



CURSO DE MEDICINA VETERINARIA

MAYUMI FERNANDA ARACATI

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS LEUCOTRIENOS SOBRE A
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM TILÁPIAS DO NILO,
TRATADAS COM ZAFIRLUCASTE**

**DESCALVADO
2018**



CURSO DE MEDICINA VETERINARIA

Mayumi Fernanda Aracati

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS LEUCOTRIENOS SOBRE A
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM TILÁPIAS DO NILO,
TRATADAS COM ZAFIRLUCASTE**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Brasil *campus* Descalvado como parte das exigências para a conclusão do curso de graduação e obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Descalvado
2018

A67e Aracati, Mayumi Fernanda
Estudo da participação dos leucotrienos sobre a resposta inflamatória aguda em tilápias do Nilo, tratadas com zafirlucaste / Mayumi Fernanda Aracati. -- Descalvado, 2018.
43f. : il. ; 29,5cm.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Brasil - Campus Descalvado - SP.

Orientador: Prof^o Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

1. Ciclídeos. 2. Inflamação aguda. 3. Neutrófilos. 4. Leucotrienos cisteínicos. I. Título.

CDD 639.3

MAYUMI FERNANDA ARACATI

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS LEUCOTRIENOS SOBRE
A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM TILÁPIAS DO
NILO, TRATADAS COM ZAFIRLUCASTE**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação na Universidade Brasil, como
parte das exigências para a conclusão do
curso de Medicina Veterinária.

Descalvado, ___ de _____ de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio, de Andrade Belo
Orientador
Universidade Brasil

Prof.^a MSc Roberta Vanessa Pinho Casale
Universidade Brasil

Prof. Dr. Luciano Melo de Souza
Universidade Brasil

Dedico a Deus por proporcionar esta realização, aos meus pais que não mediram esforços para tornar esse sonho possível e a minha filha de quatro patas Nala, minha companheira desde o início.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida que colocaram força em meu coração para vencer essa etapa da minha vida. A fé em vocês, sem dúvida, me ajudou a lutar até o fim.

Aos meus pais Fernando e Valdineia e meus irmãos Fernando e Karoline minha maior fonte de inspiração e força, amores incondicionais da minha vida, por quem eu enfrento tudo, obrigada por aguentar tantas crises de estresse e ansiedade.

A minha cunhada Mariana agradeço pelo amor, apoio e incentivo nas horas difíceis.

A minha querida tia Maria Cristina por acreditar e torcer por minha formação profissional.

Sou grata a todos os professores que contribuíram com a minha trajetória acadêmica, especialmente ao Prof. Dr. Marco Belo responsável pela orientação do meu projeto. Obrigado por esclarecer tantas dúvidas, pela confiança e incansável dedicação.

A minha instituição por ter me dado as ferramentas que permitiram chegar hoje ao final desse ciclo de maneira satisfatória.

Aos meus amigos da faculdade, em especial a minha dupla preferida Julia e Leticia que me acompanharam desde festas, trabalhos e estágios tornando meus dias melhores e mais alegres, agradeço pela amizade construída que irá permanecer pelo resto da vida.

Agradeço a Susana por todo apoio, paciência e companheirismo nesses meses de muito trabalho.

Agradeço também a minhas amigas de longa data Leticia e Joyce o qual compartilhei todos os momentos e mesmo distante fez grande parte desta trajetória e obrigada por compreenderem a minha ausência.

A quem não mencionei, mas esteve junto eu prometo reconhecer essa proximidade, ajuda e incentivo todos os dias da minha vida.

RESUMO

Partindo-se do significativo crescimento da atividade piscícola na economia brasileira e da necessidade de se compreender os mecanismos de defesa dos peixes para auxiliar no manejo sanitário das criações, esta investigação estudou e identificou aspectos importantes envolvidos na fisiopatologia da reação inflamatória aguda em tilápias (*Oerochromis niloticus*), através da avaliação da atividade anti-inflamatória dos tratamentos com 250 e 500 µg de zafirlucaste/Kg de peso vivo, administrado via oral na dieta, sobre a cinética de acúmulo celular em aerocistite induzida por bacterinas de *Aeromonas hydrophila*. Para tal, foram utilizadas 72 tilápias, jovens, acondicionados em 9 aquários, com capacidade de 100 L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano com vazão de 1 L/min., sendo constituídos os seguintes tratamentos: T0 (controle), T1 (Tratamento com 250µg zafirlucaste) e T2 (Tratamento com 500 µg zafirlucaste). Foram avaliados oito animais por tratamento em três períodos: 6, 24 e 48 horas pós-inoculação, para colheita do exsudato presente na bexiga natatória e de amostras de sangue para determinação do hemograma. Tilápias tratadas com o bloqueador de leucotrienos cisteínicos zafirlucaste demonstraram diminuição do acúmulo de células inflamatórias no exsudato associado ao aumento do número de leucócitos e trombócitos circulantes na fase inicial da reação inflamatória aguda, sugerindo ação anti-inflamatória por diminuição da diapedese. Entretanto, animais submetidos ao tratamento com 500 µg apresentaram efeitos hematológicos adversos caracterizados por microcitose e hipocromia.

Palavras chave: ciclídios, inflamação aguda, neutrófilos, leucotrienos cisteínicos.

ABSTRACT

This study investigated and identified important aspects involved in the pathophysiology of the acute inflammatory reaction in tilapia (*Oerochromis niloticus*), in order to understand tilapia defense mechanisms to assist in the sanitary management of fish farms, through the anti-inflammatory evaluation of the treatments with 250 and 500 µg zafirlukast/Kg of body weight, administered through oral route in the diet, on the kinetics of cellular accumulation in aerocystite induced by *Aeromonas hydrophila* bacterins. For this purpose, 72 young tilapia were used and randomly distributed in 9 aquariums with 100 L of water each, supplied with running water devoid of chlorine, from an artesian well with a flow rate of 1 L/min. : T0 (control), T1 (Treatment with 250µg zafirlukast) and T2 (Treatment with 500 µg zafirlukast). Eight animals were evaluated per treatment in three periods: six, 24 and 48 hours post-inoculation (HPI), to collect the exudate present in the swim bladder and blood samples. Tilapia treated with the zafirlukast cysteinyl leukotriene blocker demonstrated a decrease in the accumulation of inflammatory cells in the exudate, associated with the increase in the number of leukocytes and circulating thrombocytes in the initial phase of the acute inflammatory reaction, suggesting an anti-inflammatory action due to a decrease in the diapedesis. However, animals submitted to 500 µg treatment had adverse hematological effects characterized by microcytosis and hypochromia.

Key words: cichlids, acute inflammation, neutrophils, cysteine leukotrienes

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Sistema de Aquários com aquecimento do ambiente na Unesp/FCAV campus Jaboticabal..... | 19 |
| Figura 2: Vista de cima do aquário de tilápias em período de aclimatação na Unesp/FCAV no início do experimento..... | 19 |
| Figura 3: Amostra da ração utilizada no projeto, antes de ser adicionado o anti-inflamatório Zafirlucaste..... | 21 |
| Figura 4: Procedimento de anestesia nos peixes. 4A- Anestésico utilizado foi a benzocaína (benzocaína na proporção de 1:10.000); 4B- Diminuindo nível de água para aplicação da pré-anestesia por imersão; 4C- Tilápias após a pré-anestesia, já tranquilizadas..... | 22 |
| Figura 5: Fármaco utilizado no trabalho; 5A- Apresentação comercial do anti-inflamatório Accolate®; 5B- Fármaco fracionado em capsulas na dose de 250 µg que foi adicionado na ração das tilápias..... | 23 |
| Figura 6: Bactéria <i>A. hydrophila</i> inativada utilizada para inoculação em bexiga natatória de tilápias, mantida em temperatura de 40°C..... | 24 |
| Figura 7: Inoculação da bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> na bexiga natatória da tilápia. 7A- Peixe totalmente anestesiado recebendo oxigenação na água; 7B- Retirada da escama para posterior assepsia e inoculação; 7C- Inoculação da bactéria na bexiga natatória; 7D- Peixe após a inoculação..... | 24 |
| Figura 8: Peixe dissecado por corte longitudinal ventral após eutanásia, para a realização da coleta do exsudato na bexiga natatória, Seta vermelha indica a bexiga natatória..... | 25 |
| Figura 9: Momento exato durante a coleta do exsudato na bexiga natatória da tilápia com o auxílio de micropipeta monocanal..... | 26 |
| Figura 10: Contagem de células inflamatórias totais na câmara de Neubauer em microscopia de luz..... | 27 |

Figura 11: Contagem diferencial das células do exsudato na lamina de extensão. 11A- Granulócito (G), Trombócito (T); 11B-Macrófago (M), Granulócito (G), Linfócito (L); 11C-Macrófago (M), Granulócito (G).....28

Figura 12: Processo de coleta e avaliação hematológica das tilápias para posterior realização de análises. 12A- Coleta de sangue através do vaso caudal do peixe; 12B- Transferência do sangue coletado para o tubo de eppendorff; 12C- Preenchimento do capilar com sangue coletado para determinação do percentual de hematócrito; 12D- Realização da extensão sanguínea.....29

Figura 13: Contagem Diferencial de células sanguíneas. 13A- Neutrófilo (N); 13B- Monócito (M) e Linfócito (L).....30

Figura 14. Valores médios (\pm DP) observados na determinação dos valores sanguíneos de glicose em tilápias submetidas aos diferentes tratamentos durante aerocistite induzida por bacterinas de *A. hydrophila*. * Controle inoculados e não tratados; Tratados com 250 μ g de zafirlucaste; Tratados com 500 μ g de zafirlucaste.....37

