALLNER et al., 1986).

Assim a resposta anti-inflamatória dos glicocorticóides ocorre por ação local, tanto na fase precoce da inflamação, inibindo edema, vasodilatação, quimiotaxia leucocitária e atividade fagocitária, quanto na fase tardia, impedindo a neovascularização, proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e cicatrização (JERICÓ e ANDRADE, 2008). A supressão dessas respostas ocorre devido ao aumento da síntese de várias proteínas anti-inflamatórias, entre elas, a lipocortina-1, que tem efeito inibitório na PLA, inibindo a produção de mediadores lipídicos, entre eles: LTs, PGs e fator ativador de plaquetas, todos derivados do AA (VALDOZENDE e BRASIL, 2005).

Dentre os glicocorticóides sintéticos, incluem-se a prednisona, a prednisolona, a triamcinolona e a dexametasona (DEXA). Segundo DAMIANI (2001), os mais potentes compostos são a betametasona e a DEXA e os menos potentes são os compostos naturais cortisona e hidrocortisona (cortisol).

A DEXA (Figura 3) é de longa ação prescrita para várias condições patológicas causadas por alergia ou inflamação (SARLIS et al., 1999). A droga pode ser injetada diretamente nas articulações para dor, enrijecimento, inflamação (JERICÓ e ANDRADE, 2008) no controle do edema cerebral e na prevenção dos efeitos colaterais da radioterapia em pacientes com glioma maligno (WELLER, *et al.*, 1997).

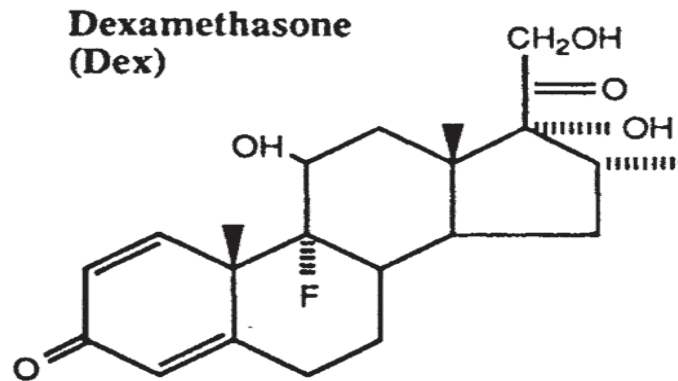


Fig. 3. Estrutura molecular do glicocorticóide Dexametasona (SARLIS et al., 1999)

Esse glicocorticóide é bem absorvido pelo trato-gastrointestinal e, também, a partir de locais de aplicação. Cerca de 90% dos corticosteróides circulantes estão ligados às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina e α -globina, com meia vida plasmática de quatro horas e meia vida tecidual de aproximadamente dois dias (YAGIELA e NEIDLE, 2000).

Em estudo para investigar os efeitos do uso crônico dos corticoesteróides na cicatrização de feridas cutâneas, TENIUS et al. (2007) utilizaram a DEXA (0,1mg/kg/dia) durante 30 dias, fazendo incisão no dorso dos ratos e estudando a cicatrização no terceiro, sétimo e no décimo quarto dia. Verificou-se que houve diminuição da resistência da cicatriz e baixa densidade do colágeno total em todos os tempos estudados. Conclui-se que a o uso prolongado de DEXA sobre o processo de cicatrização leva à diminuição da resistência da cicatriz, baixa densidade do colágeno total em todos os tempos estudados, e reduz o número de células inflamatórias nos tempos iniciais, corroborando com os estudos de SALMELA (1981) ao demonstrar que os corticosteróides, entre eles a DEXA, diminuíam a síntese do colágeno por redução do DNA e do RNA.

Com o uso dos corticóides, sobre a função inflamatória, em feridas cirúrgicas de ratos, houve uma redução de pelo menos 50% da circulação de células inflamatórias no sítio pós-operatório no primeiro dia, havendo, também queda da redução no terceiro e quinto dias, conforme estudos de NGUYEN e LIM (1998).

Esses efeitos inibitórios dos corticóides também são observados em peixes, onde, MCLEAY (1973) usou o cortisol e DEXA, demonstrando diminuição de linfócitos

no sangue, Verificou-se, na contagem de trombócitos, uma redução nos tratados com DEXA, mas não nos injetados com cortisol.

Em salmão, *Oncorhynchus kisutch*, ROBERTSON et al. (1963) estudara o efeito da DEXA foi estudado e constataram a diminuição do número de linfócitos circulantes. Estes resultados foram, mais tardes, encontrados por MCLEAY, em 1973, que ao administrar da droga durante sete dias consecutivos, um e 10 mg/kg/dia, constatou uma diminuição no diâmetro das células e a redução de linfócitos e trombócitos circulantes. Trombocitopenia, também, foi relatada em salmonídeos, tratados com dexametasona (WEINREB, 1958; MCLEAY, 1973) ou cortisona (WEINREB, 1958).

3.4.2 Anti-inflamatórios não esteroidais

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são drogas efetivas, podendo ser prescritas por vários dias (PAPICH, 2003), e em diferentes espécies (BOGAN, 1983; CLARK, 1999; BOOTHE, 2003), pois, pelo seu amplo mecanismo de ação são utilizados em diversas situações, quando se busca controle da dor, febre e do processo inflamatório. Desta maneira, são empregadas no decurso pós-operatório das mais variáveis entidades cirúrgicas (FORTES e NIGRO, 2005).

Embora os AINEs, tenham sido variavelmente definidos, o termo é usado para descrever compostos que não são esteróides e que deprimem a inflamação (BOOTHE, 2003). Geralmente, a classificação dos AINEs fica restrita àquelas drogas que inibem uma ou mais etapas do metabolismo do AA, com variações na sua capacidade de influenciar a inflamação (BOYNTON et al., 1988).

São considerados compostos quimicamente heterogêneos (FERIA, 1998), pois possuem diferentes estruturas químicas que agem fundamentalmente pela inibição da síntese de PGs, pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX) (CHENG e HARRIS, 2004). Esta enzima foi identificada em diversas células, com exceção dos eritrócitos (COLLINS e MOORE, 1999). Outras enzimas, como a lipooxigenase (LOX) pode ser, também, inibida por alguns agentes anti-inflamatórios, dentre eles, o diclofenaco sódico e a indometacina (INDO) (BRAINARD et al., 2005).

Ao ocorrer lesão na membrana celular, a PLA2, presente na membrana de leucócitos e plaquetas, é ativada por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-1. Esta leva à degradação dos fosfolípidos da membrana, resultando na produção de AA, que, ao ser metabolizado, forma os LTs pela ação da LOX. As PGs, PGI₂ e os TXs resultam da ação das isoformas da ciclooxigenase (COX) sobre o mesmo ácido (HILARIO et al., 2006).

Uma grande contribuição à compreensão do mecanismo de ação dos AINES foi dada com a identificação dos diferentes isoformas da COX, denominadas COX-1 e COX-2 (MATHEWS, 1996; CÔTÈ, 1998; SALIDO et al., 2001; TASAKA, 2002; OLIVERA, 2004), que contribuíram para o desenvolvimento de drogas seletivas para bloqueio da síntese de PGs (Figura 4), evitando-se, assim, uma gama de efeitos colaterais atribuídos aos medicamentos clássicos (ABE et al, 2004).

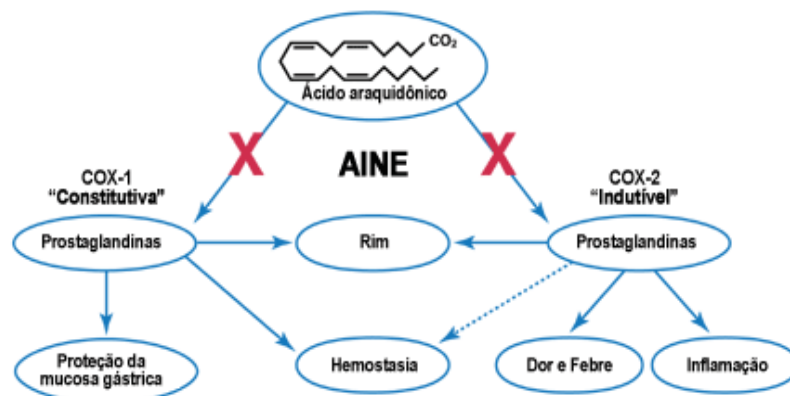


Fig. 4 – Mecanismo de ação do AINES (RUIZ et al. 2002)

COX-1 e COX-2 são enzimas que convertem o AA em PGs, PGI₂ e TXs (FAMAHEY, 1997; HLA T, 2002). A COX-1 apresenta 17 aminoácidos na porção aminoterminal, enquanto que a COX-2 apresenta 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal. Embora sejam semelhantes na sua estrutura protéica, essas enzimas são codificadas por genes diferentes. A COX-1 e a COX-2 têm aproximadamente 60% de homologia genética e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente (BRUNE et al., 2004).

Em relação aos mecanismos de regulação e padrão de expressão, a COX-1 é constitutivamente expressa em praticamente todos os tecidos do corpo, tendo papel

regulador da homeostasia em diferentes órgãos e tecidos, incluindo citoproteção gástrica, vasodilatação renal (DUBOIS et al., 1998). Em contrapartida, a isoforma COX-2 não é detectável na maioria dos tecidos em condição basal, enquanto a sua expressão é aumentada em resposta às citocinas, fatores de crescimento, mitógenos e promotores de tumores (CASTELLS et al., 2006).

Aspirina, INDO e outros AINEs que inibem COX parecem ter atividade química preventiva em animais de laboratório (MOON et al., 1993) e seres humanos (GIARDIELLO et al., 1993; THUN, 1996). Entretanto, a utilização, em longo prazo, desses agentes é limitada pela toxicidade gástrica e renal, causadas pela inibição de COX-1. Isso motivou o desenvolvimento de fármacos inibidores seletivos para COX-2, tornando estas drogas menos tóxicas (STEELE et al., 2002).

Dentre os AINES, destacam-se a INDO, um ácido orgânico 1-(p-clorobenzoil)-5-metox-2-metilindol-3-acético (Figura 5) com atividade analgésica e anti-inflamatória (GOTH, 1978), do grupo químico indol, cerca de 60 vezes mais potente para COX-1 do que para COX-2 (INSEL, 1995).

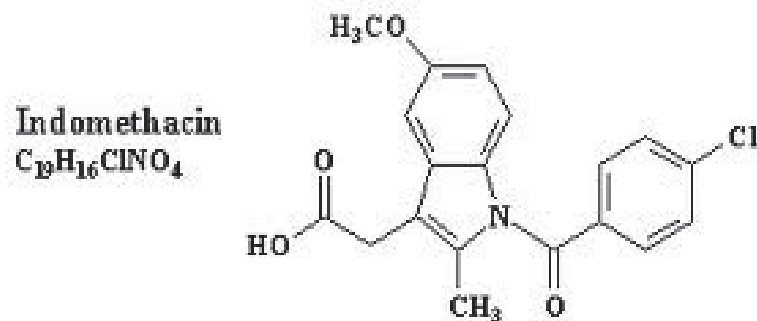


Fig. 5 – Estrutura Molecular Indometacina (BARREIRO e FRAGA, 1998).

A inibição de COX-1 pela INDO segue o mesmo mecanismo irreversível da aspirina, quando o ensaio é feito com a enzima isolada, mas é reversível, quando o ensaio é feito com células integras (CHENG e HARRIS, 2004). A INDO é utilizada como droga padrão na metodologia experimental de pesquisa de inflamação (CHENG e HARRIS, 2004).

Ela pode alterar a permeabilidade seletiva das células e organelas celulares, sendo que concentrações altas podem ter efeito hemolítico, com alta afinidade às

proteínas plasmáticas (CHAJETAS et al., 1982). Inibidor irreversível da via da COX (MCCARTHY, 1978), é amplamente utilizado para avaliar o papel das PGS endógenas (DARROW e TOMAR, 1980), uma vez que inibe a biossíntese das PGs, que participam na resposta inflamatória (THUN, 1996). Figura entre os AINES mais agressivos para o TGI (INSEL, 1995), causando irritação gástrica, gastrites e diarreias é potencialmente ulcerogênica (CORBETT, 1977). Em 1982, CHAJETAS et al., também demonstrou em ratos o efeito ulcerogênico da indometacina.

THERESA et al. (1995) estudaram o efeito da INDO na geração da atividade quimiotática no exsudato induzido por CA em ratos, a atividade foi induzida na pleura para observar a resposta de neutrófilo, demonstrando que a INDO foi capaz de reduzir o extravasamento plasmático (EP) e a geração de atividade quimiotática.

Como potente anti-inflamatório atua em estados dolorosos em que outros AINES são ineficazes (YAGIELA, 2000). Segundo SCHUTZ (1996), em seu estudo sobre a farmacologia da DEXA, metotrexato, tonoxican e a INDO, assim como na análise dos mecanismos envolvidos na estimulação flogógena por agentes de pequena, média e grande intensidade, constatou-se que a INDO e o tonoxican têm maior potencial para a inibição da exsudação plasmática e que a indometacina e a dexametasona tiveram maior potencial anti-inflamatório. Estudo *in vitro*, como de ANNE et al. (1994) mostraram que a INDO inibiu a estimulação de linfócitos.

HENRIQUES et al. (1987) demonstram que o pré-tratamento com INDO (0,1 e 0,25 mg/Kg) e DEXA (0,05 e 0,2 mg/Kg) reduzem, de forma dose-dependente, ambas as fases do edema de pata de rato provocada pela CA. BOLETA-CERANTO (2005) verificou que a administração de DEXA (2,3; 4,6 e 6,9 mg/Kg) e MEL (7, 14 e 21 mg/Kg) intra-peritoneal foram capazes de reduzir o extravasamento plasmático induzido pela CA.

Em 1993, HARA e MORAES avaliaram, em *Gallus gallus*, os efeitos da administração de DEXA (0,5; 1,0 e 2,0 mg/Kg), piroxicam (20,0; 40,0 e 80,0 mg/Kg) e INDO (4,0; 8,0 e 16,0 mg/Kg). Verificaram que, nos grupos tratados com DEXA, ocorreu inibição do aumento da permeabilidade vascular e do acúmulo de leucócitos no exsudato inflamatório, durante os testes. Estudo *in vitro* ANNE et al. (1994) mostraram que a indometacina inibiu a estimulação de linfócitos.

Dentre os AINES inibidores de COX-2, o meloxicam (MEL), derivado do ácido enólico (OGINO et al., 1997; THAI et al., 1999), pertence ao grupo dos oxicans (YAGIELA, 2000), com estrutura química é 4- hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido, (LIONZO, 2006) (Figura 6). Assim, como outros AINES encontrados no mercado, este foi desenvolvido com o objetivo de atuar com grande seletividade sobre a COX-2, inibindo-a, preferencialmente, durante a síntese de PGS a partir do AA (BUSCH et al., 2002; JOHNSTON, 2005; TURNER et al., 2006).

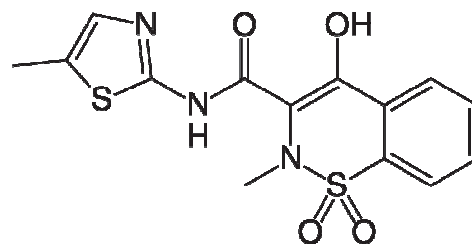


Fig. 6 – Estrutura Molecular do Meloxicam (RAMDEV, 2004).

É amplamente utilizado como analgésico e anti-inflamatório em casos de dores agudas e crônicas em diversas espécies de animais domésticos (TURNER et al., 2006). Possui alto potencial anti-nocivo, com mínimo de efeitos colaterais, tais como aqueles associados aos inibidores de COX-1, apresentando uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas superior a 99% (ENGELHARDT et al., 1996).

Em ratos e cobaias, a farmacocinética do MEL sugere que as concentrações mais elevadas desse anti-inflamatório podem ser encontradas nos rins, fígado e pulmões e mais baixa no sistema nervoso central (TURCK et al., 1996) Segundo o mesmo pesquisadores, o MEL é extensamente metabolizado, formando quatro metabólitos farmacologicamente inativos, os quais são excretados em porções iguais pela via renal e via fecal, com tempo de meia vida de eliminação de aproximadamente 20 horas.

ENGELHARDT et al., 1996 demonstraram o potencial inibitório do MEL percebido no teste da pelota de algodão, dose-dependente, sobre a formação de granuloma de corpo estranho foi equipotente ao piroxicam, INDO, diclofenato.

GRAHAM et al. (2001) examinaram o efeito do MEL sobre a resposta dos neurônios da coluna dorsal na fenda sináptica *in vivo*, utilizando-se ratos machos. Demonstrou que através da inibição pelo MEL, que a COX-2 pode estar envolvida na mediação e modulação da descarga dos neurônios da coluna dorsal.

Em estudo envolvendo 80 ratos Wistar, com a administração de DEXA (2,3; 4,6 e 6,9 mg/kg) e MEL (7, 14 e 21 mg/kg) intra-peritoneal reduziu o EP, induzido pela CA, em ambos os grupos aplicados às drogas (BOLETA-CERANTO, 2005). HAKAN, em 2008, investigando o efeito do MEL em um modelo de vasoespasma da artéria femoral em ratos, tomando como parâmetro a espessura da parede da artéria e a área do lúmen transversal, e examinando em microscopia de luz e eletrônica (varredura e transmissão) constatou que o MEL reduziu a inflamação sobre o vaso.

ENGELHARDT et al. (1996) estudaram aparecimento de úlceras gástricas, efeito adverso e limitante, e constataram que a totalidade utilizada dos ANEIS causou úlceras gástricas na forma dose-dependente, no entanto, o MEL teve menor potencial de causar úlceras do que o piroxican. OGINO et al. (1997) estudaram a atividade anti-inflamatória do MEL na pleurisia induzida por CA em ratos e sua toxicidade na mucosa gástrica. Os resultados indicaram que o MEL é um potente agente anti-inflamatório com baixa toxicidade gástrica.

Sobre os efeitos anti-inflamatório do MEL, em 1997, STICHTENOTH et al., compararam os efeitos de doses terapêuticas equivalentes de MEL e INDO sobre a agregação de plaquetas e formação de TXs das plaquetas e de PGE2 e concluíram que a INDO inibiu a agregação de plaqueta e a formação de TXs e o MEL não apresentou efeito significativo sobre estes parâmetros, portanto o MEL não tem efeito sobre COX1.

Estudos mais recentes demonstraram a eficácia do MEL e do carprofeno, aplicados por diferentes vias, na uveíte experimental em cães. Concluindo-se que os exsudados inflamatórios de caráter agudo e hemorragia discreta foram vistos na histopatologia, após a aplicação de ambos os fármacos, mostrando-se que MEL e o carprofeno foram ineficazes no processo de inibição e de síntese de PGE2 e no influxo de proteínas para a câmara anterior, por qualquer uma das vias testadas (RIBEIRO, 2007).

4. Material e Métodos

4.1 Animais e modelos experimentais

Foram utilizados 360 pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), com peso médio de $200,71 \pm 26,73$ g e comprimento total médio de $18,27 \pm 1,60$ cm., oriundos da mesma desova. Estes animais foram utilizados em três modelos experimentais, conforme exposição abaixo:

Experimento I: Avaliação prévia de doses crescentes dos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais sobre as alterações do aumento da permeabilidade vascular e componente celular na inflamação.

Experimento II: Avaliação da ação da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase no aumento da permeabilidade vascular da inflamação aguda, induzida pela *Aeromonas hydrophila* inativada em *Piaractus mesopotamicus*.

Experimento III: Avaliação da ação farmacológica da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o componente celular da inflamação aguda da bexiga natatória, induzida pela *A. hydrophila* inativada, em pacus, pelas contagens global e diferencial das células acumuladas no exsudato inflamatório.

Os experimentos foram realizados entre os meses de novembro (2010) a fevereiro (2011). Os peixes foram acondicionados em caixas fibra, abastecidas com água corrente, proveniente de poço artesiano, com vazão de um litro por minuto, contendo aeração suplementar, com seis animais em cada caixa. Para adaptação dos peixes, eles receberam ração comercial peletizada (28% de proteína bruta e 4000 kcal de energia bruta kg^{-1}).

Durante todo o experimento, os peixes foram alimentados pela manhã e tarde, com ração comercial, correspondendo a 3% da biomassa. As caixas foram sifonadas semanalmente, e a qualidade da água determinada nos momentos da alimentação, sendo a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido medidos pelo aparelho YSI, modelo 55, e o potencial hidrogeniônico e a condutividade elétrica pelo aparelho YSI, modelo 63. A média de concentração de oxigênio foi 5,03mg/L, temperatura da água 29,47 °C; potencial hidrogeniônico 7,66 ph e a condutividade elétrica de 117,96 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Esses resultados revelaram que a água estava na faixa de conforto para a espécie dos peixes (BOYD, 1990).

4.2 Obtenção da bactéria

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada neste trabalho foi isolada de peixes naturalmente infectados, apresentando lesões compatíveis com aeromonose. A identificação foi realizada segundo POPOFF (1984), acrescido de outras provas recomendadas por BUCHANAN e PALUMBO (1985) e ABEYTA JÚNIOR *et al.* (1986).

Utilizou-se o meio de cultura TSB 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. Após a obtenção de colônias puras, estas foram semeadas em meio líquido TSB. Após 24 horas de incubação a 30°C, o material foi centrifugado a 3.000 rpm/5 minutos, em centrífuga clínica, desprezando-se o sobrenadante e a massa bacteriana precipitada foi diluída em solução salina (0,65%), esterilizada até a obtenção da concentração 3×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Aeromonas hydrophila*, utilizando-se 3 a 4 na escala de MacFarland (BOZZO, 2007). A inativação foi pelo calor (banho-maria a 40° C, por 30 minutos), com o intuito de preservar o lipopolissacarídeo (LPS), responsável pela indução do processo inflamatório. Uma alíquota foi semeada em meio TSA para certificação da inatividade bacteriana.

4.3 Indução da Aerocistite por *Aeromonas hydrophila* inativada

Os peixes dos três experimentos foram anestesiados com benzocaína a 1g/10L para a aplicação do estímulo lesivo na região anteromediana, um centímetro à direita do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa de tuberculina esterilizada para atingir a bexiga natatória anterior. Os animais foram novamente agrupados em delineamento, inteiramente casualizado, em dois grupos para a indução da inflamação, onde, um grupo recebeu 0,5 mL de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65%, grupo controle negativo e os outros grupos receberam o mesmo volume dessa solução, contendo 3×10^9 unidades, formadoras de colônia (UFC) de *Aeromonas hydrophila*, inativada pelo calor (banho-maria a 40° C, por 30

minutos), constituindo os grupos de controle positivo, os quais receberam a bactéria e não foram tratados com anti-inflamatórios. Após a indução do processo inflamatório, os animais foram novamente banhados em solução de cloreto de sódio, como anteriormente descrito.

4.4 Experimento I: Avaliação prévia de doses crescentes dos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais sobre o aumento da permeabilidade vascular e componente celular da inflamação.

Para a avaliação prévia das doses crescentes dos anti-inflamatórios, foi utilizada uma dose padrão obtida de acordo BOLETA-CERANTE et al. (2005). A partir desta, utilizou-se metade da dose e duas vezes esta, da seguinte maneira: indometacina (5,0; 10,0; 20,0 mg/kg), meloxicam (7,0; 14,0; 28,0 mg/kg) e dexametasona (2,3; 4,6; 9,2 mg/kg). As avaliações ocorreram no período de máximo aumento de permeabilidade (180 minutos), sendo determinado em experimento piloto, e o acúmulo de células totais no foco inflamado, no período de 24 horas, segundo BOZZO et al., 2007.

Para tanto, foram constituídos dois experimentos agrupados aleatoriamente, um destinado para avaliar o aumento da permeabilidade e outro para o acúmulo de células. Na constituição de cada um destes dois experimentos, foram utilizados 10 grupos, uma caixa por grupo, seis animais por caixa, sendo uma por tratamento, conforme apresentado na tabela 1.

Tab. 1. – Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos (minutos de sacrifício pós-estímulo)

Tratamento/Grupos	Alteração Vascular	Migração Celular
	180 min	24horas
T1 – Controle (<i>A. hydrophila</i>)	N=6	N=6
T2 – INDO (5,0 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6
T3 – INDO (10,0 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6
T4 – INDO (20,0 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6
T5 – MEL (7,0 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6
T6 – MEL (14,0 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6
T7 – MEL (28,0 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6
T8 – DEXA (2,3 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6
T9 – DEXA (4,6 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6
T10 – DEXA (9,2 mg/kg) + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6

Para a avaliação do componente vascular, utilizou-se o tempo estabelecido de 180 minutos. Os animais foram submetidos à eutanásia, onde o procedimento está descrito no item 4.5. Para a avaliação do acúmulo de células, induziu-se a aerocistite, conforme descrito no item 4.3 e realizaram-se as contagens total e diferencial das células acumuladas, conforme procedimentos descritos no item 4.5, no tempo de 24 horas após estímulo.

4.5 Experimento II: Avaliação da inibição da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o aumento da permeabilidade vascular na aerocistite induzida pela *Aeromonas hydrophila* inativada na bexiga natatória de pacus

Para avaliar as alterações de permeabilidade vascular na inflamação aguda, induzida pela *A. hydrophila* em peixes e o efeito do pré-tratamento com drogas anti-inflamatórias, os animais foram agrupados em cinco tratamentos com cinco repetições (N= 150), contendo seis animais em cada caixa de água, totalizando-se 27 caixas, com seguinte delineamento abaixo e apresentado na tabela 2:

T1 – injetado 0,5 ml de solução de NaCl esterilizada a 0,65% - controle negativo;

T2 – injetado com *Aeromonas hydrophila* inativada – controle positivo;

T3 – pré-tratado com indometacina (5 mg/kg) e injetado de *Aeromonas hydrophila* inativada;

T4 – pré-tratado com meloxicam (2,3 mg/kg) e injetado de *Aeromonas hydrophila* inativada e

T5 – pré-tratados com dexametasona (7 mg/kg) e injetado de *Aeromonas hydrophila* inativada.

Tab. 2 – Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos (minutos de sacrifício pós-estímulo)

Grupos (números de peixes)	Minutos de sacrifício pós-estímulo					
	30	90	120	180	240	Total
T1 – Controle Negativo	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	30
T2 –Controle Positivo	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	30
T3 - INDO + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	30
T4 – MEL + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	30
T5 – DEXA + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	30

Desta forma, os animais dos grupos T3 a T5 foram pré-tratados com anti-inflamatórios, 30 minutos antes da inoculação da *A. hydrophila*. Estes foram tratados, por via intramuscular, com indometacina (5 mg/kg); meloxicam (7 mg/kg) e dexametasona (2,3 mg/kg), respectivamente, conforme resultados previamente observados no experimento 4.5.

Para avaliação das alterações de permeabilidade vascular, foi injetada, através da veia caudal, uma solução de azul de Evans (25 mg/kg) a 2,5%, em solução salina 0,65%, nos tempos 30, 90, 120, 180 e 240 minutos, após o estímulo inflamatório em todos os grupos (Tabela 2). Trinta minutos após a injeção do corante, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína (3g/10L). A bexiga natatória foi cuidadosamente lavada com 0,5 ml de solução gelada de PBS, contendo EDTA a 0,09%. O mesmo volume injetado foi recolhido com o auxílio de seringa descartável única e transferido para tubos cônicos, mantidos no gelo, centrifugado a 1.000 rpm/10 minutos, em centrifuga clínica. O sobrenadante contendo o corante foi colhido e levado para leitura em espectrofotômetro na densidade óptica de 620 nm de comprimento de onda (HARA e MORAES, 1993).