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Distribuição da tilápias nos diferentes tratamentos para estudos da inflamação aguda..... | 20 |
| Tabela 2. Valores médios ¹ (\pm DP) e ANOVA ² das contagens de células inflamatórias presentes no exsudato em aerocistite induzida por bacterinas de <i>Aeromonas hydrophila</i> em tilápias..... | 32 |
| Tabela 3. Valores médios ¹ (\pm DP) e ANOVA ² do percentual de células inflamatórias presentes no exsudato em aerocistite induzida por bacterinas de <i>Aeromonas hydrophila</i> em tilápias..... | 33 |
| Tabela 4. Valores médios ¹ (\pm DP) e ANOVA ² das contagens de leucócitos presentes no sangue durante aerocistite induzida por bacterinas de <i>Aeromonas hydrophila</i> em tilápias..... | 34 |
| Tabela 5. Valores médios ¹ (\pm DP) e ANOVA ² das contagens percentuais de leucócitos presentes no sangue durante aerocistite induzida por bacterinas de <i>Aeromonas hydrophila</i> em tilápias..... | 35 |
| Tabela 6. Valores médios ¹ (\pm DP) e ANOVA ² de parâmetros eritrocitários durante aerocistite induzida por bacterinas de <i>Aeromonas hydrophila</i> em tilápias..... | 36 |

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

% Por cento

< Menor

± mais ou menos

°C Graus celsius

µg Microgramas

µL Microlitro

1:10.000 proporção de uma parte para 10.000 partes

1:100 proporção de uma parte para 100 partes

1:500 proporção de uma parte para 500 partes

CAUNESP Centro de aquicultura da unesp

CHCM concentração hemoglobina corpuscular média

CV- Coeficiente de Variação

CysLTR1 Receptor 1 de Cistenil leucotrieno

DP Desvio padrão

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético anticoagulante

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations

g Gramas

HE Hemoglobina

HPI Horas pós implante

HT Hematócrito

Kg Quilogramas

L Litro

LAPOA Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos

LOX Lipoxigenase

Min Minuto

mL mililitro

NaCl Cloreto de sódio

NS - Não significativo

PBS Tampão fosfato-salino

Ph potencial de hidrogênio

Rpm rotação por minuto

SAS Statistical Analysis Software

T0 Tratamento controle

T1 Tratamento com 250µg zafirlucaste

T2 Tratamento com 500 µg zafirlucaste

VCM volume corpuscular médio.

SUMARIO

| | | |
|-----------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. | JUSTIFICATIVA | 14 |
| 3. | OBJETIVO | 14 |
| 4. | OBJETIVO ESPECÍFICO | 15 |
| 5. | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| | 5.1 Tilapicultura no Brasil | 15 |
| | 5.2 Inflamação aguda em peixes teleósteos | 16 |
| | 5.3 Leucotrienos | 17 |
| | 5.4 Zafirlucaste | 18 |
| 6. | MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| | 6.1 Peixes e acondicionamento | 18 |
| | 6.2 Delineamento experimental | 20 |
| | 6.3 Padronização da ração com a adição de Zafirlucaste | 20 |
| | 6.4 Anestesias dos peixes | 21 |
| | 6.5 Tratamento com anti-inflamatório | 22 |
| | 6.6 Produção da bacterina de <i>Aeromonas hydrophila</i> | 23 |
| | 6.7 Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória | 25 |
| | 6.8 Avaliação hematológica | 28 |
| | 6.9 Monitoramentos da qualidade da água e sinais clínicos | 31 |
| | 6.10 Análises estatísticas | 31 |
| 7. | RESULTADO E DISCUSSÃO | 31 |
| 8. | CONCLUSÕES | 38 |
| 9. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA | 39 |

1. INTRODUÇÃO

O relatório da FAO de 2016 estima que o Brasil deva registrar um crescimento de 104% na produção aquícola até o ano de 2025. De acordo com este estudo, o aumento da atividade piscícola será expressivo durante a próxima década, resultado dos investimentos feitos no setor nos últimos anos, principalmente tilapicultura e na criação de peixes nativos como o tambaqui na região norte do país (FAO, 2016).

A intensificação dos recursos produtivos, com o objetivo de atender a nova realidade de mercado, representa um desafio para as autoridades sanitárias. Pois, o elevado adensamento populacional nos diferentes sistemas de criação favorece o aparecimento de enfermidades, que muitas vezes comprometem economicamente as pisciculturas, e em casos de zoonoses representam sérios problemas para a saúde pública (CASTRO et al., 2014).

Neste preceito, agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (BELO et al., 2012). O manejo sanitário precário propicia o surgimento de doenças causadas por microorganismos aquáticos oportunistas, como a *Aeromonas hydrophila* (MARTENINGHE et al, 2008), agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemias hemorrágicas em peixes de água doce, acarretando perdas na produção e na qualidade do pescado (REQUE et al., 2010).

A inflamação é uma reação do organismo contra um agente agressor ou lesão tecidual. Segundo Castro et al. (2014), os processos infecciosos, inflamatórios e cicatriciais e seus mecanismos de controle são bem conhecidos em mamíferos. Entretanto, pouco se conhecem destes processos em outras classes, principalmente os peixes. O zafirlucaste apresenta atividade anti-inflamatória por antagonizar os receptores de leucotrienos cisteínicos, CysLTR1, atuando sobre a contração da musculatura lisa e previne o aumento da permeabilidade vascular, reduzindo assim a formação de edema e a diapedese (SCOTT & PETERS-GOLDEN, 2013), além de apresentar atividades anti-inflamatórias secundárias, que parecem ser

particularmente eficazes no direcionamento de neutrófilos e monócitos / macrófagos (SCOTT & PETERS-GOLDEN, 2013). Estes e outros mecanismos anti-inflamatórios secundários dos antagonistas CysLTR1 vem sendo estudados na medicina humana, porém pouco se sabe do bloqueio deste receptor e de seus efeitos em peixes teleósteos.

Partindo da importância da resposta inflamatória aguda e do sucesso do modelo experimental de indução de aerocistite por bacterinas de *A. hydrophila*, realizadas em estudos anteriores por este grupo de pesquisas, esta investigação propôs estudar e identificar aspectos importantes envolvidos na fisiopatologia da reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, por meio da avaliação da atividade anti-inflamatória do zafirculaste sobre a cinética de acúmulo celular no exsudato da bexiga natatória e no perfil leucocitário das tilápias.

2. JUSTIFICATIVA

Com base na importância da tilapicultura para economia brasileira, associado à necessidade de desenvolvimento técnico sanitário para o cultivo dos peixes, esta investigação estudou e identificou aspectos importantes envolvidos na fisiopatologia do processo inflamatório agudo em peixes teleósteos, através da administração do anti-inflamatório zafirlucaste para o bloqueio da Lipoxigenase (LOX). Salientamos a importância da resposta celular inflamatória nos mecanismos de defesa destes animais.

3. OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivos avaliar o antagonista de receptores Cys-LTR₁ na modulação da resposta inflamatória aguda através da avaliação do leucograma e do acúmulo celular em exsudato presente na bexiga natatória de tilápias do Nilo, tratadas com 250 e 500µg de zafirlucaste/Kg de peso vivo, administrado via oral na dieta.

4. OBJETIVO ESPECÍFICO

Perfil da determinação do hemograma das tilápias durante a reação inflamatória aguda; Avaliação da cinética de acúmulo celular em exsudato presente na bexiga natatória. Monitoramento da qualidade de água e acondicionamento dos animais.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 Tilapicultura no Brasil

O relatório da FAO, O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2016 (SOFIA), apresenta as estimativas de crescimento para o setor aquícola brasileiro. As políticas públicas criadas especificamente para o setor e os investimentos sugerem projeções de que o Brasil seja uma potência na pesca e aquicultura (FAO, 2016). E conforme estimativas deste relatório, as espécies de água doce, como a carpa, o catfish (incluindo *Pangasius*) e a tilápia, serão responsáveis pela maior parte do aumento da produção aquícola e irão representar cerca de 60 por cento da produção mundial em 2025 (FAO, 2016).

O Brasil já é um dos sete maiores produtores de tilápia do mundo, com um volume de mais de 250 mil toneladas. A tilápia é uma das três espécies de peixes mais criadas no mundo e uma das mais consumidas nos Estados Unidos, potencial importador da produção brasileira. Por conta deste potencial produtivo, há investimento em várias regiões do Brasil para incentivar a produção de pescados (BRASIL, 2014). Neste contexto, destaca-se a espécie *Oreochromis niloticus*, comumente chamada de “tilápia nilótica”, de origem africana, oriunda da bacia do Rio Nilo, pertencente à família *Cichlidae*. Para Zimmermann e Fitzsimmons (2004), no Brasil, a tilapicultura segue a mesma tendência mundial, com predomínio de tilápias nilóticas ao invés de tilápias vermelhas, pois estas apresentam crescimento mais rápido e um rendimento de filé superior quando comparadas às demais espécies de tilápias.

5.2 Inflamação aguda em peixes teleósteos

Os peixes, assim como mamíferos, possuem uma variedade de mecanismos de defesa específicos e não-específicos contra organismos invasores. Estes mecanismos de proteção são fundamentais para a manutenção da integridade, e constitui-se processo controlado e coordenado, buscando minimizar os danos teciduais e restabelecer condições fisiológicas normais (BELO et al., 2005). A reação inflamatória em peixes teleósteos, assim como em mamíferos, desenvolve papel fundamental na defesa do organismo, resultando alterações vasculares locais que facilitam mecanismos quimiotáticos com recrutamento e acúmulo de leucócitos no sítio lesado (BELO et al., 2014).

A inflamação aguda inicia imediatamente após a injúria tecidual e apresenta substâncias originárias da degradação metabólica do ácido araquidônico, tais como, as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos, que por sua vez são responsáveis pelas alterações iniciais da reação inflamatória (CASTRO et al., 2014). Mecanismos estes, essenciais para desencadear um processo coordenado de proteção, de modo que os importantes componentes do sistema de defesa atinjam o local da agressão (WHITE, 1999). Mudanças sistêmicas e metabólicas na fase aguda promovem uma defesa inicial não-específica contra o agressor, até que uma imunidade específica seja adquirida (GRUYS et al., 2006).

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas em grande quantidade para os tecidos inflamados, exercendo importante função fagocítica (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Assim como em mamíferos, estes granulócitos nos peixes teleósteos são tipicamente os primeiros leucócitos recrutados para o sítio inflamatório e com a evolução da reação inflamatória aumenta a participação de células como os macrófagos (CLAUDIANO et al., 2013).

A cinética de acúmulo celular no foco inflamatório tem sido objeto de estudos deste grupo de pesquisas que vem buscando identificar e compreender a modulação fisiopatológica da reação inflamatória em peixes submetidos a diferentes tipos de estímulos, tais como: o implante de lamínulas de vidro (BELO et al., 2005; 2012), carragenina e tioglicolato (MORAES et al., 2012), *Mycobacterium marinum* e BCG

(MANRIQUE et al., 2015), *Aeromonas hydrophila* (REQUE et al., 2010, CLAUDIANO et al., 2013), *Streptococcus agalactiae* (CASTRO et al., 2014), assim como, a influência de diferentes tratamentos sobre a resposta inflamatória como o uso de vitamina E (BELO et al., 2005), vitamina C (BELO et al., 2012), cromo (CASTRO et al., 2014), leveduras (REQUE et al., 2010; CASTRO et al., 2014), ácidos graxos ômega 3 e 6 (SAKABE et al., 2013), tilosina (FARIA, 2015), entre outros.

5.3 Leucotrienos

Os Leucotrienos (LTs) constituem uma família de mediadores lipídicos que desempenham papel fundamental na patogênese da inflamação. A via da lipoxigenase é ativa em leucócitos e outras células imunocompetentes, incluindo mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos. Quando tais células são ativadas, o ácido araquidônico é libertado dos fosfolípidos da membrana celular pela fosfolipase A2 e doado pela proteína de ativação da 5-lipoxigenase (FLAP) à 5-lipoxigenase (CAPRA et al., 2015).

De acordo com ARTS & KOHLER (2009), peixes teleósteos apresentam a mesma via de produção dos leucotrienos, e segundo estes autores estes eicosanóides possuem um papel mais neuroendócrino na inflamação, particularmente no que diz respeito à atividade dos leucócitos, em que a via da lipoxigenase ativa estas células. Peixes rodovalho, *Scophthlmus maximus*, vacinados e desafiados com *Vibrio anguillarum* apresentaram aumento da expressão de receptores de leucotrienos nos rins e baço (ZHANG et al., 2015).

Os LTs são classificados em duas classes: LTB₄ (um dos mais potentes mediadores quimiotaxia da inflamação) e cisteinil LTs (CysLTs) que incluem LTC₄, LTD₄ e LTE₄. LTB₄ que induzem suas ações através de receptores acoplados à proteína G, CysLT R-1 e CysLT R-2. LTs estão envolvidos na patogênese de doenças inflamatórias, portanto, inibidores de LTs ou antagonistas, representam um importante avanço terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias (WOSZCZEK et al., 2010).

5.4 Zafirlucaste

O zafirlucaste é um antagonista dos receptores de CysLTs (LTC₄, LTD₄ e LTE₄), atuando sobre a contração da musculatura lisa e previne o aumento da permeabilidade vascular, reduzindo assim a formação de edema e a diapedese, além de interagir com receptores específicos cysLTR1 e cysLTR2, expressos na membrana externa de células imunitárias / inflamatórias e células estruturais (SCOTT & PETERS-GOLDEN, 2013).

As células do sistema imune inato tais como mastócitos / basófilos, monócitos / macrófagos e células dendríticas mielóides sofrem ativação na exposição à cysLTs (THERON et al., 2014). Os neutrófilos, por outro lado, respondem apenas modestamente aos cysLTs. Tal fato é surpreendente uma vez que estes granulócitos são extremamente sensíveis aos efeitos supressores dos antagonistas de cysLTR1 (OKUNISHI & PETERS-GOLDEN, 2011).

Os efeitos inibitórios do zafirlucaste sobre a produção de LTs por neutrófilos e monócitos/macrófagos estão bem documentados (ANDERSON et al, 2009) e são alcançados em concentrações próximas às concentrações séricas máximas. O reconhecimento do envolvimento de CysLTs na imunopatogênese de vários tipos de distúrbios inflamatórios, levou ao desenvolvimento de antagonistas seletivos dos receptores CysLTR-1 (cysLTR1), dentre eles o zafirlucaste (WOSZCZEK et al., 2010), porém pouco se sabe do bloqueio deste receptor e de seus efeitos em peixes teleósteos.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Peixes e acondicionamento

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Brasil sob o registro 0015/2016. Foram utilizadas 72 tilápias (*Oerochromis niloticus*), pesando \pm 100g, acondicionados em 9 aquários (n=8), com capacidade de 100 L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano com vazão de 1 L/min. Após o transporte para os aquários, os peixes foram aclimatados durante uma semana, tempo necessário para que a concentração

plasmática de cortisol e a osmolaridade voltem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L (CARNEIRO & URBINATI, 2001).



Figura 1 - Sistema de Aquários com aquecimento do ambiente na Unesp/FCAV campus Jaboticabal (Fonte: Próprio autor)



Figura 2: Vista de cima do aquário de tilápias em período de aclimação na Unesp/FCAV no início do experimento (Fonte: Próprio autor)

6.2 Delineamento experimental

Foram avaliados oito animais por tratamento em três períodos, isto é: seis, 24 e 48 horas após a inoculação da bacterina de *Aeromonas hydrophila*. Os animais foram distribuídos em 9 aquários para constituir as repetições dos diferentes tratamentos conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição da tilápias nos diferentes tratamentos para estudos da inflamação aguda.

| Grupos | Tratamentos ¹ | HPI (Horas pós-inoculação ²) | | |
|--------|--|--|-------|-------|
| | | 6 | 24 | 48 |
| T 0 | Inoculado + não tratado | N = 8 | N = 8 | N = 8 |
| T 1 | Inoculado + tratado com zafirculaste 250µg | N = 8 | n = 8 | N = 8 |
| T 2 | Inoculado + tratado com zafirculaste 500µg | N = 8 | n = 8 | N = 8 |

¹ Tratamento uma semana antes da inoculação na bexiga natatória

² Inoculação da bacterina na bexiga natatória das tilápias

6.3 Padronização da ração com a adição de Zafirlucaste.

As tilápias foram alimentadas com dieta basal comercial (Fri Acqua Crescimento Tilápias), contendo 32% de proteína bruta. Nas dietas dos animais dos tratamentos T1 e T2 (conforme delineamento apresentado na Tabela 1, item 4.2) foram adicionados o bloqueador de receptor de leucotrienos cisteínicos zafirlucaste (Accolate®, Laboratório Astra Zeneca, UK) na dose de 250 e 500µg/kg de peso vivo. Para o preparo das dietas, a ração comercial foi pesada e adicionada de 2% de óleo vegetal acrescido das respectivas quantidades de zafirlucaste e armazenadas em sacos plásticos escuros, mantida a -16oC, até o momento do uso.



Figura 3: Amostra da ração utilizada no projeto, antes de ser adicionado o anti-inflamatório Zafirlucaste (Fonte: Próprio autor)

6.4 Anestésias dos peixes

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para a inoculação da bacterina e 1:500 no momento da eutanásia. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (WEDEMEYER, 1980). Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados nos aquários com fluxo de água contínuo e aeração.



Figura 4: Procedimento de anestesia nos peixes. 4A- Anestésico utilizado foi a benzocaína (benzocaína na proporção de 1:10.000); 4B- Diminuindo nível de água para aplicação da pré-anestesia por imersão; 4C- Tilápias após a pré-anestesia, já tranquilizadas (Fonte: Próprio autor)

6.5 Tratamento com anti-inflamatório

O bloqueador de receptores de leucotrienos, zafirculaste, foi adicionado a dieta dos peixes conforme item 6.3. Os peixes dos tratamentos com 250 (grupo T1) e 500 μg (grupo T2) foram alimentados com esta dieta por uma semana antes da inoculação da bacterina. Os arraçoamento dos animais foram feitos duas vezes por dia com a administração de 3% da biomassa dos aquários.

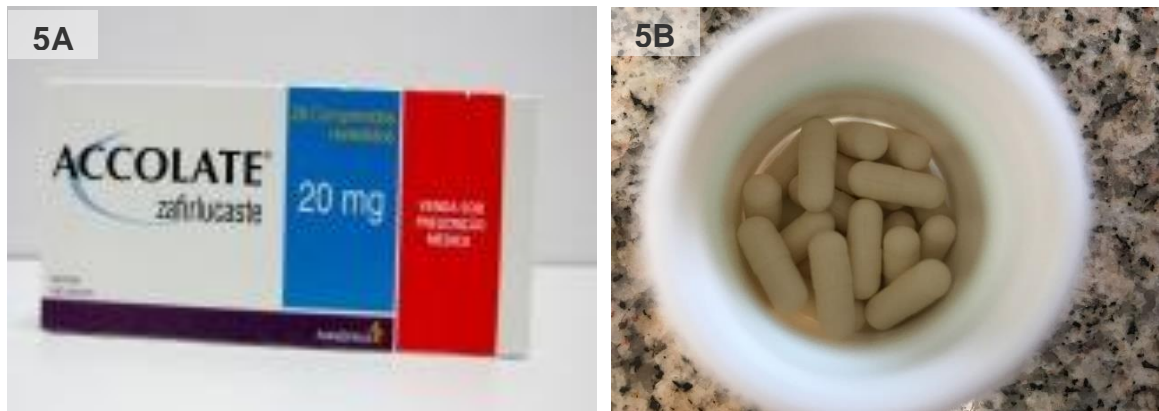


Figura 5: Fármaco utilizado no trabalho; 5A- Apresentação comercial do anti-inflamatório Accolate®; 5B- Fármaco fracionado em capsulas na dose de 250 µg que foi adicionado na ração das tilapias (Fonte: Próprio autor).