4.6 Experimento III: Avaliação da inibição ação da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o componente celular da inflamação aguda induzida na bexiga natatória inoculada com *A. hydrophila* inativada

Para avaliar o componente celular do exsudato e os efeitos do pré-tratamento com drogas anti-inflamatórias, os peixes foram agrupados em cinco tratamentos com cinco repetição (N= 90), com seis animais em cada caixa de água, com três caixas por grupo (N=6), com um total de 15 caixas, conforme delineamento apresentado na tabela 3:

T1 – injetado 0,5 ml de solução de NaCl esterilizada a 0,65% - controle negativo;

T2 – injetado de *Aeromonas hydrophila* inativada – controle positivo;

T3 – pré-tratado com indometacina e injetado de *Aeromonas hydrophila* inativada;

T4 – pré-tratado com meloxicam e injetado de *Aeromonas hydrophila* inativada;

T5 – pré-tratado com dexametasona e injetado de *Aeromonas hydrophila* inativada;

Tab. 3 – Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos (horas de sacrifício pós-estímulo)

Grupos (números de peixes)	Horas de sacrifício pós-estímulo			
	6 horas	24 horas	48horas	Total
T1 – Controle negativo	N=6	N=6	N=6	18
T2 – Controle positivo	N=6	N=6	N=6	18
T3 – INDO + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6	N=6	18
T4 – MEL + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6	N=6	18
T5 – DEXA + <i>A. hydrophila</i>	N=6	N=6	N=6	18

Desta forma, os animais dos grupos T3 a T5 foram pré-tratados com anti-inflamatórios, 30 minutos antes da indução do processo inflamatório pela aplicação *A. hydrophila*, estes foram tratados, por via intramuscular, com indometacina (5 mg/kg); meloxicam (7 mg/kg) e dexametasona (2,3 mg/kg), respectivamente.

Para a avaliação do acúmulo de células totais, ao término dos tempos pré-estabelecidos de seis, 24 e 48 horas, após o estímulo inflamatório, os animais foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína

(3g/10L). A bexiga natatória foi lavada cuidadosamente com 0,5 ml de solução gelada de PBS, contendo EDTA a 0,09%. O mesmo volume injetado foi recolhido com o auxílio de seringa descartável e transferido para tubos cônicos mantidos no gelo. A solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga clínica. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento total foi ressuspensionado com a adição de 100 microlitros de água destilada e uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz, coradas pelo método TAVARES-DIAS e MORAES (2003).

Para a contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos foi colocada uma gota deste exsudato sobre lâmina histológica, juntamente com uma gota de soro de pacu, extraída no dia anterior e mantidos refrigerados. Após homogeneização, foi feita a extensão do exsudato, a lâmina deixada secar em temperatura ambiente para posterior fixação em álcool metílico, por um minuto. Depois de secas, foram coradas pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz de até 100 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório.

4.7 Soluções

a) Solução Salina 0,65%

6,5 gramas de cloreto de sódio (REAGEN®) dissolvidos em 1000 ml de água destilada. Para utilização na diluição da *A. hydrophila*, a solução foi previamente esterilizada em autoclave (15 minutos/121 C°). Para a utilização na lavagem da bexiga natatória, a solução foi preparada pouco antes do início das operações.

b) Solução salina tamponada com EDTA (0,09%)

A solução de PBS utilizada foi proveniente de 100 ml retirado da solução mãe e diluída em 900 ml de água destilada esterilizada. Solução mãe é constituída de 0,15 M, ph 7,4: 80g de cloreto de sódio (REAGEN®); 2g de cloreto de potássio (REAGEN®); 11,5g de fosfato de sódio dibásico anidro (NUCLEAR®) e 2g de fosfato de potássio monobásico (NUCLEAR®), dissolvidos

em 1000 ml de água destilada esterilizada. Antes do uso era adicionado 0,9g de E.D.T.A (SYNTH®) em 1000 ml de PBS.

c) Solução de azul de Evans a 2,5% em solução salina 0,65%

Foi preparada uma solução de azul de Evans a 2,5% (MERCK®), em solução salina 0,65%, num volume suficiente para todo o experimento. A solução resultante apresentou 25 g/L, e foi conservada em temperatura de 4 °C.

d) Drogas Utilizadas

Foram utilizadas: Indometacina (Indocid – Merck Sharp e Dhome); Dexametasona (Decadron – Merck Sharp e Dhome); Meloxicam (Feldene-Pfizer); Azul de Evans (Merck).

4.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos às análises de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), e os valores de F indicaram diferenças significativas ($P < 0,05$ (SNEDECOR e COCHRAN, 1974)).

5. Resultados

5.1 Experimento I: Avaliação prévia de doses crescentes dos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais sobre o aumento da permeabilidade vascular e componentes celular na inflamação.

5.1.1. Efeito de drogas anti-inflamatórias sobre o aumento de permeabilidade vascular

A avaliação, sobre o efeito do pré-tratamento dos pacus com indometacina (5,0; 10,0; 20,0 mg/kg), meloxicam (7,0; 14,0; 28,0 mg/kg) e dexametasona (2,3; 4,6; 9,2 mg/kg), 30 minutos antes da aplicação do estímulo, revelou que as três drogas, nas doses utilizadas, foram eficientes para inibir significativamente ($P < 0,05$) o aumento de permeabilidade vascular avaliado em 180 MPE, comparado com o grupo controle

positivo (Figura 7). Todavia, os efeitos das diferentes doses das drogas utilizadas não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$), ou seja, as doses crescentes não apresentaram relação dose-resposta.

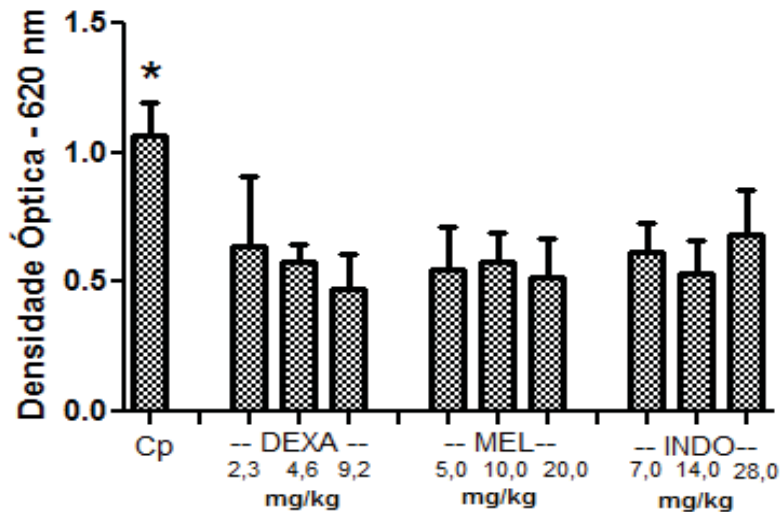


Fig.7. Efeito do pré-tratamento com DEXA, MEL e INDO sobre o aumento da permeabilidade vascular, 180 min. após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Os resultados estão expressos com a média \pm desvio-padrão (N=6), * no histograma indica diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo controle positivo (Cp) em relação aos outros grupos, pelo teste Tuckey.

5.1.2 Efeito dos anti-inflamatórios sobre o acúmulo de células totais

Sabendo que o acúmulo de células totais na aerocistite induzida pela *A. hydrophila* atinge valores máximos 24 HPE (Figura 8). Em relação as três drogas anti-inflamatórias, todas as drogas foram capazes de inibir significativamente ($P < 0,05$) o acúmulo de células totais no tempo analisado em relação ao grupo controle (Tabela 4). Nesta mesma análise, constatou-se que não houve diferença estatística significativa das diferentes doses das drogas utilizadas.

Tab. 4 - Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem total de células presente no exsudato inflamatório de pacus desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Tratamento	Período 24 horas pós-desafio		
	Dose I	Dose II	Dose III
Controle	316 ± 117 Aa	316 ± 117 Aa	316 ± 117 Aa
Indometacina	15,4 ± 16 Ba	21,25 ± 17 Ba	11,2 ± 8,6 Ba
Meloxicam	38 ± 28 Ba	23 ± 18,1 Ba	34 ± 50 Ba
Dexametasona	22 ± 31 Ba	31,6 ± 17 Ba	22,2 ± 17 Ba

¹ Médias (n=6) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha a evolução do processo inflamatório entre os diferentes dias experimentais.

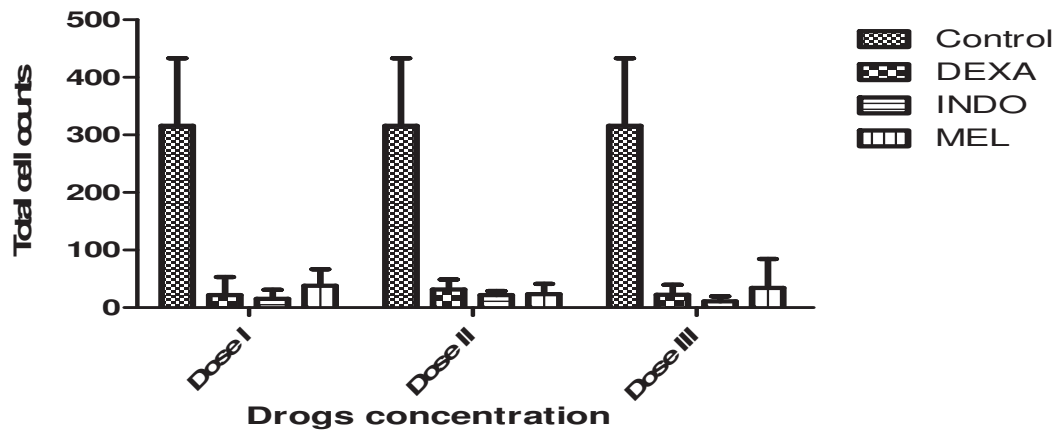


Fig. 8. Efeito do pré-tratamento com DEXA, MEL e INDO sobre o acúmulo de células totais, 24 horas após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Os resultados estão expressos com a média ± desvio padrão (N=6).

5.2 Experimento II: Avaliação da ação farmacológica da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o aumento da permeabilidade vascular na aerocistite induzida pela *Aeromonas hydrophila* inativada na bexiga natatória de pacus

Os resultados demonstraram que a aplicação de 0,5 ml de solução salina contendo 3×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Aeromonas hydrophila* inativada em pacus, ocorreu o máximo da exsudação plasmática com 180 MPE (minutos após estímulo) na comparação entre as medias do grupo controle positivo, que

embora apresentassem algumas variações, estas não foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), mantendo-se constantes entre 90 a 240 MPE (Tabela 5 e Figura 9).

Diferentemente do observado no grupo controle negativo, ocorreram em duas fases distintas, a primeira resposta ocorreu imediatamente após a aplicação, atingindo o máximo com 90 MPE, em seguida, observou-se -se uma diminuição da resposta, sendo estatisticamente inferior com 180 MPE. Após este tempo, a segunda fase da resposta atingiu o máximo com 240 MPE (Figura 9).

Apesar destas diferenças entre os grupos controles, a diferença estatística só foi observada entre a evolução das duas respostas, no tempo de 180 MPE, onde, neste tempo, a resposta do grupo controle negativo foi inferior ($P < 0,05$).

Sobre a cinética do efeito da administração das diferentes drogas anti-inflamatórias sobre o extravasamento plasmático, observou-se uma resposta semelhante ao ocorrido em todos os animais tratados com as três drogas anti-inflamatórias, ou seja, notou-se uma resposta com fases distintas (Tabela 5 e Figura 9). A primeira resposta começou logo após a aplicação, com o máximo do extravasamento com 90 MPE em todos os grupos tratados, seguido de regressão, com um novo pico no extravasamento com 240 MPE, como ocorreu no grupo controle negativo.

Na comparação da eficácia das três drogas testadas, todas foram capazes de inibir significativamente ($P < 0,05$) o aumento de permeabilidade vascular com 180 MPE em relação ao grupo controle positivo. Entretanto, observando a tabela 5, nota-se, ainda, que a dexametasona foi mais efetiva na redução do extravasamento plasmático, sendo mais precoce ($P < 0,05$) do que os grupos tratados com anti-inflamatórios não esteroidais e do grupo controle positivo, apresentando uma inibição com 120 MPE, mantendo-se estatisticamente até 180 MPE.

Tab 5 - Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) da densidade óptica e análise de variância para as alterações de permeabilidade vascular e o efeito das drogas anti-inflamatória na aerocistite induzida pela *A. hydrophila*.

Tratamento	Período pós-desafio				
	30 min	90 min	120 min	180 min	240 min
Controle negativo	380 ± 127 Ab	546 ± 52,9 Aa	512,5 ± 94 Aab	325 ± 98,3 Bb	468,2 ± 119 Aab
Controle positivo	337,8 ± 77 Ab	503 ± 79,7 Aa	518,7 ± 42 Aa	533 ± 62,9 Aa	518,6 ± 61 Aa
Indometacina	356,66 ± 182 Ab	581 ± 190 Aa	493,1 ± 147 Aa	307 ± 67,9 Bb	509,6 ± 198 Aa
Meloxicam	386 ± 130 Aab	586 ± 58,3 Aa	484,7 ± 110 Aa	234 ± 70 Bb	538,7 ± 61 Aa
Dexametasona	417,2 ± 112 Aab	517 ± 62,2 Aa	370 ± 173 Bbc	297 ± 125 Bc	456,2 ± 121 Aab

¹ Médias (n=6) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha a evolução do processo inflamatório entre os diferentes dias experimentais.