6.6 Produção da bacterina de *Aeromonas hydrophila*

Isolados de *A. hydrophila* foram fornecidas pelo LAPOA (Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos), CAUNESP. A massa bacteriana foi obtida por centrifugação (4000 rpm, 4°C, por 20 minutos), após três lavagens sucessivas com solução de PBS estéril (pH 7,4) para retirada completa do meio de cultura e então foi ressuspensa em 100 mL de PBS. A concentração da bacterina foi ajustada para $1,0 \times 10^9$ células mL⁻¹. Para inativação foi adicionado 0,5% de formol (volume/volume) à suspensão bacteriana, que permanecerá sob agitação constante a temperatura ambiente. Depois sendo mantida a 40°C, durante 24 horas. No momento da inoculação 0,5 mL do inoculo foi administrado na bexiga natatória.

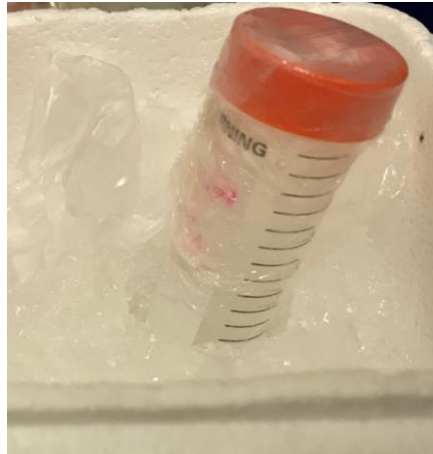


Figura 6: Bactéria *A. hydrophila* inativada utilizada para inoculação em bexiga natatória de tilapias, mantida em temperatura de 40°C (Fonte: Próprio autor).

Foram avaliados oito animais por tratamento em três períodos, isto é: seis, 24 e 48 horas após a inoculação da bacterina de *Aeromonas hydrophila*. Foram feitas as devidas antissepsia com álcool antes do procedimento e posteriormente foi administrado 0,5 mL do inóculo na bexiga natatória da tilápia com material estéril.

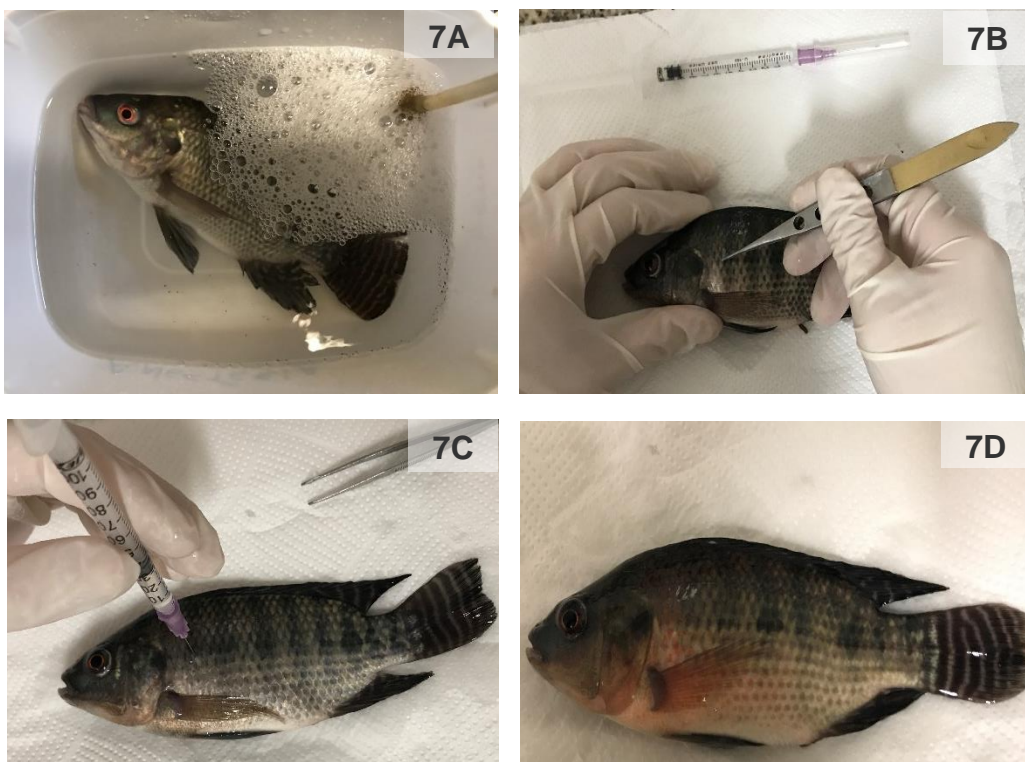


Figura 7: Inoculação da bactéria *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória da tilápia. 7A- Peixe totalmente anestesiado recebendo oxigenação na água; 7B- Retirada da escama para posterior assepsia e inoculação; 7C- Inoculação da bactéria na bexiga natatória; 7D- Peixe após a inoculação (Fonte: Próprio autor)

6.7 Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória

Para a avaliação do acúmulo de células totais, ao término dos tempos pré-estabelecidos de seis, 24 e 48 horas após o desafio, os animais foram dissecados por um corte longitudinal ventral após anestesia profunda (conforme descrito item 5.4), do ânus ao opérculo; outro do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral dando acesso a bexiga natatória.



Figura 8: Peixe dissecado por corte longitudinal ventral após eutanásia, para a realização da coleta do exsudato na bexiga natatória, Seta vermelha indica a bexiga natatória. (Fonte: Próprio autor)

A seguir, esta foi lavada cuidadosamente com 1 mL de solução gelada de PBS, contendo EDTA a 0,09%. O mesmo volume injetado foi recolhido com o auxílio de micropipeta monocanal (100 a 1000 μ L), e transferido para tubo (eppendorf) mantidos em gelo.



Figura 9: Momento exato durante a coleta do exsudato na bexiga natatória da tilápia com o auxílio de micropipeta monocanal (Fonte: Próprio autor)

A solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga clínica. O sobrenadante foi retirado e o sedimento total foi ressuscitado com a adição de 100 μ L do sobrenadante previamente retirado e uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz, conforme descrito por Castro et al. (2014).

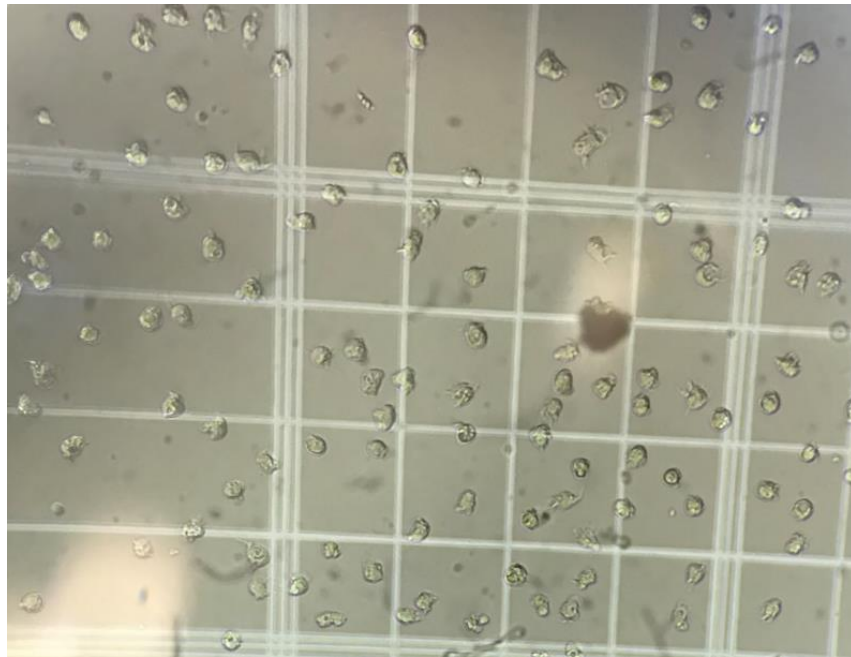


Figura 10: Contagem de células inflamatórias totais na câmara de Neubauer em microscopia de luz (Fonte: Próprio autor)

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 tilápia, 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 (CASTRO et al., 2014) para posterior contagem em microscopia de luz de até 200 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório.

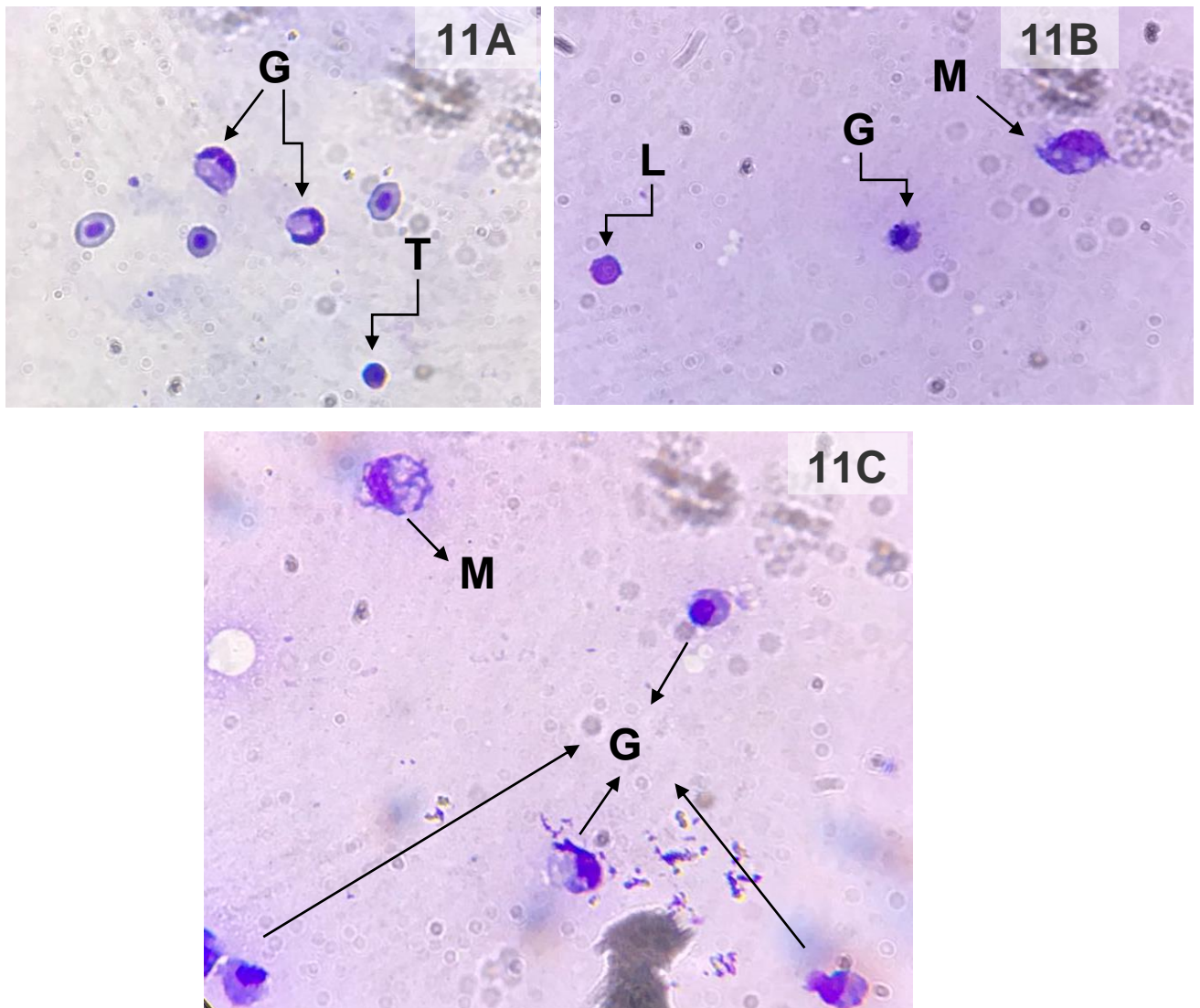


Figura 11: Contagem diferencial das células do exsudato na lamina de extensão. 11A- Granulócito (G), Trombócito (T); 11B-Macrófago (M), Granulócito (G), Linfócito (L); 11C-Macrófago (M), Granulócito (G) (Fonte: Próprio autor).

6.8 Avaliação hematológica

Foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal (Figura 12). A determinação da contagem global de células vermelhas e brancas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando a solução de Natt e Herrick (1952) com diluente na proporção de 1:100.

Foram realizadas a determinação do percentual de hematócrito em microcentrífuga e da quantidade de hemoglobina circulante com reagente de Drabkin's para leitura em comprimento de onda de 540nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo $VCM = (HT/HE)*100$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $CHCM = (HG/HT)*100$.

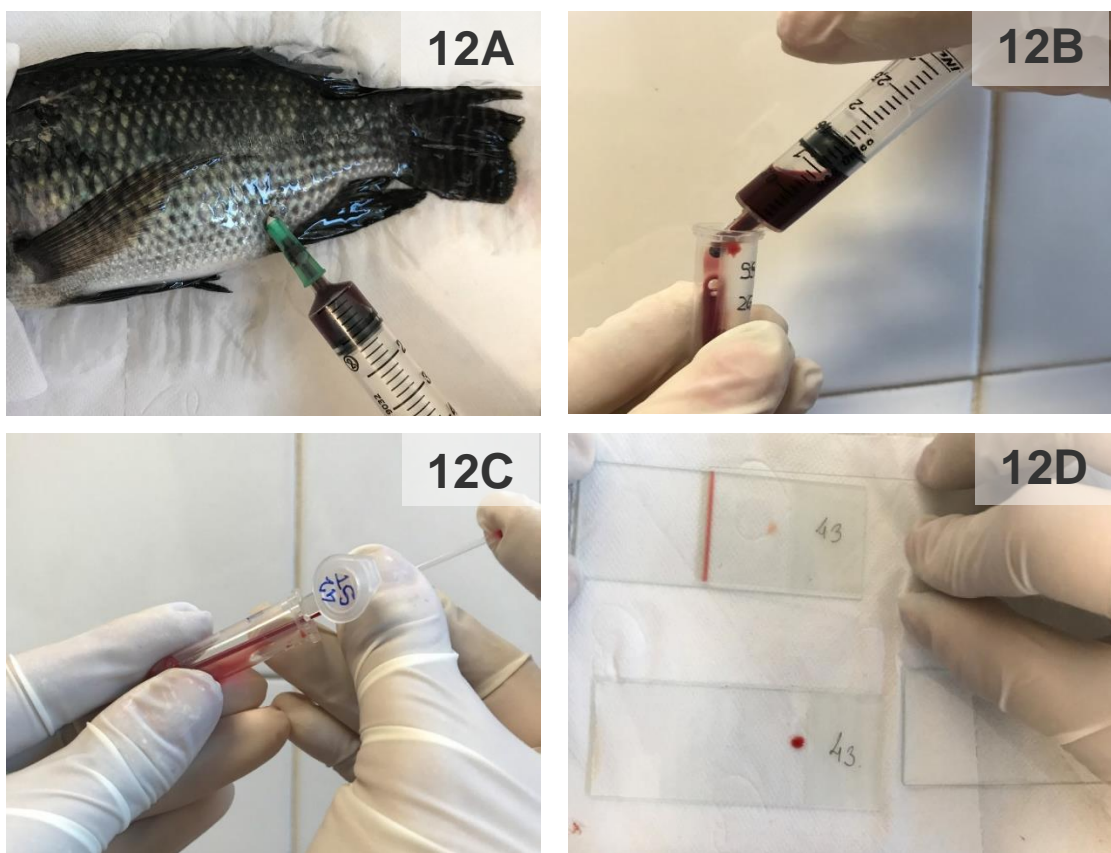


Figura 12: Processo de coleta e avaliação hematológica das tilapias para posterior realização de análises. 12A- Coleta de sangue através do vaso caudal do peixe; 12B- Transferência do sangue coletado para o tubo de eppendorff; 12C- Preenchimento do capilar com sangue coletado para determinação do percentual de hematócrito; 12D- Realização da extensão sanguínea (Fonte: Próprio autor)

A contagem diferencial de leucócitos foram realizadas em extensões sanguíneas com a contagem de 200 células (Figura 13), estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald-Giensa-Wright (BELO et al., 2013).

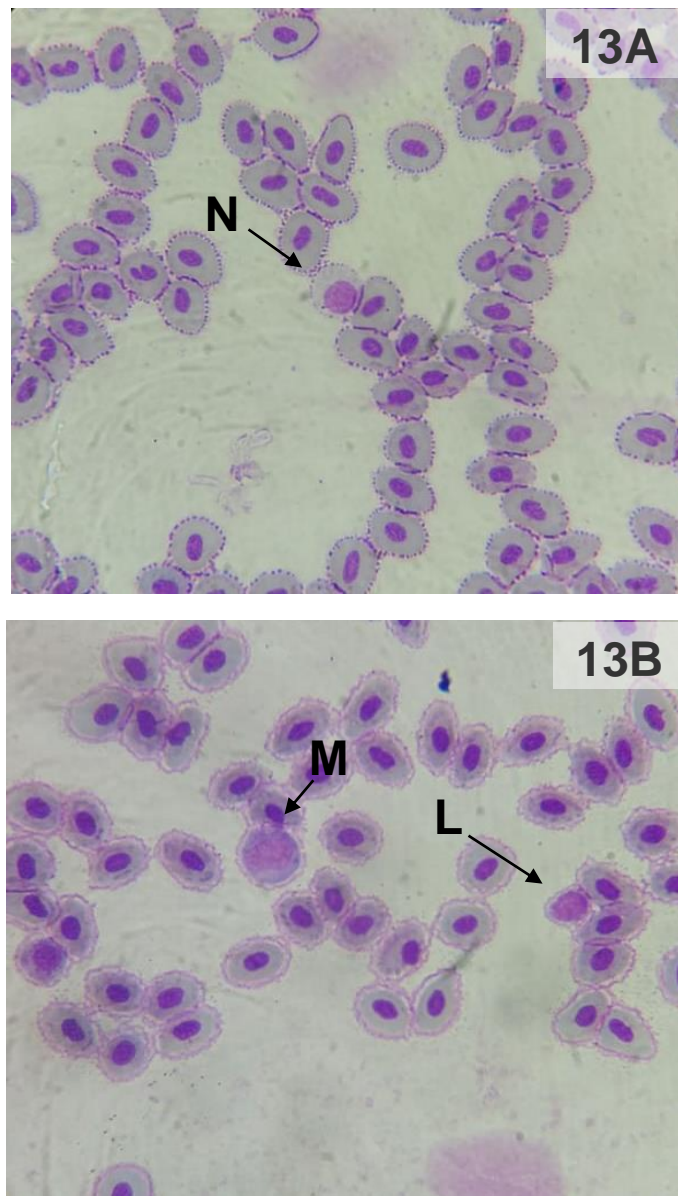


Figura 13: Contagem Diferencial de células sanguíneas. 13A- Neutrófilo (N); 13B- Monócito (M) e Linfócito (L) (Fonte: Próprio autor).