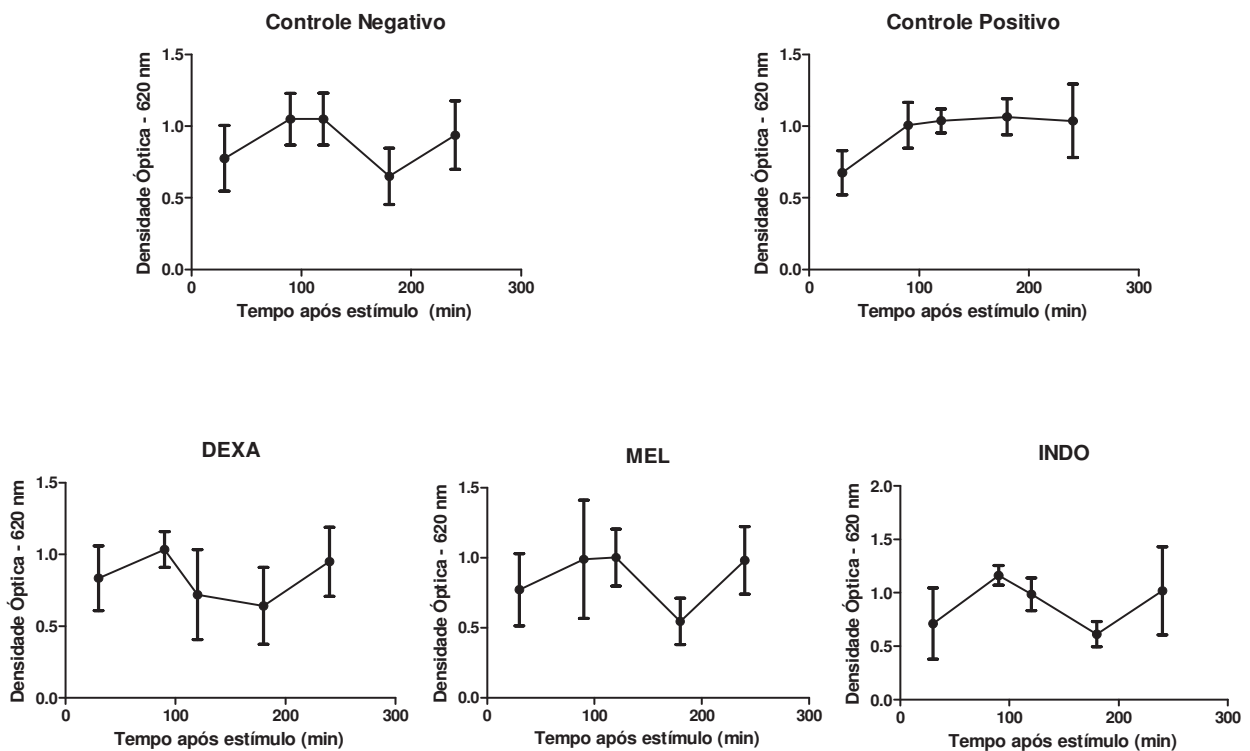


Fig. 9. – Cinética das alterações da permeabilidade vascular e o efeito do pré-tratamento com anti-inflamatórios na aerocistite em pacús. Os resultados estão expressos com média ± desvio padrão.

5.3 Experimento III: Avaliação da inibição da ação da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase sobre o componente celular da inflamação aguda induzida na bexiga natatória inoculada com *A. hydrophila* inativada.

5.3.1 Contagem de células totais no exsudato inflamatório na bexiga natatória.

O acúmulo de células totais na aerocistite induzida pela *A. hydrophila* atingiu valores máximos 24 HPE (Figura 10). A contagem de células totais no exsudato inflamatório de pacus desafiados com *A. hydrophila* (controle positivo), revelou aumento no número de células em relação ao grupo injetado com salina 0,65% (controle negativo) em todos os tempos estudados, sendo inclusive significativamente maior ($P < 0,05$), nos tempos de 24 e 48 HPE (Tabela 6).

Todavia, os pré-tratamentos com os anti-inflamatórios não inibiram o acúmulo de células totais em relação ao grupo controle positivo, sendo os valores observados no grupo tratado com meloxicam estatisticamente maior.

Com a evolução da inflamação, observou-se que com 24 HPE ocorreram maiores contagens de células no grupo controle positivo em relação ao negativo, com diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Os que receberam antiinflamatórios apresentaram valores estatisticamente menores ($P < 0,05$) que o observado no grupo controle positivo. Neste tempo, observou-se, ainda, que os grupos tratados com indometacina e dexametasona não diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) ao grupo controle negativo (Tabela 6).

Tab 6 - Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem total de células presente no exsudato inflamatório de pacus desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Tratamento	Período pós-desafio		
	6 horas	24 horas	48 horas
Controle negativo	583 ± 340 Ca	671 ± 327 Ca	770 ± 253 Ca
Controle positivo	1087 ± 214 BCb	3073 ± 1283 Aa	1607 ± 663 ABb
Indometacina	1391 ± 412 ABab	1241 ± 694 Cb	1942 ± 199 Aa
Meloxicam	1936 ± 178 Aa	2012 ± 1200 Ba	1254 ± 705 BCb
Dexametasona	1430 ± 327 ABa	1481 ± 845 BCa	1507 ± 656 ABa

¹ Médias (n=6) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha a evolução do processo inflamatório entre os diferentes dias experimentais.

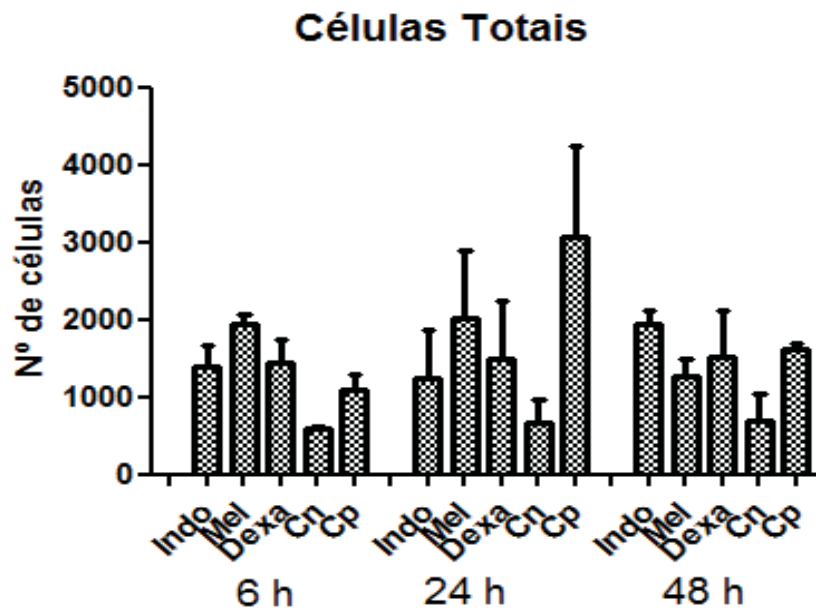


Fig. 10 – Efeito do pré-tratamento com DEXA, MEL e INDO sobre a migração celular, nos tempos de seis, 24 e 48 horas após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Os resultados estão expressos com a média ± desvio padrão (N=6).

Após 48 horas da indução da inflamação, observou-se diminuição significativa (P<0,05) na contagem celular do exsudato do grupo controle positivo em relação ao observado, após 24 HPE, fato este também acontecido no grupo tratado com meloxicam, mas ambos diferentes do observado no controle negativo. No caso do meloxicam, o maior efeito observado foi com 24 HPE, significativamente menor do que o grupo controle positivo.

No grupo tratado com indometacina foram observadas elevadas contagens celulares 48 HPE. Diferentemente, o tratamento com dexametasona controlou o acúmulo celular durante toda a evolução do processo induzido pela bactéria inativada, não ocorrendo variações significativas ($P>0,05$) entre os diferentes momentos avaliados, demonstrando o bloqueio do acúmulo de células por este glicocorticoide em pacus.

5.3.2 Contagem celular diferencial em valores absolutos presente no exsudato inflamatório da bexiga natatória

Os valores médios da contagem diferencial absoluta de granulócitos, trombócitos, linfócitos e macrófagos no exsudato inflamatório, presentes na bexiga natatória de pacus, estão expressos, respectivamente, nas figuras de 11 a 14, respectivamente.

A contagem absoluta de granulócitos nos peixes do grupo controle positivo (Tabela 7 e Figura 11) revelou que o acúmulo máximo no exsudato ocorreu 24 HPE, diferenciando-se ($P<0,05$) dos valores de contagem encontrados para os animais do grupo controle negativo.

Tab. 7 - Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem de granulócitos presente no exsudato inflamatório de pacus desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Tratamento	Período pós-desafio		
	6 horas	24 horas	48 horas
Controle negativo	80 ± 39 Ba	121,6 ± 58,5 Ca	179 ± 91 Ba
Controle positivo	223,6 ± 67 ABb	442,8 ± 280 Aa	316,4 ± 83 ABab
Indometacina	264,67 ± 119 Ab	235,3 ± 201 BCb	463,8 ± 116 Aa
Meloxicam	264,5 ± 95 Aa	300 ± 174 ABa	429,4 ± 101 Aa
Dexametasona	231,5 ± 127 ABb	291 ± 194 ABab	416,6 ± 242 Aa

¹ Médias (n=6) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha a evolução do processo inflamatório entre os diferentes dias experimentais.

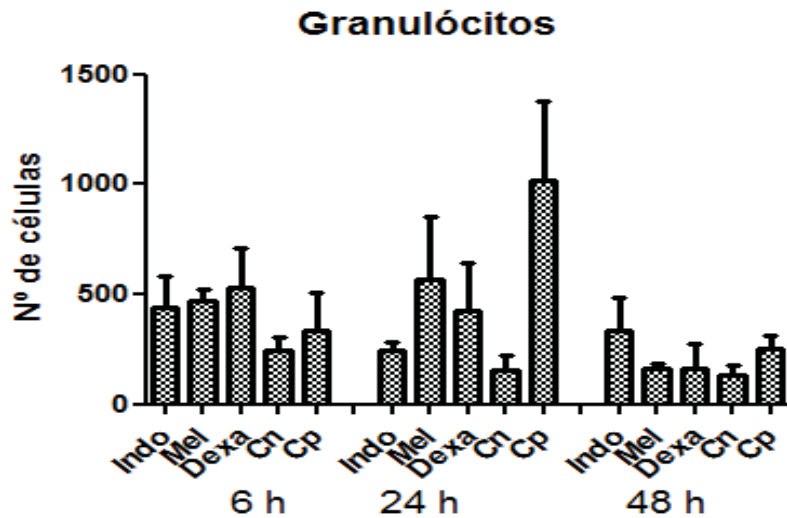


Fig. 11. — Valores médios expressos com a média \pm desvio padrão (N=6) da contagem de granulócito absolutos presentes no exsudato após o estímulo inflamatório em pacus.

Da análise da tabela 7, verifica-se que todas as drogas utilizadas não foram eficazes no bloqueio do acúmulo de granulócitos, uma vez que só o grupo tratado com indometacina diferiu ($P < 0,05$) do grupo controle positivo, no tempo de 24 HPE. Nos tempos de seis e 48 HPE, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle positivo e os outros grupos tratados com anti-inflamatório, não diferiram ($P < 0,05$) em nenhum tempo estudado.

A contagem diferencial de trombócitos no exsudato inflamatório revelou aumento significativo ($P < 0,05$) em pacus, tratados com os anti-inflamatórios, quando comparados do grupo controle negativo, com seis HPE (Tabela 8 e Figura 12). Sendo na comparação do grupo controle positivo, verificou-se que os animais tratados com anti-inflamatório apresentaram maior contagem no numero total de trombócito, entretanto, só os animais submetidos à dexametasona foram estatisticamente maior ($P < 0,05$) com seis HPE.

Com 24 HPE, houve máximo de acúmulo de trombócitos no grupo controle positivo, sendo estatisticamente superior ($P < 0,05$) que nos outros tempos (Tabela 8). Nesta fase da inflamação, todos os animais pré-tratados com anti-inflamatórios foram significativamente inferiores ao grupo controle positivo ($P > 0,05$).

Após 48 HPE, a comparação entre as médias de acúmulo de trombócitos não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos tratados e os peixes do grupo controle positivo. Os tratados com indometacina apresentaram aumento do número de células, entretanto, não diferiram estatisticamente dos valores observados após 24 HPE (Tabela 8).

Tab 8 - Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem de trombócitos presente no exsudato inflamatório de pacus desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Tratamento	Período pós-desafio		
	6 horas	24 horas	48 horas
Controle negativo	242,67 ± 63 Ca	152 ± 70,4 Da	136 ± 42 Ba
Controle positivo	337 ± 171 BCb	1019,3 ± 354 Aa	250,6 ± 65 ABb
Indometacina	438,8 ± 142 ABa	246 ± 38,2 CDb	334,5 ± 152 Aab
Meloxicam	472,2 ± 47 ABa	566,8 ± 287 Ba	160 ± 23 ABb
Dexametasona	529,5 ± 180 Aa	428,5 ± 210 BCa	165,2 ± 110 ABb

¹ Médias (n=6) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha a evolução do processo inflamatório entre os diferentes dias experimentais.