6.9 Monitoramentos da qualidade da água e sinais clínicos

O monitoramento da qualidade da água foi realizado diariamente às 8:00 e 18:00h, avaliando-se o potencial hidrogeniônico, condutividade elétrica, a concentração de oxigênio, além da temperatura da água através de peagâmetro e oxímetro portátil “YSI – 63” e “YSI- 55”, respectivamente. Diariamente, os animais foram examinados quanto ao eventual aparecimento de alterações de comportamento e fisiológicas entre os diferentes tratamentos (Utilizando pHmetro e oxímetro YSI modelo 63 e 55, respectivamente).

6.10 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo esquema fatorial 3 X 3 (3 tratamentos com antiinflamatório e 3 tempos diferentes), “ Split Plot Design”, utilizando procedimento GLM (General Linear Model) do programa SAS, versão 9.3 (Statistical Analysis Software, 2012). A análise de variância das médias foi determinada pelo teste de T ($p < 0,05$), de acordo com SNEDECOR & COCHRAN (1984).

7. RESULTADO E DISCUSSÃO

O estudo do acúmulo celular na bexiga de tilápias durante a inflamação aguda revelou diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem total de células presentes no exsudato em peixes tratados com 500 μg de zafirlucaste quando comparados aos animais controles 6 e 48 HPI (Tabela 2). O estudo da contagem diferencial mostrou marcada diminuição no acúmulo ($P < 0,05$) de granulócitos e macrófagos 6HPI e granulócitos 48 HPI. Ocorreu diminuição na contagem de trombócitos 48 HPI em todos os tratamentos. Entretanto, peixes controles apresentaram significativa ($P < 0,05$) diminuição de trombócitos. O perfil de resposta observado nos animais controles demonstra pico de acúmulo de células inflamatórias 24 HPI, semelhantemente observado por Claudiano et al. (2013) e Castro et al. (2014).

Tabela 2. Valores médios¹ (\pm DP) e ANOVA² das contagens de células inflamatórias presentes no exsudato em aerocistite induzida por bacterinas de *Aeromonas hydrophila* em tilápias.

| Período | Tratamentos ³ | Células totais (μ L) | Granulócitos (μ L) | Linfócitos (μ L) | Macrófagos (μ L) | Trombócitos (μ L) |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 6 horas | 500 μ g | 1812.5 \pm 854.2 Bb | 1348.0 \pm 592.6 Bb | 366.7 \pm 420.6 Aa | 77.7 \pm 89.7 Ba | 152.5 \pm 267.5 Aa |
| | 250 μ g | 2443.7 \pm 666.7 Ba | 2015.6 \pm 446.1 Bab | 325.5 \pm 304.6 Aa | 96.1 \pm 32.7 Ba | 75.5 \pm 83.6 Aa |
| | Controle | 5070.0 \pm 1651.7 Aa | 4358.6 \pm 1593.9 Aa | 261.2 \pm 242.6 Aa | 426.0 \pm 271.6 Aa | 63.8 \pm 58.8 Aab |
| 24 horas | 500 μ g | 4300.0 \pm 3024.8 Aa | 3654.6 \pm 2488.9 Aa | 353.6 \pm 302.7 Aa | 292.1 \pm 269.3 Aa | 205.8 \pm 190.5 Aa |
| | 250 μ g | 4878.5 \pm 2938.1 Aa | 4358.4 \pm 2719.8 Aa | 161.4 \pm 112.7 Aa | 359.0 \pm 240.8 Aa | 97.2 \pm 100.6 Aa |
| | Controle | 6340.0 \pm 2343.4 Ab | 5505.8 \pm 2045.6 Aa | 535.2 \pm 682.3 Aa | 282.4 \pm 67.7 Aa | 278.6 \pm 351.8 Aa |
| 48 horas | 500 μ g | 2216.6 \pm 889.2 Bb | 1663.0 \pm 542.5 Bb | 281.6 \pm 172.3 Aa | 272.1 \pm 263.9 Aa | 43.3 \pm 31.7 Aa |
| | 250 μ g | 2675.0 \pm 2139.1 Aba | 2161.3 \pm 1586.3 Abb | 213.5 \pm 258.2 Aa | 300.5 \pm 364.8 Aa | 46.0 \pm 234.8 Aa |
| | Controle | 3464.2 \pm 1237.8 Ab | 2942.5 \pm 1054.6 Aa | 342.1 \pm 186.5 Aa | 184.2 \pm 92.0 Aa | 29.8 \pm 22.5 Ab |
| Tratamento ⁴ | | 6.91** | 8.06** | 1.16 ^{NS} | 0.84* | 0.89 ^{NS} |
| Tempo | | 9.73 ^{NS} | 11.65 ^{NS} | 0.26 ^{NS} | 1.56 ^{NS} | 4.57* |
| Tratamento X Tempo | | 0.58* | 0.59* | 0.75 ^{NS} | 2.97** | 0.86 ^{NS} |
| C.V. ⁴ | | 52.20 | 53.35 | 100.48 | 80.87 | 150.23 |

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05).

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Controle inoculados e não tratados; Tratados com 250 μ g de zafirlucaste; Tratados com 500 μ g de zafirlucaste.

⁴ CV- Coeficiente de Variação (%); NS - Não significativo; *significativo para P<0,05; **Significativo para P<0,01

A avaliação percentual das células presentes no exsudato (Tabela 3) demonstrou variações significativas apenas nas populações de macrófagos com diminuição dos percentuais no início da resposta inflamatória 6 HPI e diminuição com 48 HPI quando comparados aos animais controles. Porém, na avaliação da resposta inflamatória ao longo do tempo não se observou variações significativas na contagem de macrófagos em peixes controles, diferentemente de peixes tratados com 250 e 500 μ g deste bloqueador de leucotrienos, os quais apresentaram baixos

percentuais com 6 HPI e aumentos significativos ($P < 0,05$) com 48 HPI. Observou-se pico nos valores percentuais de granulócitos 24 HPI, corroborando os achados observados na contagem absoluta (Tabela 2). Endo et al. (1997) observou este mesmo perfil no acúmulo de neutrófilos na bexiga natatória de tilápias inoculadas com bacterina de *Escherichia coli*.

Tabela 3. Valores médios¹ (\pm DP) e ANOVA² do percentual de células inflamatórias presentes no exsudato em aerocistite induzida por bacterinas de *Aeromonas hydrophila* em tilápias

| Período | Tratamentos ³ | GRANULÓCITOS (%) | LINFÓCITOS (%) | MACROFAGOS (%) | TROMBÓCITOS (%) |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 6 horas | 500 μ g | 77.00 \pm 15.37 Ab | 17.87 \pm 13.52 Aa | 4.12 \pm 3.09 ABb | 6.37 \pm 8.94 Aa |
| | 250 μ g | 83.62 \pm 8.21 Aa | 12.12 \pm 8.89 Aba | 4.00 \pm 1.07 Bb | 2.87 \pm 2.42 Aa |
| | Controle | 83.37 \pm 5.29 Aa | 7.87 \pm 8.11 Ba | 8.25 \pm 4.71 Aa | 1.12 \pm 1.36 Aa |
| 24 horas | 500 μ g | 86.25 \pm 4.83 Aa | 8.00 \pm 2.73 Aa | 5.75 \pm 2.82 Ab | 4.75 \pm 2.38 Aa |
| | 250 μ g | 87.25 \pm 5.06 Aa | 6.42 \pm 4.86 Aa | 7.12 \pm 0.83 Aab | 2.25 \pm 1.83 Aa |
| | Controle | 80.87 \pm 16.23 Aa | 11.50 \pm 12.52 Aa | 7.12 \pm 4.76 Aa | 3.75 \pm 6.20 Aa |
| 48 horas | 500 μ g | 75.87 \pm 7.18 Bb | 13.50 \pm 7.17 Aa | 10.62 \pm 5.68 Aa | 3.37 \pm 2.92 Aa |
| | 250 μ g | 81.00 \pm 5.47 ABa | 8.62 \pm 5.55 Ba | 10.37 \pm 4.49 Aa | 1.87 \pm 3.04 Aa |
| | Controle | 83.37 \pm 5.18 Aa | 10.87 \pm 5.06 ABa | 5.87 \pm 2.95 Ba | 0.87 \pm 0.83 Aa |
| Tratamento ⁴ | | 1.34 ^{NS} | 1.50 ^{NS} | 0.05 ^{NS} | 3.62 ^{NS} |
| Tempo | | 1.71 ^{NS} | 1.33 ^{NS} | 5.39 ^{**} | 1.07 ^{NS} |
| Tratamento X Tempo | | 1.27 ^{NS} | 1.39 ^{NS} | 3.85 ^{**} | 0.69 ^{NS} |
| C.V. ⁴ | | 11.13 | 77.57 | 53.36 | 134.17 |

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T ($P < 0,05$).

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre dias experimentais.

³ Controle inoculados e não tratados; Tratados com 250 μ g de zafirlucaste; Tratados com 500 μ g de zafirlucaste.

⁴ CV- Coeficiente de Variação (%); NS - Não significativo; *significativo para $P < 0,05$; **Significativo para $P < 0,01$.

Os resultados observados no acúmulo celular no foco inflamado demonstram correlação aos achados das contagens celulares no leucograma

(Tabela 4). Pois, peixes tratados com 250 e 500 µg de zafirlucaste apresentaram aumento do número de trombócitos e neutrófilos quando comparados aos animais controles no início da reação inflamatória (6 HPI), associado à diminuição de células inflamatórias no exsudato. Tais achados corroboram a hipótese de que o bloqueio de receptores Cys-LTR₁ pelo zafirlucaste tenha diminuído a diapedese por diminuir a permeabilidade vascular das tilápias, corroborando os achados de Claudiano et al. (2013) que verificaram diminuição de permeabilidade vascular e no número de células presentes no exsudato de tilápias tratadas com dexametasona.

Tabela 4. Valores médios¹ (± DP) e ANOVA² das contagens de leucócitos presentes no sangue durante aerocistite induzida por bacterinas de *Aeromonas hydrophila* em tilápias.

| Período | Tratamentos ³ | Trombócitos (µL) | Neutrófilos (µL) | Monócitos (µL) | Linfócitos (µL) |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 6 horas | 500 mg | 33147.3 ± 16115.1 Aab | 15744.1 ± 5219.0 Abb | 1975.3 ± 967.1 Ac | 15258.0 ± 7476.5 Ac |
| | 250 mg | 34154.5 ± 17958.2 Aa | 17837.8 ± 9502.2 Aa | 2443.1 ± 1553.2 Ab | 17675.6 ± 11122.2 Ab |
| | Controle | 20939.0 ± 6094.4 Bb | 12520.0 ± 4915.4 Bb | 1750.4 ± 938.0 Ab | 9790.5 ± 4196.5 Ab |
| 24 horas | 500 mg | 41590.8 ± 11520.5 Aa | 18801.5 ± 4559.3 Aa | 5522.6 ± 1674.2 Aa | 38418.3 ± 10749.0 Aa |
| | 250 mg | 24137.6 ± 6924.7 Ba | 10761.0 ± 4259.2 Bb | 4166.2 ± 1523.6 Aa | 31935.0 ± 13138.1 Aa |
| | Controle | 39226.7 ± 19995.6 Aa | 19209.6 ± 8696.7 Aa | 5357.1 ± 1415.2 Aa | 39831.7 ± 16158.2 Aa |
| 48 horas | 500 mg | 27860.5 ± 4303.2 Ab | 8129.4 ± 2294.7 Bc | 3490.3 ± 897.9 Bb | 26852.7 ± 5914.1 Bb |
| | 250 mg | 24038.6 ± 10343.9 Aa | 5445.6 ± 2489.6 Bc | 2881.0 ± 1655.4 Bab | 20509.6 ± 6440.5 Bb |
| | Controle | 33681.5 ± 8470.1 Aab | 14124.8 ± 4602.8 Aab | 5008.8 ± 1815.1 Aa | 40740.7 ± 8621.4 Aa |
| Tratamento ⁴ | | 1.97 ^{NS} | 3.40* | 2.49 ^{NS} | 2.97* |
| Tempo | | 2.11 ^{NS} | 11.99** | 28.57** | 34.24** |
| Tratamento X Tempo | | 3.94** | 5.26** | 2.87* | 4.76** |
| C.V. ⁴ | | 39.70 | 41.27 | 39.01 | 37.16 |

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05).

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Controle inoculados e não tratados; Tratados com 250 µg de zafirlucaste; Tratados com 500 µg de zafirlucaste.

⁴ CV- Coeficiente de Variação (%); NS - Não significativo; *significativo para P<0,05; **Significativo para P<0,01

Não se observou variações significativas ($p>0,05$) nas contagens relativas de leucócitos circulantes entre os tratamentos (Tabela 5). Entretanto, os valores percentuais de leucócitos variaram ao longo do tempo, com diminuição significativa ($p<0,05$) de neutrófilos 24 e 48 HPI, associada em aumento ($p<0,05$) nos valores percentuais de monócitos e linfócitos.

Tabela 5. Valores médios¹ (\pm DP) e ANOVA² das contagens percentuais de leucócitos presentes no sangue durante aerocistite induzida por bacterinas de *Aeromonas hydrophila* em tilápias.

| Período | Tratamentos ³ | Neutrófilos (μ L) | Monócitos (μ L) | Linfócitos (μ L) |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 6 horas | 500 mg | 49.00 \pm 12.53 Aa | 6.00 \pm 1.85 Ab | 43.75 \pm 11.06 Ac |
| | 250 mg | 48.44 \pm 19.39 Aa | 6.88 \pm 3.91 Ab | 44.44 \pm 16.88 Ab |
| | Controle | 51.33 \pm 11.36 Aa | 7.77 \pm 4.17 Aa | 40.66 \pm 10.38 Ab |
| 24 horas | 500 mg | 30.33 \pm 5.09 Ab | 8.77 \pm 1.56 Aa | 60.88 \pm 5.60 Ab |
| | 250 mg | 23.55 \pm 5.65 Ab | 9.11 \pm 2.10 Aab | 68.00 \pm 7.00 Aa |
| | Controle | 29.50 \pm 8.50 Ab | 8.87 \pm 3.13 Aa | 61.62 \pm 9.95 Aa |
| 48 horas | 500 mg | 21.22 \pm 4.32 Ac | 9.11 \pm 1.61 Aa | 69.66 \pm 4.06 Aa |
| | 250 mg | 18.37 \pm 4.27 Ab | 9.75 \pm 3.01 Aa | 72.12 \pm 4.29 Aa |
| | Controle | 23.22 \pm 3.73 Ab | 8.22 \pm 1.85 Aa | 68.55 \pm 4.53 Aa |
| Tratamento ⁴ | | 1.55 ^{NS} | 0.33 ^{NS} | 1.76 ^{NS} |
| Tempo | | 61.77 ^{**} | 4.94 ^{**} | 62.37 ^{**} |
| Tratamento X Tempo | | 0.24 ^{NS} | 0.64 ^{NS} | 0.30 ^{NS} |
| C.V. ⁴ | | 29.55 | 33.32 | 15.51 |

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T ($P<0,05$).

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Controle inoculados e não tratados; Tratados com 250 μ g de zafirlucaste; Tratados com 500 μ g de zafirlucaste.

⁴ CV- Coeficiente de Variação (%); NS - Não significativo; *significativo para $P<0,05$; **Significativo para $P<0,01$

Tilápias tratadas com 500 μ g de zafirlucaste apresentaram aumento do número de eritrócitos circulantes (Tabela 6) quando comparadas aos animais

tratados com 250 µg e do grupo controle 6 e 24 HPI, sendo associado à diminuição significativa ($p < 0,05$) do VCM e CHCM. A aerocistite aguda induzida pela bacterina de *A. hydrophila* resultou em aumento ($p < 0,05$) dos valores de hematócrito e VCM em animais controles 24 HPI.

Tabela 6. Valores médios¹ (\pm DP) e ANOVA² de parâmetros eritrocitários durante aerocistite induzida por bacterinas de *Aeromonas hydrophila* em tilápias.

| Período | Tratamentos ³ | Eritrócitos totais (µL) | Hematócrito (µL) | VCM ⁵ (µL) | Hemoglobina (µL) | CHCM ⁵ (µL) |
|-------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 6 hora: | 500 mg | 2.82 \pm 0.81 Aa | 27.12 \pm 2.64 Aa | 103.15 \pm 31.37 Bab | 5.43 \pm 1.22 Aa | 20.01 \pm 4.16 Aab |
| | 250 mg | 1.93 \pm 0.55 Ba | 26.55 \pm 1.58 Ab | 144.67 \pm 31.38 Aa | 4.96 \pm 0.58 Ab | 18.74 \pm 2.30 Aa |
| | Controle | 2.13 \pm 0.59 Ba | 25.66 \pm 3.70 Ab | 129.40 \pm 40.87 ABa | 4.80 \pm 0.98 Aa | 18.72 \pm 3.03 Aa |
| 24 horas | 500 mg | 2.88 \pm 0.60 Aa | 26.66 \pm 3.46 Ba | 95.84 \pm 20.62 Bb | 4.70 \pm 0.93 Aa | 17.71 \pm 3.43 Ab |
| | 250 mg | 1.70 \pm 0.23 Ba | 26.66 \pm 4.40 Bb | 156.17 \pm 40.95 Aa | 4.71 \pm 0.57 Ab | 18.00 \pm 3.13 Aa |
| | Controle | 2.13 \pm 0.68 Ba | 30.62 \pm 4.17 Aa | 164.15 \pm 79.58 Aa | 4.57 \pm 0.53 Aa | 15.12 \pm 2.29 Ab |
| 48 hora: | 500 mg | 1.91 \pm 0.11 Ab | 25.22 \pm 5.14 Ba | 132.17 \pm 25.73 Aa | 5.24 \pm 0.91 Aba | 21.54 \pm 5.61 Aa |
| | 250 mg | 2.03 \pm 0.38 Aa | 30.77 \pm 3.86 Aa | 155.75 \pm 29.33 Aa | 5.75 \pm 0.75 Aa | 18.96 \pm 3.61 Aa |
| | Controle | 2.04 \pm 0.70 Aa | 26.55 \pm 3.32 Bb | 138.24 \pm 30.47 Aa | 5.05 \pm 0.81 Aa | 19.12 \pm 3.01 Aa |
| Tratamento ⁴ | 9.31** | 1.43 ^{NS} | 9.21** | 1.28 ^{NS} | 2.29 ^{NS} | |
| Tempo | 2.20 ^{NS} | 1.16 ^{NS} | 1.40 ^{NS} | 4.40* | 4.89** | |
| Tratamento X Tempo | 3.63** | 3.69** | 1.60 ^{NS} | 0.84 ^{NS} | 0.64 ^{NS} | |
| C.V. ⁴ | 25.61 | 13.67 | 27.56 | 16.89 | 18.94 | |

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T ($P < 0,05$).

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Controle inoculados e não tratados; Tratados com 250 µg de zafirlucaste; Tratados com 500 µg de zafirlucaste.

⁴ CV- Coeficiente de Variação (%); NS - Não significativo; *significativo para $P < 0,05$; **Significativo para $P < 0,01$

⁵VCM – Volume corpuscular médio; CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média.

O tratamento com 500 µg de zafirlucaste resultou em microcitose e hipocromia. Estes quadros de microcitose podem ocorrer no curso de processos inflamatórios (VAN VRANKEN, 2010). Entretanto, foi evidente o efeito colateral do tratamento com 500 µg de zafirlucaste em peixes durante a inflamação aguda. Diversos estudos vêm demonstrando a hepatotoxicidade de tratamentos com zafirlucaste (REINUS et al., 2000; SCHEEN, 2001; MARCY et al., 2004). Tais

achados sugerem a hipótese de que o tratamento com esta dose do fármaco tenha resultado em alterações hepáticas nas tilápias.