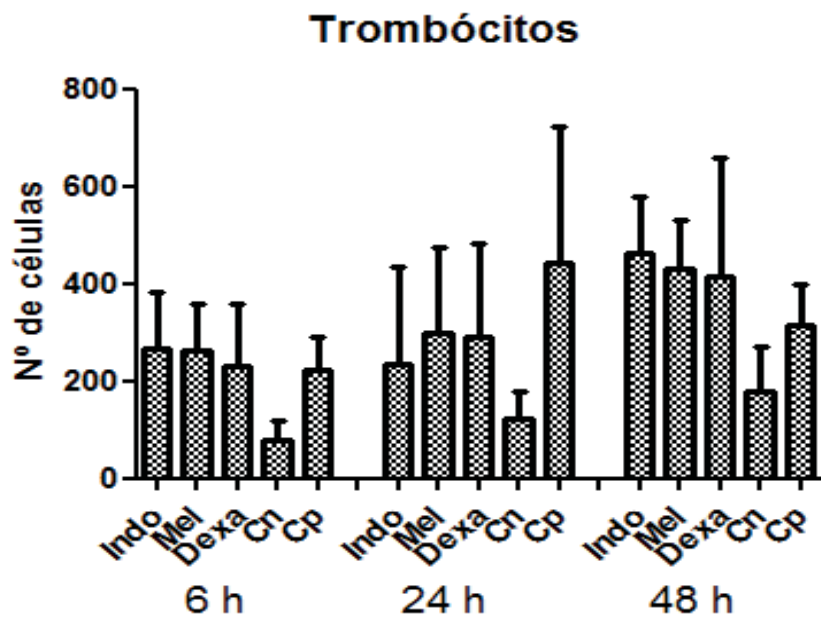


Fig. 12. – Valores médios expressos com a média ± desvio-padrão (N=6) da contagem de trombócitos absolutos presentes no exsudato após o estímulo inflamatório em pacus

A contagem de linfócitos apresentou acúmulo máximo com 24 HPE nos animais do grupo controle positivo, sendo significativamente maiores ($P < 0,05$) que no grupo injetado com salina e aos demais tratamentos (Tabela 9 e Figura 13).

Na análise dos animais tratados com anti-inflamatórios, nota-se que com seis HPE, os quais receberam meloxicam foi estatisticamente superior ao controle positivo. No tempo de 24 HPE, verificou-se que todas as drogas utilizadas inibiram significativamente o acúmulo de linfócitos no foco inflamado em relação ao grupo controle positivo. Com 48 HPE, verificou-se que nenhum grupo tratado com anti-inflamatório apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle positivo. Em todos os tempos estudados, observou-se -se que a dexametasona, não deferiu estatisticamente do grupo controle negativo (Tabela 9).

Tab 9 - Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem de linfócito presente no exsudato inflamatório de pacus desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Tratamento	Período pós-desafio		
	6 horas	24 horas	48 horas
Controle negativo	199,6 ± 83 Ca	286 ± 176 Ca	363 ± 120 Ba
Controle positivo	394 ± 81 BCb	1160 ± 635 Aa	673 ± 98 ABb
Indometacina	527 ± 194 Ba	608 ± 480 Ba	700,8 ± 230 Aa
Meloxicam	941 ± 127 Aa	812,6 ± 286 Bab	378,8 ± 59 ABb
Dexametasona	478,3 ± 164 BCab	553,5 ± 420 BCa	462,1 ± 229 ABb

¹ Médias (n=6) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha a evolução do processo inflamatório entre os diferentes dias experimentais.

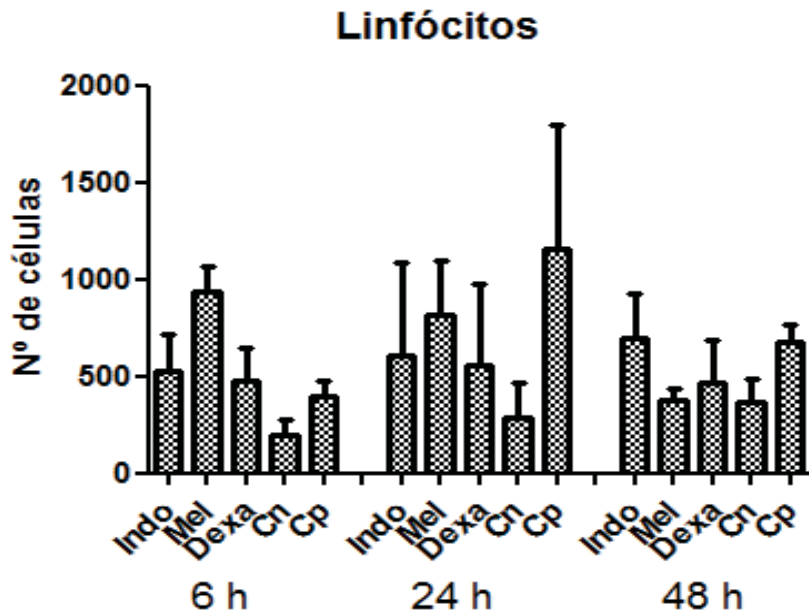


Fig. 13. – Valores médios expressos com a média \pm desvio-padrão (N=6) da contagem de linfócitos absolutos presentes no exsudato após o estímulo inflamatório em pacus

Na contagem de absoluta de macrófagos, notou-se que peixes do grupo controle positivo apresentaram aumento no acúmulo destas células 24 HPE, sendo estatisticamente superior ao grupo controle negativo e aos grupos tratados com dexametasona e indometacina. Nestes tratamentos, houve aumento significativo no acúmulo destas células com 48 HPE (Tabela 10).

O tratamento dos pacus com meloxicam revelou, contudo, a baixa atividade deste inibidor de ciclooxigenase sobre a exsudação de macrófagos para o foco inflamatório, pois em todos os períodos observados ocorreu aumento significativo ($P < 0,05$) na contagem destas células quando comparados aos peixes do grupo controle negativo. Além disso, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle positivo em todos os tempos estudados (Figura 14). Realmente mostra a baixa influencia do meloxicam no recrutamento de macrófagos.

Tab 10 - Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem de macrófago presente no exsudato inflamatório de pacus desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Tratamento	Período pós-desafio		
	6 horas	24 horas	48 horas
Controle negativo	63,5 ± 20 Ba	111,6 ± 53,6 Ca	94,67 ± 64 Ca
Controle positivo	132 ± 35 ABb	449,8 ± 306 Aa	361,2 ± 118 ABa
Indometacina	160,3 ± 47 ABb	169,3 ± 98,3 BCb	442,3 ± 129 ABa
Meloxicam	261,5 ± 58 Aa	354 ± 214 ABa	286,8 ± 78 Ba
Dexametasona	190 ± 131 ABb	208,6 ± 124 BCb	463,8 ± 197 Aa

¹ Médias (n=6) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada período, enquanto as letras minúsculas comparam na linha a evolução do processo inflamatório entre os diferentes dias experimentais.

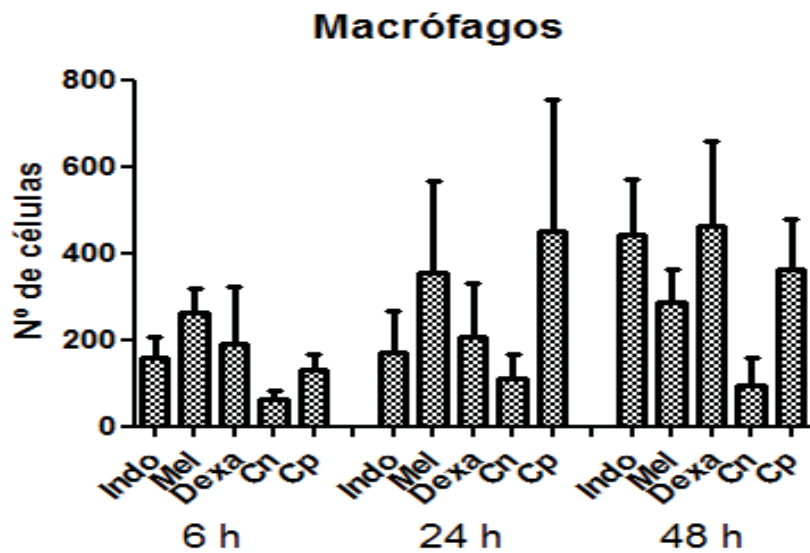


Fig. 14. — Valores médios expressos com a média ± desvio padrão (N=6) da contagem de macrófago absolutos presentes no exsudato após o estímulo inflamatório em pacus.

6. Discussão

Os dados do presente trabalho apoiaram as hipóteses formuladas sobre peixes, assim como em mamíferos e outras espécies, da ocorrência da participação de eicosanóides derivados do ácido araquidônico, que são dependentes da ação farmacológica da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase, na inflamação aguda.

No estudo da alteração de permeabilidade vascular, observou-se que, quando o azul de Evans foi administrado por via intravenosa, o corante difundiu-se de maneira sistêmica, evidenciado pela alteração da coloração dos lábios, olhos e outras partes da superfície do animal, que ficaram azuladas, após administração do corante, antes do estímulo inflamatório e do aumento de permeabilidade vascular.

Após a aplicação do estímulo lesivo, ocorreu aumento de permeabilidade vascular, sendo o fluído colhido e avaliado por espectrofotometria, como anteriormente observado por vários autores em diferentes espécies de animais, como em peixes (SUZUKI e HIBIYA, 1981b; MATSUYAMA e IIDA, 2001), em ratos (GARCIA LEME, 1973; MORAES e GARCIA LEME, 1982; BOLETA-CERANTO et al., 2005; NAGY et al., 2006), coelhos (GEHLEN et al., 2005), *Gallus Gallus* (HARA e MORAES, 1993). Neste contexto, o aumento da permeabilidade vascular ao azul de Evans indica a saída de proteínas plasmáticas.

Entretanto, neste ensaio, constatou-se uma resposta em fases distintas, uma observada 90 minutos após o estímulo, seguida por um leve decréscimo, porém atingindo o máximo do extravasamento com 180 MPE. Estes resultados estão parcialmente em concordância aos encontrados por MATSUYAMA e IIDA (2001), em tilápias do Nilo, na qual, foram observadas fases distintas da exsudação plasmática, com a primeira, imediatamente, após o estímulo, a segunda resposta, duas horas após, atingindo o máximo, após quatro horas. Por outro lado, tais resultados observados em peixes teleósteos diferem significativamente dos de mamíferos, em que se observa uma resposta com exsudação imediata, transitória e curta (MORAES e GARCIA LEME, 1982).

Da análise do grupo controle positivo, não foram observadas fases de resposta tão distintas quanto ao observado no trabalho de MATSUYAMA e IIDA (2001) e em

outras espécies, fato que pode ser explicado pelo tipo de estímulo utilizado, uma vez que em nosso estudo utilizou-se *A. hydrophila*, que por ser uma bactéria Gram negativa, possui LPS em sua parede celular (STOSKOPF, 1993), sendo responsável por desencadear a liberação de várias substâncias pró-inflamatórias, causadoras do choque endotóxico, principalmente pela liberação de TNF α e IL-1, que já foram descritos em várias espécies de peixes (JORGENSEN et al., 1973). Estas citocinas estimulam a síntese de PGI₂ e outros potentes mediadores vasodilatadores, tanto pelas células endoteliais, quanto por leucócitos (ADAMS E NASH, 1996; AKIRA et al., 1990). Tais fatores sugerem a hipótese de que o estímulo bacteriano tenha induzido uma resposta mais intensa nos pacus, não sendo observados decréscimos significativos durante o período analisado. Desta forma, o observado do processo exsudativo mais constante e intenso diferencia do tipo de exsudação observado por MATSUYAMA e IIDA (2001), que utilizou tilápias do Nilo, submetidas ao inóculo de mastócitos macerados.

Tomando como parâmetro contralateral, no grupo tratado com solução salina 0,65%, observou-se semelhanças aos de outras espécies citadas, com resposta em fases distintas. Nesse caso, é possível atribuir a primeira fase à lesão mecânica causada pela aplicação da solução na bexiga natatória e pela ação de histamina e a serotonina, pois a resposta foi observada em todos os grupos avaliados, já que anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais não interferem na ação desses mediadores. Assim, a primeira fase da resposta poderia se assemelhar ao observado em mamíferos, cuja resposta é multimediada e envolve a participação inicial da histamina e da serotonina armazenada nos grânulos de mastócitos (HAYASHI et al., 1964, NAGY et al., 2006).

Ainda da análise do grupo controle negativo, o extravasamento das proteínas plasmáticas pode ser explicado, pois, normalmente, ocorre o extravasamento destas pelo endotélio íntegro através de espaços interendoteliais que se abrem pela ação de mediadores químicos, observados em carpas, *Cyprinus carpio*, por SUZUKI e HIBIYA, em 1981.

Neste trabalho, observou-se até 90 MPE, que os grupos tratados com anti-inflamatórios não apresentaram diferença no caráter da resposta em relação ao grupo

controle positivo. Este efeito pode ser atribuído dois fatos: no início da reação ocorre vasodilatação e edema, causados pela ação de mediadores pré-formados e pelo reflexo axônico antidrômico, os quais também induzem a liberação e produção de outros mediadores (KUMAR et al., 2004) e, também, ao tempo insuficiente para a absorção e distribuição das drogas aplicadas.

Com a evolução da inflamação, 120 MPE, ocorre ativação de macrófagos, célula dendríticas via receptores “toll like” e outros receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos e/ou seus produtos, induzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1, mediadores lipídicos e outros (TAKEUCHI et al., 1999). Pela ação destes, segue a contração das células endoteliais, com aumento da permeabilidade vascular, observado no grupo controle positivo e nos tratados com anti-inflamatórios não esteroidais. No grupo tratado com DEXA, observou-se diminuição significativa em relação aos outros grupos, causada pelo espectro farmacológico mais amplo de ação do que o dos AINES (JERICÓ e ANDRADE, 2008). Os corticóides têm a capacidade de inibir a atividade da fosfolipase A2, que reduz a liberação do ácido araquidônico, levando a redução do substrato necessário para a geração de eicosanóides pelas vias da cicloxigenase e lipoxigenase (KUMAR et al., 2004; VALDOZENDE e BRASIL, 2005), suprimindo com isso a produção de PGs, TXAs, LTBs e ainda pelo bloqueio da liberação de citocinas pelos macrófagos (DINARELLO, 1984). A ineficácia do bloqueio das drogas não esteroidais neste tempo, não pode ser atribuída apenas ao tempo insuficiente da absorção, um fato adicional pode ser, que com o bloqueio da ciclooxigenase, ocorra aumento do substrato de AA disponível para a ação da lipoxigenases, com conseqüente aumento da liberação de seus mediadores, como LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄, causando aumento da permeabilidade vascular, uma vez que estes mediadores já foram identificados em diversas espécies de peixes (YAMAOKA et al., 1989; ANDREW et al., 1995).

A observação dos animais dos grupos pré- tratados com anti-inflamatórios, 180 MPE, em relação aos animais, não tratados e inoculados com bactéria, permite dizer que as prostaglandinas têm participação relevante na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Esta hipótese se baseia no fato de que nos animais tratados houve a redução significativa no extravasamento de proteínas plasmáticas, coincidindo

com o aumento no grupo controle positivo. Em diversas espécies de peixes e em mamíferos, foram descritas a presença de eicosanóides (ANDREW et al., 1995; THOMSON et al., 1998; FAST et al., 2005; FUJIMORI et al., 2011). Assim, a inibição da exsudação pode ser associada ao bloqueio da via ciclooxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, pelos anti-inflamatórios e a inibição da cascata do ácido araquidônico, TNF α , IL-1 e de outros mediadores pelo glicocorticóide. Entre as três diferentes doses de cada uma das drogas utilizadas, não foi observada diferença estatística, reforçando a idéia da participação destes mediadores no processo inflamatório de peixes como ocorre em mamíferos (KUMAR et al., 2004; VALDOZENDE e BRASIL, 2005) e demonstrando que dose mais baixa utilizada foi eficaz.

A observação de novo aumento, com 180 MPE, pode ser explicada pela diapedese de neutrófilos para a bexiga natatória, como verificado no estudo do acúmulo celular deste trabalho, causa a liberação mais tardia de outros fatores como as citocinas, leucotrienos, prostaglandinas, óxido nítrico e proteínas plasmáticas gerados pela seqüência de eventos que ocorrem na local inflamado (MATSUYAMA e IIDA, 2001; BOZZO et al., 2007) (GARCIA LEME, 1973; POBER E COTRAN, 1990).

A avaliação do acúmulo de células no foco inflamatório demonstrou que após a inoculação da *A. hydrophila* ocorreu inflamação, corroborando os resultados de BOZZO et al. (2007), REQUE et al. (2010) e CASTRO (2008) que utilizaram os mesmos agentes no mesmo modelo e com MATUSHIMA e MARIANO (1996) e MARTINS et al. (2006, 2008, 2009), usando carragenina. No presente estudo, o estímulo bacteriano inoculado na bexiga natatória foi capaz de desenvolver um processo inflamatório mais intenso em relação aos peixes que receberam solução salina em todos os tempos observados.

A interação entre leucócitos circulantes e as células do endoteliaias vasculares é fundamental na reposta inflamatória (KUMAR et al., 2004), e já foi bem documentada em mamíferos, sendo descritas diversas moléculas de adesão como selectina, ICAM-1, VCAM-1, expressas nas superfícies das células endoteliais e leucócitos, que contribuem para a adesão e a transmigração dessas células (CINES et al., 1998, KUMAR et al., 2004). Em peixes, não foram descritas moléculas de adesão em células do endotelio vascular, entretanto, resultados obtidos por MATSUYAMA e IIDA (2002),

indicam que, em tilápias do Nilo, as células do endotélio vascular expressam alguma molécula de adesão para leucócitos, após a aplicação de diferentes tipos de estímulos, porém sem caracterizá-la.

Então, parece haver semelhança na seqüência de eventos da reação inflamatória de mamíferos em relação à de peixes teleósteos, no que tange às alterações da permeabilidade vascular e acúmulo de células. Assim, a resposta inflamatória de pacus parece, também, estereotipada como a de mamíferos, caracterizando-se, basicamente, pela reação dos vasos sangüíneos, ação dos mediadores químicos (TNF α ; IL-1; PGs; PGI₂ e TXs) e acúmulo de fluidos e células sangüíneas. Fatos evidenciados neste ensaio pelo aumento da permeabilidade vascular e pelo acúmulo de células no exsudato de animais inoculados com bactéria em relação aos animais injetados com salina. Além disso, tanto o aumento de permeabilidade vascular como o acúmulo de células foi bloqueado pelo uso de drogas anti-inflamatórias.

Assim, o aumento da permeabilidade com 240 MPE e os resultados obtidos por BOZZO et al., 2007, constataram o aumento do número de células totais na bexiga natatória de pacus no mesmo tempo, utilizando o mesmo estímulo. Isto ressalta a hipótese de que as etapas da inflamação em teleósteos são similares as de mamíferos, ou seja, aumento da permeabilidade vascular, seguido da migração celular. Não há estudos sobre a diapedese em peixes, como há em mamíferos, entretanto, é evidente que o acúmulo das células no local da injúria ocorre por este mecanismo.

No ensaio do acúmulo celular, e mantendo a comparação com mamíferos, os resultados, ora encontrados, demonstram que, após o estímulo inflamatório, há o aumento do acúmulo celular no local da injúria, atingindo valores máximos 24 HPE, diminuindo-se, posteriormente, e isto corrobora com os dados de outros autores (BOZZO et al., 2007; MARTINS et al., 2007; CASTRO et al., 2008). A redução do acúmulo de células ocorre de maneira diferente entre as drogas utilizadas. A dexametasona bloqueia o acúmulo de células, graças a um espectro mais amplo de ação do que os AINES (GILMAN et al., 2010). Sua atividade inibitória decorre da indução da síntese de lipocortina capaz de inibir a síntese de PLA₂ e, conseqüentemente, dos principais derivados do AA (DI ROSE et al., 1985). Em peixes, este mecanismo ainda não está tão elucidado, mas foi descrita a presença de

mediadores derivados do AA, como prostaglandinas e leucotrienos (ROWLEY *et al.*, 1987; PETTITT E ROWLEY, 1991), a presença ciclooxygenase e sua participação da mediação da síntese das PGs, TXs e PGI₂ (THOMSON *et al.*, 1998, FIJIMORI, 2011) e genes responsáveis pela expressão de PGE₂ em macrófagos de salmão, *Salmo salar*, (FAST *et al.*, 2005). Estas observações servem de base para o entendimento do processo de inibição do acúmulo de células pelo bloqueio da via do AA, através da ação da dexametasona, e que os grupos tratados com os AINES a inibição ocorre pelo bloqueio da ciclooxygenase.

A diferença entre o potencial de ação dos anti-inflamatórios é evidenciada com 24 HPE, onde a indometacina apresentou maior potencial anti-edematoso do que o meloxicam, pois a indometacina ter ação anti-inflamatória e anti-edematosa 20 vezes mais potente que o meloxicam (CHAJETAS *et al.*, 1982).

Ao contrário do observado com 24 HPE, com 48 HPE, nenhum dos grupos tratados diferiu significativamente do grupo controle positivo, podendo ser decorrente de dois fatos: neste tempo ocorreu uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na contagem celular do exsudato do grupo controle positivo e ao outro fato que sugere a hipótese de que houve estímulo para o recrutamento celular, porém, os fenômenos envolvidos na marginação, diapedese, quimiotaxia que culminam com o acúmulo de células no foco lesado foram bloqueados pela ação destes anti-inflamatórios, ocorrendo a migração mais tardiamente, após os fármacos sofrerem depuração, com conseqüente fim e/ou diminuição do bloqueio.

Quanto a constituição do componente celular em peixes, há controvérsia na literatura (BOZZO *et al.*, 2007) e há escassez de literatura quanto a estimulação pelos eicosanóides dos diferentes tipos de leucócitos na migração celular.

Os resultados da contagem diferencial mostraram amplo predomínio de trombócitos e linfócitos, seguidos de granulócitos e macrófagos, no início da inflamação dos animais, não tratados, e inoculados com bactéria. Estes resultados corroboram parcialmente com os resultados de BOZZO *et al.* (2007 e 2008) e CASTRO *et al.* (2008) que utilizaram o mesmo estímulo, diferindo dos encontrados por MATUSHIMA e MARIANO (1996), em tilápia do Nilo e por MARTINS (2000), em pacus, que utilizaram como estímulo a carragenina na bexiga natatória, provocando maior acúmulo de

trombócitos (média 65%), seguido de macrófagos (20% média) e pouca quantidade de linfócitos e granulócitos. Em kinguio, *Carassius auratus*, estimulados com sílica 2% IM, verificou-se maior contagem de linfócitos e macrófagos (JANSSON e WAALER, 1967) e em tilápia do Nilo, injetadas com parafina líquida na cavidade visceral, constatou-se a presença de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos no foco inflamatório (SUZUKI, 1986).

Notam-se na literatura certas divergências de resultados quanto à constituição do componente celular em peixes. BOZZO et al. (2007), atribuiu este fato a diferentes espécies de peixe estudadas e métodos de indução, colheita, preservação, identificação e contagem de células presente no exsudato. No entanto, é possível acrescentar, a esta controversa, a natureza do estímulo utilizado, principal fator de determinação do tipo de célula que estará presente no foco lesado.

Pela análise da cinética dos leucócitos, após 24 HPE, observou-se predomínio de linfócitos e trombócitos com aumento significativo na contagem de macrófagos e granulócitos no foco inflamatório, similares aos obtidos por BOZZO et al. (2007).

Estes resultados nos mostram que em estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios as células predominantes no foco inflamado são os trombócitos e os linfócitos. Com o passar do tempo surgem macrófagos e granulócitos. Em mamíferos atribui-se o retardo do surgimento de mononucleares sua menor velocidade de migração e à vida média mais curta de granulócitos (24 horas) (KUMAR et al., 2004).

Neste ensaio, o pré-tratamento dos pacus com indometacina e dexametasona com 24 HPE, todas as células observadas apresentavam-se em menor número ($P < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle positivo. Nos animais tratados com meloxicam, o macrófago foi à única célula que não apresentou diferença significativa em relação aos animais desafiados com bactéria e não tratados. A explicação proposta para este efeito pode ser atribuído à farmacocinética e a farmacodinâmica dos fármacos utilizados. Como já mencionado, em peixes já foram identificados diversos mediadores químicos, com destaque para os estudos de PGs (PETTITT et al., 1991; ROWLEY et al., 1994; FUJIMORI et al., 2011), PGIs (THOMSON, et al., 1998), TXs (THOMSON, et al., 1998) e LTs (ROWLEY et al., 1987; PETTITT e ROWLEY, 1991).

Assim, atribui-se à ação da inibição indireta da dexametasona à PLA2 (DI ROSE et al., 1985) e a inibição competitiva reversível da COX ,juntamente com a inibição da

mobilidade de polimorfonucleares da indometacina (GILMAN et al., 2010), ao efeito sobre o bloqueio dos leucócitos. Em relação a não inibição do acúmulo de macrófagos em todos os tempos analisados na comparação com o grupo controle positivo, justifica-se porque o meloxicam possui atividade de inibição competitiva reversível rápida e seletiva para COX-2 (HAKAN et al., 2008; GILMAN et al., 2010), fazendo com que a inibição seja de um modo mais curto e de menor intensidade, sabendo que as outras drogas utilizadas possuem ação farmacológica mais intensa e mais ampla. Resultados de autores como MCLEAY (1973), ROBERTSON et al. (1963) que estudaram em peixes o efeito da dexametasona, constatando um linfopenia e uma trombocitopenia em animais tratados. Estudos de THOMSON et al., em 1998, em peixes demonstraram a inibição da ciclooxygenase pela ação da indometacina, fortalecendo a idéia da participação dos eicosanóides no acúmulo de células da inflamação.

Os resultados apresentados por este trabalho sugerem a participação dos eicosanóides e de outros mediadores que são bloqueados pelos fármacos utilizados na reação inflamatória, induzida pela *Aeromonas hydrophila* em pacus.

7. Conclusões

Os resultados obtidos deste trabalho permitem concluir que:

- O aumento da permeabilidade vascular, induzida pela *A. hydrophila* em pacu foi multifásico e atingiu o máximo da exsudação com 180 minutos após o estímulo inflamatório;
- Os anti-inflamatórios no pré-tratamento dos pacus foram eficazes no bloqueio do aumento da permeabilidade vascular, 180 minutos pós-estímulo. Entretanto, os efeitos das diferentes doses de cada uma das drogas testadas não apresentaram diferença significativa entre si, ou seja, as doses crescentes não apresentaram relação dose-dependente;
- O influxo de leucócitos para a cavidade da bexiga natatória atingiu valores máximos com 24 horas após o estímulo, diminuindo posteriormente. Na contagem diferencial, linfócitos e trombócitos predominaram seguidos de macrófagos e granulócitos, apresentando, estes últimos, um acúmulo mais tardio;
- Dos anti-inflamatórios testados, todos inibiram de maneira significativa o acúmulo de leucócitos para a cavidade, após 24 horas de estímulo. Os efeitos das diferentes doses de cada uma das drogas testadas não apresentaram diferença significativa entre si. A indometacina e a dexametasona inibiram o acúmulo dos diferentes tipos de células analisadas com 24 horas pós-estímulo.

8. Referências Bibliográficas

ABE, T.; HAYASAKA, Y.; ZHANG, X.; HAYASAKA, S. Effects of intravenous administration of FR122047 (a selective cyclooxygenase 1 inhibitor) and FR188582 (a selective cyclooxygenase 2 inhibitor) on prostaglandin E2 – induced aqueous flare elevation in pigmented rabbits. **Ophthalmic Research**, New York, v.36, n.6, p.321-326, 2004.

ABEYTA JR, C., KAYSNER C.A., WEKELL M.M., SULLIVAN STELMA, G.N. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an. Recuperação de *Aeromonas hydrophila* de ostras implicado em um outbreak of foodborne illness. surto de doenças transmitidas por alimentos. **Journal of Food Protection**; 49: 643-646. 1989.

ADAMS D.H., NASH G.B. Disturbance of leucocyte circulation and adhesion to the endothelium as factors in circulatory pathology. **Br J Anaesth**, v.77, p. 17-31, 1996.

ANDREW F. R, KNIGHT J., PAUL L.E, HOLLAND W.J, PHILIP J. V. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish--a brief overview. **Fish e Shellfish Immunology**. v.5, p.549-567, 1995.