O estudo dos valores médios de glicose no sangue não revelou alterações significativas ($p > 0,05$), entre os diferentes tratamentos. Porém, observa-se na Figura 14 aumentos nos valores de glicemia com 24 HPI em todos os tratamentos, sugerindo um incremento no metabolismo energético juntamente com o pico de resposta de migração celular no foco inflamado. A participação de hormônios esteróides como o cortisol durante as respostas de defesa favorecem ações glicocorticoides por atuar modulando mecanismos neoglicogênicos e glicogenólicos (Belo et al., 2005; 2012).

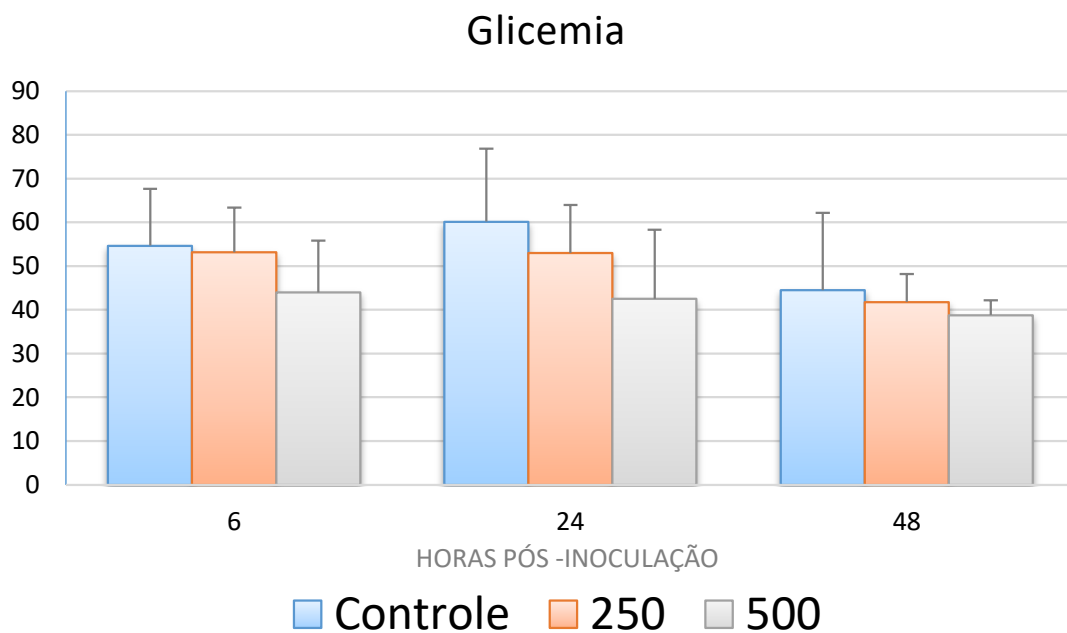


Figura 14: Valores médios ($\pm DP$) observados na determinação dos valores sanguíneos de glicose em tilápias submetidas aos diferentes tratamentos durante aerocistite induzida por bacterinas de *A. hydrophila*. * Controle inoculados e não tratados; Tratados com 250 μg de zafirlucaste; Tratados com 500 μg de zafirlucaste.

8. CONCLUSÕES

Tilápias tratadas com o bloqueador de leucotrienos cisteínicos zafirlucaste demonstraram diminuição do acúmulo de células inflamatórias no exsudato associado ao aumento do número de leucócitos e trombócitos circulantes na fase inicial da reação inflamatória aguda, sugerindo ação anti-inflamatória por diminuição da diapedese. Entretanto, animais submetidos ao tratamento com 500 µg apresentaram efeitos hematológicos adversos caracterizados por microcitose e hipocromia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ANDERSON, R.; THERON A.J., GRAVETT C.M.; STEEL H.C.; TINTINGER G.R.; FELDMAN C. Montelukast inhibits neutrophil pro-inflammatory activity by a cyclic AMP-dependent mechanism. *British Journal of Pharmacology*, v.156, p.105–115, 2009.
- ARTS, M. T.; KOHLER, C.C. Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. *Lipids in aquatic ecosystems*. v.10, p.237-256, 2009.
- BELO, M. A. A. SCHALCH, S.H.C., MORAES, F.R., SOARES, V.E., OTOBONI, A., MORAES, J.E.R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Comparative Pathology*, 133(2-3), 146-154, 2005.
- BELO, M. A. A.; SOUZA, D. G. F., FARIA, V. P., PRADO, E. J. R., MORAES, F. R., ONAKA, E. M. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. *Journal of Fish Biology* v.82, p.1403-1410, 2013.
- BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E.; SOARES, V. E.; MARTINS, M. L.; BRUM, C. D.; MORAES, F.R. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 47, 1015-1021, 2012.
- BELO, M.A.A.; MORAES, F.R.; YOSHIDA, L.; PRADO, E.J.R.; MORAES, J.R.E.; SOARES, V.E.; SILVA, M.G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. *Aquaculture*, v.422-423, p.124-128, 2014.
- BRASIL 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura, Ministério da Pesca e Aquicultura, 1ed,136p 2014.

- CAPRA, V.; ROVATI G.E.; MANGANO P.; BUCCELLATI C.; MURPHY R.C; SALA A.; Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v.1851, p.377–382, 2015.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. *Aquaculture Research*, v.32, p. 298-304, 2001.
- CASTRO, M.P.; CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; SHIMADA, M.T.; BELO, M.A.A.; MACHADO, C.M.M.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 284-290, 2014.
- CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; CASTRO, M.P.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSSO, P.F. ; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines.. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 34, p. 1057-1062, 2013.
- ENDO, M.; ARUNLERTAE, C.; RUANGPAN, L.A. A new method for collecting neutrophils using swim bladder. *Fisheries science*, 63(4), 644-645, 1997.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2016 (SOFIA). <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/423722/> Acessado: 08 de fevereiro de 2017.
- FARIA V. P. Estudo da atividade imunomoduladora do macrolídeo tilosina sobre a resposta inflamatória aguda de tilápias do Nilo desafiadas com *Aeromonas hydrophila*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária (Patologia Animal) [Jaboticabal]) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.
- GRUYS, E.; TOUSSAINT M.J.; NIEWOLD T.A.; KOOPMANS S.J.; VAN D.E.; MELOEN R.H. Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta Histochemica*. v. 108, p. 229-232, 2006.

- KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* v.13, p. 159-175, 2013.
- MANRIQUE, W.G.; FIGUEIREDO M.A.; BELO M.A.A.; MARTINS M.L.; MORAES F.R. First report of *Myxobolus* sp. infection in the skeletal muscle of Neotropical freshwater fish *Piaractus mesopotamicus*. *Parasitology Research*, v. 114, p. 2041-2044, 2015.
- MARCY, T.R.; BRITTON, M.L.; BLEVINS, S.M. Second-generation thiazolidinediones and hepatotoxicity. *Annals of Pharmacotherapy*, v.38, n.9, p.1419-1423, 2004.
- MARTENINGHE, A. et al. Patogenicidade da infecção por *Aeromonas hydrophila* em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*) Anais do congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado, p.108, 2008.
- MORAES, J. R. E.; BOZZO, F.R.; OZORIO, R.O.A.; ENGRÁCIA FILHO, J.R.; MORAES, F. R. Acute aerocistitis induced by thioglycolate, lipopolysaccharide and inactivated *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*: hematological effects.. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 49, p. 345, 2012.
- NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Sci.*, v. 31, p. 735-738, 1952.
- OKUNISHI K.; PETERS-GOLDEN M. Leukotrienes and airway inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1810, p.1096–1102, 2011.
- REINUS, J. F.; PERSKY, S.; BURKIEWICZ, J. S.; QUAN, D.; BASS, N. M.; DAVERN, T. Severe liver injury after treatment with the leukotriene receptor antagonist zafirlukast. *Annals of internal medicine*, v.133, n.12, p.964-968, 2000.

- REQUE, V.R.; MORAES, J.E.R., BELO, M.A.A., MORAES, F.R. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture* 300, 37–42, 2010.
- SAKABE, R.; MORAES, F.R.; BELO, M.A.A.; PILARSKI, F.; MORAES, J.R.E. Kinetics of chronic inflammation in Nile tilapia fed n-3 and n-6 essential fatty acids. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, p. 313-319, 2013.
- SAS Institute Inc. (2012) SAS/STAT software changes and enhancements through computer program. Release 9.3. Cary: SAS Institute.
- SCHEEN, A. Thiazolidinediones and liver toxicity. *Diabetes & metabolism*, v. 27, n.3, p.305-313, 2001.
- SCOTT JP, PETERS-GOLDEN M. Antileukotriene agents for the treatment of lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v.188, p.538–544, 2013.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, G. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames. 1984.
- VAN VRANKEN, M. Evaluation of microcytosis. *American family physician*, v.82, n.9, p. 1117-1122, 2010.
- WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal Fisheries Research Board of Canada*. v.22, n.5, 1980.
- WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 103, n. 3, p. 378-381, 1999.
- WOSZCZEK, G.; CHEN L.Y.; NAGINENI S.; SHELHAMER J.H. Concentration-dependent noncysteinyl leukotriene type 1 receptor-mediated inhibitory activity of leukotriene receptor antagonists. *The Journal of Immunology*. v.184, n.4, p.2219–2225, 2010.

ZHANG, H.; WU H.; GAO L.; QIU Y.; XIAO J.; ZHANG Y. Identification, expression and immunological responses to bacterial challenge following vaccination of BLT1 gene from turbot, *Scophthalmus maximus*. *Gene*. v. 557, p. 229–235, 2015.

ZIMMERMANN, S. FITZSIMMONS, K. Tilapicultura Intensiva. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva, Chapter: Capítulo 9 - Publisher: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, pp.239-266, 2004.