ANNE. K.; JURAJ I.A.;JOHN E.K. The effects of indomethacin on t lymphocyte stimulation. **Ihnmunology Letters**. v. 8, p. 301-305, 1994.

ALVAREZ-PELLITERO, P., PALENZUELA, O., SITJA` -BOBADILLA, A. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). **Parasitol. Int.** 57, p. 110–120, 2008.

ALVAREZ-PELLITERO, P., QUIROGA, M.I., SITJA` BOBADILLA, A., RODONDO, M.J., PALENZUELA, O., PADRO´ S, F., VA´ ZQUEZ, S., NIETO, J.M., *Cryptosporidium scoththalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus*

maximus. Light and electron microscope description and histopathological study. **Dis. Aquat. Organ.** v. 62, p. 133–145. 2004a.

AKIRA S., HIRANO T., TAGA T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB J**, v.4, p. 2860-2867, 1990.

AUSTIN, B; AUSTIN, D. A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. **Ellis Horwood Limited**, New York, p.171-173, 1987.

BACCARO M.R, MARIANO M, MALUCELLI B.E. Chronically inflamed tissue activates plasma mediators of vascular permeability. **Braz. J Med Biol Res**;23:179-85; 1990.

BELO, M. A. A. **Efeito do estresse 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.** 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

BEZUGLA Y, KOLADA A, KAMIONKA S, BERNARD B, SCHEIBE R, DIETER P. COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE2 and TxA2 in liver macrophages. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**;79:93–100, 2006.

BOLETA-CERANTO D. C. F; VEIGA, M.C.F. A; ARSATI, F. Efeito da dexametasona e do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido por carragenina na atm de ratos. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 20, n. 50, out./dez. 2005.

BOGAN, V.A.; LEES, P.; VON ALL, A.T. Anti-inflammatory agents. In: Pharmacological bass of large animal medicine. **Blackwell Publication: Oxford**. v.19, p.319-417, 1983.

BOOTHE, D.M. Drogas analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias. In: ADAMS, H.R. **Farmacologia e Terapêutica Veterinária**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.22. p.361-375, 2003.

BOYNTON, C.S.; DICK, C.F.; MAYOR, G.H. NSAIDs: an overview. **Journal Clinical Pharmacology**, v.28, p.512-517, 1988.

BOZZO, F.R. **Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato em *Piaractus mesopotamicus* suplementados com vitaminas C, E ou sua associação**. 2007. 78 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 2008.

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**, Baton Rouge, v. 38, n. 2, p.302-308, 2007.

BRAINARD, B.M.; MEREDITH, C.P.; CALLAN, M.B.; BUDSBERG, S.C.; SHOFER, F.C.; DRIESSEN, B.; OTTO, C.M. Changes in platelet function, hemostasis, and prostaglandin expression after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs with various cyclooxygenase selectivities in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg**, v.230, n.5, p.689-689, 2007.

BRASIL L.A.; GOMES W.J.; SALOMÃO R.; FONSECA J.H.P.; BRANCO J.N.R.; BUFFOLO E. Uso do corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. **Rev Bras Cir Cardiovasc** vol.14 n.3 São Paulo July, 1999

BROCK TG, MCNISH RW, PETERS-GOLDEN M. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. **J Biol Chem**, 274:11660–6, 1999.

BRUNE K., HINZ B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. **Scand J Rheumatol**. v. 33, p. 1-6, 2004.

BUCHMANN, K., LINDENSTRØM, T., BRESCIANI, J. Defence mechanisms against parasites in fish and the prospect for vaccines. **Acta Parasitol**. 46, 71–81, 2001a.

BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *sobria* como intoxicação alimentar espécies potenciais. revisão. **J. Food Saf. J. Saf Alimentar**. v. 7, p. 15–29, 1985.

BUSCH, U., SCHMID, J., HEINZEL, G., SCHMAUS, H., BAIERL, J., HUBER, C., ROTH, W. Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. **Drug Metabol. Dispos.**, v. 26, p. 576-84, 2002.

BUTTGEREIT F, BRAND M.D; BRUTMESTER G.R. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. **Biochem Pharmacol**, v. 58, p. 363-8, 1999.

CANOVA G.C; TAVEIRA L.A.A; DEZAN JUNIOR E; NISHIYAMA C.K; SPALDING M. Estudo do poder flogógeno de quatro cimentos obturadores de canais radiculares por meio do teste edemogênico. **Rev Fac Odontol Bauru**; v. 10, p. 128-33, 2002.

CAPDEVILA JH, FALCK JR, DISHMAN E, KARARA A. Cytochrome P-450 arachidonate oxygenase. **Methods Enzymol** v. 187, p. 385–94, 1990.

CASTELLS A.; BALAGUER F.; GONZALO V.; CASTELLVÍ-BEL S. Ciclooxigenasa 2 y cáncer colorrectal: implicaciones terapêuticas **Gastroenterol Hepatol.** v. 30, p.280-4, 2007.

CASTRO, M.P. **Desempenho produtivo e resposta inflamatória de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente.** 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 2008.

CHAJETAS D.; ARIMORI H.; OLIVEIRA L.P.; SCHOENWETTER M.L.F.; SHINMYO S.S; MERCANTE E.W.; HAMA OVI A. Efeito da indometacina sobre a região glandular gástrica de ratas fêmeas agrupadas e não. **Arq. Méd. ABC** 5(1-2); 25-28, 1982.

CHENG H.F; HARRIS R.C. Cyclooxygenase, the kidney and hypertension. **Hypertension**, v. 43, p. 525-30, 2004.

CLARK, J.O. Analgesia. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v.15, n.3, p.705-723, 1999.

COLLINS, B.K.; MOORE, C.P. Diseases and surgery of the canine uvea. *In: Veterinary ophthalmology* GEATT, K.N. 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, p.755-795,1999.

COLONNA M, PULENDRAN B, IWASAKI A. Dendritic cells at the hostpathogen interface. **Nature Immunology**, v.7(2), p.117-120, 2006.

CONGLETON, J.; WAGNER, E. Acute-phase hypoferremic response to lipopolysaccharide in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 98^a, n.2, p. 195-200, 1991.

CONTRAN; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 4^a. Elsevier., 49pp. 2004.

CÔTHÈ, E. Over-the-counter human medications in small animals. Part II. Analgesic, respiratory, and dermatologic drugs. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.20, n.7, p.791-808, 1998.

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

DYKOVA´, I. Phylum microspora. In: Woo, P.T.K. (Ed.), Fish Diseases and Disorders, vol. 1, Protozoan and Metazoan Infections. **CABI Publishing**, New York, pp. 149–179. 1999.

DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GINSBERG, H. S. **Microbiology**. New york, 4. ed. Philadelphia: Kyoto, cap. 27, p. 561-587, 1990.

DELAUNAY, A.; PAGES, T. L´inhibition de la deapedese par les endotoxines bacteriennes et son mecanisme. **Ann Inst.Pasteur**, Paris, v.71, p. 431-9, 1945.

DEWITT DL, SMITH WL. Purification of prostacyclin synthase from bovine aorta by immunoaffinity chromatography. Evidence that the enzyme is a hemoprotein. **J Biol Chem**, v. 258, p.3285–93, 1983

DI ROSE et al. Controlo f inflammation by glicocorticóide. **Agents Actions**, Basal, v 17, p.284-289, 1985.

DUBOIS R.N.; ABRAMSON S.B.; CROFFORD L.; GUPTA R.A.; SIMON L.S.; VAN P.L. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J**.12:1063-73, 1998.

ENGELHARDT G, BOGEL R, SCHNITZLER C. Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part II. *In vivo* findings. **Biochem Pharmacol**, v. 5, p.29–38, 1996.

FAMAHEY J.P. In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: and overview. **Inflamm Res**. 46:437-46, 1997.

FASTA, M.D., ROSSB, N.W., JOHNSONB S.C. Prostaglandin E2 modulation of gene expression in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage-like cell line (SHK-1). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 951–963, 2005.

FERIA, M. Farmacos analgésicos antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. In: FLORES, J. **Farmacología Humana**. Masson: Barcelona, p.355-387, 1998.

FINN, J. P. The protective mechanisms in diseases of fish. **Veterinary Bulletin**, Farshan Royal, v. 40, n. 12, p. 873-886, 1970.

FORTES B.Z; NIGRO D. Aspectos farmacológicos da interação antihipertensivos e anti-inflamatórios não-esteróides. **Rev Bras Hipertens** vol.12(2): 108-111, 2005.

FREEDMAN, F. B.; JOHNSON, J. Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. **Am J of Physiol.**, Bethesda, v. 16, p. 675-681, 1969.

FREUNDENBERG, M.A. The fate of lipopolisaccharides in rats: evidence fo chemical alteration in the molecule. **Rev. Infect Dis.**, Louvain, v.6, p. 483-7, 1984.

FUJIMORIA C., OGIWARAA K., HAGIWARAA A., RAJAPAKSEB S., KIMURAA A., TAKAHASHIA T. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: Possible involvement in ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 332, p. 67–77, 2011.

FU J.Y, MEEDLEMAN P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J Biol Chem**; 265(28), 16737-40, 1990

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

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

GEHLEN, M. L. **Avaliação espectrofotométrica do azul de Evans na reação inflamatória da córnea: estudo experimental em coelhos**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2001.

GIARDIELLO F.M.; HAMILTON S.R.; KRUSH A.J, PIANTADOS S. I.; HYLIND L.M.; CELANO P.; BOOKER S.V.; ROBINSON C.R.; OFFERHAUS G.J. A Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis, N. **Engl. J. Med.** v. 328, p. 1313–1316, 1993.

GILMAN A.G.; The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11^a, Guanabara e Koogan, 395 pp. 2010.

GOTH, A. Indometacina. In: **Farmacologia Médica**. N. 3, p.296, 1978.

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

GRAHAM M.P.; JAMES L.H. Meloxicam selectively depresses the afterdischarge of rat spinal dorsal horn neurones in response to noxious stimulation. **Neuroscience Letters** v. 305, p. 45±48, 2001.

GRIFFIN, P. J.; SNIETSKO, S. F.; FRIDDLE, S. B. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. **Transaction of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 129-138, 1953.

HAYASHI H, FUJII Y, WATANABE K, URADE Y, HAYAISHI O. Enzymatic conversion of prostaglandin H₂ to prostaglandin F₂ alpha by aldehyde reductase from human liver: comparison to the prostaglandin F synthetase from bovine lung. **J Biol Chem**, 264, p. 1036–40, 1989

HARAS C. M. **Cinética das alterações vasculares e celulares na peritonite induzida pela carragenina em *Gallus gallus*. Efeito de drogas antiinflamatória esferoidais e não-esteroidais**. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 1993.

HAKAN T.; BERKMAN M.Z; ERSOY T.; KARATAS I.. Anti-inflammatory effect of meloxicam on experimental vasospasm in the rat femoral artery. **Journal of Clinical Neuroscience** v.15, p.55–59, 2008.

HAYASHI, H., YOSHINAGA, M., KOONO, M., MIYOSHI, H., MATSUMURA, M. Endogenous permeability factors and their inhibitors affecting vascular permeability in cutaneous arthus reactions and thermal injury. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 45, p. 419–435, 1964.

HENRIQUE M.G.M.O, et al. Mouse paw edema, anew model for inflammation? **Brazilian J. med Bio Res**. Ribeirão Preto, n20, p. 243-249, 1987.

HILÁRIOI M.O. E; TERRERIII M.T; LENIII C.A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **J. Pediatr.** (Rio J.) vol.82 no.5, Porto Alegre Nov. 2006.

HLA, T.; NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89 7384±7388, 1992.

INÁCIO R.C. **Avaliação do hemograma e do estado nutricional como marcadores de progressão de baixo custo em crianças e adolescentes infectados pelo hiv-1 atendidos em centro de referência em belo horizonte.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

INSEL, P.A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed the treatment of gout. *In*: GILMAN, A., GOODMAN, L.S. **Goodman e Gilman: the pharmacology basis of therapeutic.** 9th ed. New York : MacGraw-Hill, p. 617-656, 1995.

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

JAKOBSSON PJ, THOREN S, MORGENSTERN R, SAMUELSSON B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96:7220–5, 1999

JERICÓ, M. M., ANDRADE, S.F. Anti-inflamatórios. *In*: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária.** 3 ed. São Paulo: Roca. p.115-140. 2008.

JOHNSTON, M.S. Clinical approaches to analgesia in ferrets and rabbits. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine** 14, 229–235 2005.

KATZENBACK, B.A., BELOSEVIC, M. Molecular and functional characterization of *kita* and *kita* of the goldfish (*Carassius auratus* L.). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p.1165-1175, 2009.

KEIKO O.; HATANAKA K.; KAWAMURA M.; Katori M.; Harada Y. Evaluation of Pharmacological Profile of Meloxicam as an Anti-Inflammatory Agent, with Particular Reference to Its Relative Selectivity for Cyclooxygenase-2 Over Cyclooxygenase. **Pharmacology**. v. 55, n 1.1997

KLONTZ, G.W.; YASUTAKE, W.T.; ROSS, A.J. Bacterial diseases of the Salmonidae in the Western United States: pathogenesis of furunculosis in rainbow trout. **Amer. J. Vet.Res.**, Schaumburg, v.27, p. 1455-1460, 1966.

KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F.F.A.C. Dicionário terapêutico Guanabara. Rio de Janeiro: **Guanabara. Koogan**, 2001-2002.

LEVEEN H.H; FISHMAN W.H. Combination of Evans blue with plasma protein: its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. **Am J Physiol**; 26:26-33. 1947

LINDERKAMP O.; MADER T.; BUTENANDT O.; RIEGEL KP. Plasma volume estimation in severely ill infants and children using a simplified Evans blue method. **Eur J Pediatr**; 125:135-41, 1977

LIONZO, M.I.Z. **Micropartículas de p (hbhv) e de blenda de p (hbhv): p.c.l. Contendo dexametasona ou acetato de dexametasona como modelo de fármacos: características físico-químicas e perfil de liberação *in vitro***. 2006 – XIX. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacológica). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LITALIEN, C.; JACQZ-AIGRAIN E. Risks and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in children: a comparison with paracetamol. **Paediatr Drugs**; 3:817-58, 2001

MACARTHUR, J. I.; FLETCHER, T. C.; PIRIE, B. J. S.; DAVISON, R. J. L.; THOMSON, A. W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal Fish Biology**, London, v. 25, n. 1, p. 69-81, 1984.

MCCARTHY, J. JURAJ I.; JOHN E.K. The effects of indomethacin on T lymphocyte stimulation **Adv. Paediat.** 25, 121-149. 1978.

MACMILLAN, J. Infections diseases. In: Tucker, C.S. (Ed.). **Channel catfish culture**. Amsterdam, Netherlando: Elsevier,p. 405-496, 1985.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, Tissues and Diseases. Principles of general pathology**. Ed. Blackwell Sci., Massachusetts, 974p. 1996.

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

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

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.C. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum**, 22 (2), 545-552, 2000.

MATHEWS, K.A. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesics to manage acute pain in dogs and cats. **Compendium of Continuing Education for Practicing Veterinarian**, v.18, n.10, p.1117-1123, 1996.

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

MATSUYAMA T., IIDA T. Influence of tilapia mast cell lysate on vascular permeability. **Fish e Shellfish Immunology**, v. 11, p. 549–556, 2001.

MATSUYAMA T., IIDA T. Tilapia mast cell lysates enhance neutrophil adhesion to cultured vascular endothelial cells. **Fish e Shellfish Immunology**, v. 13, p. 243–250, 2002.

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.

McLEAY, D. J. Effects of ACTH on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 21, 431-440, 1973.

MESNIL, F. Sur le mode des resistance des vertebrades inferieures aux invasions microfiennes. **Annals of Institute Pasteur**, Paris, v. 2, p. 301-11, 1985.

METCHNIKOFF, E. 1891. **Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at Pasteur Institute in 1891**. Dover, New York , republished in, 218 pp, 1991

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

METCHNIKOFF, O. **Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891**. Kegan, Paul, Trench, Trübner e Co., 218 p, 1893.

METCHNIKOFF, O. **Life of Elie Metchnikoff, 1845-1916**. Books for Librarie Press, Freeport, New York, 297pp. 1921.

MOLLNES T.E; SONG W.C; LAMBRIS J.D. Complement in inflammatory tissue damage and disease. **Trends in immunology**; 23(2):61-4, 2002.

MOON R.C.; KELLOFF G.J.; DETRISAC C.J.; STEELE V.E.; THOMAS C.F.; SIGMAN C.C. Chemoprevention of OH-BBNinduced bladder cancer in mice by piroxicam, *Carcinogenesis* 14 1487–1489, 1993.

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

MORAES, F.R.; GARCIA LEME, J. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. **Microvascular Research.**, v.23, p.281-3, 1982.

MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MACORIS, E.A. Diabetic rats are hyporeactive to non-steroidal but not to steroidal anti-inflammatory drugs: Effect on cell migration. **Braz.j. vet. Res. Anim. Sci.**, v.32 n.3, p. 149-154, 1995.

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

NAGY J.A., FENG, D., VASILE E.Z., WONG W.H., SHU-CHING S., DVORAK M.A., DVORAK, H.F. Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. **Laboratory Investigation**, v.86, 767–780, 2006.

NGUYEN H.; LIM J.; DRESNER M.L.; NIXON B.; Effect of local corticosteroids on early inflammatory function in surgical wound of rats. **J Foot Ankle Surg.** 37:313-8, 1998.

OGINO, K.; HATANAKA K.; KAWAMURA M.; KATORI M.; HARADA Y. Evaluation of pharmacological profile of meloxicam as an anti-inflammatory agent, with particular reference to its relative selectivity for cyclooxygenase-2 over cyclooxygenase-1, **Pharmacology**, 55 44±53, 1997.

OLIVERA, W. AINES seguridad y eficacia, calmar o no calmar es el dilema. Novedades em Analgesia. **El Diário Medico**, p.4, 2004

OGINO K, HATANAKA K, KAWAMURA M, et al. Evaluation of pharmacological profile of meloxicam as an anti-inflammatory agent, with particular reference to its relative selectivity for cyclooxygenase-2 over cyclooxygenase-1. **Pharmacology**; 55:44–53, 1997

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. ; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de Peixes**: profilaxia diagnóstico e tratamento. Maringá: EDUEM: 264 p, 1999.

PECOITS-FILHO, R.S; PETER L; BENGTT B; JONAS N, IRENE A.H. Revisão: Desnutrição, inflamação e aterosclerose (síndrome MIA) em pacientes portadores de insuficiência renal crônica / Malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA syndrome) in chronic renal failure patients. **J. Bra. nefrol**;24(3):136-46, set. 2002.

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

PIPER P, VANE J. The release of prostaglandins from lung and other tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 180:363–85, 1971.

PETTITT, T. R., ROWLEY, A. F., BARROW, S. E., MALLET, A. I. E SECOMBES, C. J. Synthesis of lipoxins and other lipoxygenase products by macrophages from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Biological Chemistry** v. 266, p.8720-8726, 1991.

PETTITT, T. R., ROWLEY, A. F. Fatty acid composition and lipoxygenase metabolism in blood cells of the lesser spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 99B, p.647-652, 1991.

POPE C.E., TAYLOR G.W., ROWLEY A.F. Biosynthesis and functions of eicosanoids generated by the coelomocytes of the starfish, *Asterias rubens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 147, p. 657–666, 2007.

POPOFF, M. III Genus *Aeromonas* Kluver e van Niel, 1936. In Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology** , vol. 1 ed. 1 ed. Krieg, NR and Holt, JG pp. 545–548, 1984.

RAMALHO, F.S.; A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. **Acta Cir. Bras.** vol.15 suppl.2 São Paulo 2000.

RAWSON, R. A. The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. **Am J of Physiol.**, Bethesda, v. 138, p. 708-717, 1943.

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** (Amsterdam), v. 300, p. 37-42, 2010.

RIBEIRO, A.P. **Efeitos do meloxicam e do carprofeno administrados por diferentes vias no controle da uveíte em cães (canis familiaris – linnaeus, 1758)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2007.

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

ROWLEY, A. F. Lipoxin formation in fish leucocytes. **Biochimica et Biophysica Acta.** n. 1084, p. 303-306, 1991.

RYAN, G.B., MAJNO, G. Acute inflammation. **Am. J. Pathol.**, Hagerstown, v.86, p.184-276, 1977.

SALIDO, M.; ABÁSULO, L.; BAÑARES, A. Revisión de los anti-inflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 **Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud.** v.25, n.2, p.46-52, 2001.

SAMUELSSON B, DAHLEN SE, LINDGREN JA, ROUZER CA, SERHAN CN, et al. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**;237:1171–6, 1987.

SAKABE, R. **Suplementação alimentar com ácidos graxos essencial para Tilápia do Nilo: Desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho**. 2007. f.78. Dissertação - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal – SP, 2007.

SALMELA K. Comparison of the effects of methylprednisolone and hydrocortisone on granulation tissue development: a experimental study in rat. **Scand J Plast Reconstr Surg.**15:87-91, 1981.

SARLIS, N. J.; BAYLY, S. F.; SZAPARY, D.; SIMONS, S. S. Quantity of partial agonist activity for antiglucocorticoids complexed with mutant receptor is constant in two different transactivation assays but not predictable from steroids structure. **J. Of Steroid Biochem, Molec. Biol.** v.68 n.3-4, p-89-102, 1999.

SECOMBES, C. J., CLEMENTS, K., ASHTON, I. E ROWLEY, A. F. The effect of eicosanoids on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, leucocyte proliferation. **Veterinary Immunology e Immunopathology**, v.42, p.367-378, 1994).

SERHAN CN, HAMBERG M, SAMUELSSON B. TRIHYDROXYTETRAENES: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, 118:943–9, 1984.

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

SINHA, B.K.; VEGAD, J.L; AWADHIYA, R.P. Estimation of increased vascular permeability in avian inflammation. **Indian Vet. J.**, Madras, v.64, p. 269-73, 1987.

SHIMIZU T, YAMAMOTO S, HAYAISHI O. Purification of PGH-PGD isomerase from rat brain. *Methods Enzymol* 1982;86:73–7. **Rev. Fac. odontol. Bauru**; 5(3/4):1-8, jul.-dez. 1997.

SCHUTZ A.B.; TAGA E.M.; CONSOLARO A.; GUIMARÃES S.A.C. Estudo comparativo dos efeitos biológicos do tenoxicam, indometacina, dexametasona e metotrexato em granulomas induzidos pela placa microbiana dental. **Rev. Fac. odontol. Bauru**, 5(3/4):1-8, jul.-dez. 1997.

SILVEIRA M.; YOSHIDA W.B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **J Vasc Br**;3(4):367-78, 2004.

SWAIN P., S.K. NAYAK, NANDA P.K., DASH S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review P. **Fish e Shellfish Immunology**. v.25, p.191-201, 2008.

STEELE, R. H.; WILHELM, D. L. The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. **Brit. J of Experim Pathol.**, London, v. 47, p. 612-623, 1966.

STICHTENOTH D.O.; WAGNER B.; FRÖLICH J.C. Effects of meloxicam and indomethacin on cyclooxygenase pathways in healthy volunteers. **J Investig Med**. Feb;45(2):44-9, 1997.

STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, p.269-277, 1993.

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

SUZUKI, Y., HIBIYA, T. Effect of increased vascular permeability on tissue fluid protein composition in inflammation of fish. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 47, p. 329–331, 1981b.

VALDOZENDE F; BRASIL A.M.A.A. Glicocorticóides e sintomas de humor. **Rev Psiquiatria** RS maio/ago;27(2):177-186, 2005.

WALLNER B.P. et al. Cloning and expression of humor lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potent anti-inflammatory activity. **Nature**, London, v320, n 6057, p.77-81, mar. 1986.

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

WELLER, M.; SCHMIDT, C.; ROTH, W.; DICHANS, J. Chemotherapy of human malignant glioma: prevention of efficacy by dexamethasone. **J. Neurology**. v.48, p-1704-1709, 1997.

WILLIAMS H.J.; CLEGS D.O. Basic therapy of rheumatoid arthritis; nonsteroidal anti inflammatory drugs. **Compr Ther** 16:58-64, 1990.

WHITE, A.; MACARTHUR, J.; FLETCHER, T. Distribution of endotoxin and its effect on serum concentration of C reactive protein and cortisol in the plaice. **Comp.Biochem.Physiol.**, Carlton, v.79C, p. 97-101, 1984.

WOODS K.L.; SMITH L.J.; GRAHAM D.Y.; Intra gastric accumulation of Evans blue dye as a method for assessing aspirin-induced acute gastric mucosal injury in humans. **Dig Dis Sci**;33:769-73, 1988.

TAKEUCHI, O., et al., Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. n 11, v.4, p. 443-51, 1999.

TANAKA Y, WARD SL, SMITH WL. Immunochemical and kinetic evidence for two different prostaglandin H-prostaglandin E isomerases in sheep vesicular gland microsomes. **J Biol Chem**; 262:1374–81, 1987.

TASAKA, A.C. Anti-inflamatórios não esteroidais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 21, p.225- 250, 2002.

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

TAUBER, A.I. The immune self: theory or metaphor? **Immunology Today**, 15(3): 134-136. 1994.

TENIUS F.P.; BIONDO-SIMÕES M.L.; MULOSHII O.S. Efeito do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **An Brás Dermatol.**;82(2): 141-9, 2007.

THAI QA, OSHIRO EM, TAMARGO RJ. Inhibition of experimental vasospasm in rats with the periadventitial administration of ibuprofen using controlled-release polymers. **J. Stroke**; 30:140–7, 1999.

THERESA N.L.O.; ALVAIR P.A.; M.A. MICHAEL A.B.. Effect of indomethacin on generation of chemotactic activity in inflammatory exudates induced by carrageenan. **European Journal of Pharmacology**, 99, 31-43, 1984.

THOMSON, M., AL-HASSAN M.J., FAYAD J.A.L, ALI M. Prostanoid synthesis in whole blood cells from fish of the Arabian Gulf. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 119, p. 639–646, 1998.

THUN M.J.; NSAID use and decreased risk of gastrointestinal cancers, *Gastroenterol. Clin. North America*, 25, 333– 348, 1996.

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

TOCHER, D. R., SARGENT, J. R. The effect of calcium ionophore A23187 on the metabolism of arachidonic and eicosapentaenoic acids in neutrophils from marine teleost rich in (n-3) polyunsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 87B, 733-739, (1987).

TURNER P.V.; CHEN H.C.; TAYLOR W.M. Pharmacokinetics of meloxicam in rabbits after single and repeated oral dosing. **Comparative Medicine** 56, 63–67, 2006

ULLRICH V, HAURAND M. Thromboxane synthase as a cytochrome P450 enzyme. Adv Prostaglandin **Thromboxane Leukot Res**;11:105–10, 1983.

YAGIELA J.A., NEIDLE E.A. DOWD F.J. **Farmacologia e terapêutica para dentista**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 717p, 2000.

YAMAOKA, K. A., CLASSON, H.E., ROSON, A. Leukotriene B, enhances activation, proliferation and differentiation of human B lymphocytes. **Journal of Immunology** v.143,p. 1996-2000, 1989.

ZHAO F., STANLEY D., WANGA Y., ZHU F., LEI C.L. Eicosanoids mediate nodulation reactions to a mollicute bacterium in larvae of the blowfly, *Chrysomya megacephala*. **Journal of Insect Physiology**. v. 55, p.192–196 (2009).

D
I
S
S.
/
C
L
A
U
D
I
A
N
O

G.
S.

2
0
1
1