



**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**SIMONE CRISTINA DA SILVA HRUSCHKA**

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA HISTAMINA SOBRE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA AGUDA EM TILÁPIAS DO NILO, INOCULADAS COM  
*Aeromonas hydrophila*.**

**DESCALVADO  
2016**



*Simone Cristina da Silva Hruschka*

**Estudo da participação da histamina sobre a resposta inflamatória aguda em tilápias do Nilo, inoculadas com *Aeromonas hydrophila*.**

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– UNICASTELO - Campus de Descalvado – SP.

**Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo**

**Descalvado  
2016**

H857e Hruschka, Simone Cristina da Silva  
Estudo da participação da histamina sobre a resposta inflamatória aguda em tilápias do Nilo, inoculadas com *Aeromonas hydrophila* / Simone Cristina da Silva Hruschka. -- Descalvado: Universidade Brasil, 2016.  
32p. : 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: Profº Drº Marco Antonio de Andrade Belo

1. Aerocistite. 2. Anti-histamínico. 3. Histamina.  
4. Inflamação. 5. Ciclídeos. 6. Permeabilidade vascular.  
I. Título.

CDD 639.3

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**Acadêmico (a):** SIMONE SILVA HRUSCHKA

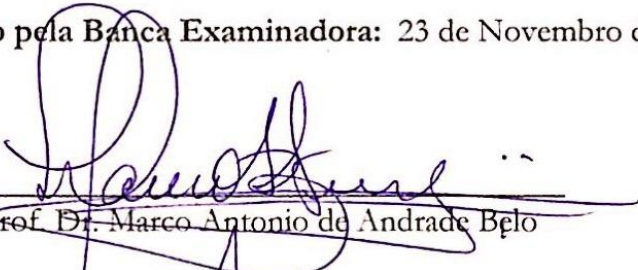
**Título do Trabalho:**

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA HISTAMINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM TILÁPIAS DO NILO, INOCULADAS COM *Aeromonas hydrophyla*.

**Data da avaliação pela Banca Examinadora:** 23 de Novembro de 2016.

**Banca:**

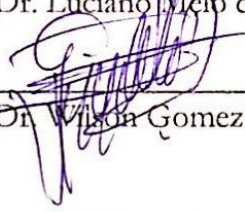
**Orientador (a):**

  
Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

**Examinador 1:**

  
Prof. Dr. Luciano Melo de Souza

**Examinador 2:**

  
Prof. Dr. Wilson Gomez Manrique

APROVADO(A) pelo SESMEV em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ com Nota: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luciano Melo de Souza  
Supervisor Geral TCC – SESMEV.  
Campus de Descalvado, SP.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família, pois sem o seu apoio nada seria possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos concedidas.

Ao meu marido Estevam por todo seu amor, apoio na realização do meu sonho e por sempre acreditar em mim.

À minha filha Valentina pela paciência e compreensão por tantos momentos em que eu estive ausente.

À minha sogra e mãe Eliane pelos cuidados com a Valentina para que eu pudesse me dedicar aos meus estudos.

Ao meu sogro e pai Estevam por toda a paciência em me levar, esperar e buscar na faculdade por alguns anos e assim contribuindo no meu aprendizado.

Aos meus amigos e irmãos Ingrid e Ivan pela amizade, cumplicidade, carinho e apoio.

À Priscila pela ajuda e parceria no projeto de pesquisa e nos trabalhos da faculdade.

À Juliana pelos incentivos positivos com a sua palavra favorita “Coragem”.

Ao Rodrigo pelas explicações técnicas.

Ao Alexandre pelas ajudas na manutenção dos peixes do laboratório e nos trabalhos da faculdade.

Aos meus professores, em especial ao professor Dr. Marco Belo pelos seus ensinamentos, pela oportunidade em desenvolver minhas iniciações científicas e pela concretização deste trabalho.

É um agradecimento mais que especial a todos os animais, aos vivos e aos que doaram suas vidas para que eu pudesse aprender e evoluir, para tornar a vida de tantos outros melhor.

E um muito obrigada à todos que contribuíram de alguma forma na minha formação.

## EPÍGRAFE

*“Todas as coisas da criação são filhos do Pai e irmãos do homem. Deus quer que ajudemos aos animais, se necessitam de ajuda. Toda criatura em desgraça tem o mesmo direito a ser protegida.”*

*Francisco de Assis*

## RESUMO

Este estudo propôs avaliar a participação da histamina na reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo (*Oerochromis niloticus*) desafiadas com inóculos de *Aeromonas hydrophila*, submetidas ou não ao tratamento parenteral com o anti-histamínico receptores H<sub>1</sub> prometazina, por meio da: análise celular presente no exsudato inflamatório, avaliação do leucograma, estudo da permeabilidade vascular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e análise de formação de centros de melanomacrófagos no tecido esplênico. Para a realização deste trabalho, 63 tilápias do Nilo (*Oerochromis niloticus*), com peso médio de 18,78 g, oriundas da mesma desova, foram distribuídas aleatoriamente em 10 aquários com capacidade de 100 L de água cada, constituindo três tratamentos: T1= sem anti-histamínico (controle); T2= com administração de prometazina via intramuscular; T3= com administração de prometazina na cavidade celomática. No primeiro ensaio experimental foram amostrados sete animais por tratamento para estudo do acúmulo celular na aerocistite e análise do leucograma em três períodos, isto é: 6, 12 e 24 horas pós infecção (HPI). Num segundo ensaio foram amostrados sete animais por tratamento para análise de permeabilidade vascular realizado 3, 6 e 12 HPI, para a avaliação da resposta no tempo, constituindo 9 grupos experimentais, sendo três por tratamento. A administração do anti-histamínico foi realizado no momento da infecção, via IM na dose de 0,5 mg/kg de peso vivo e na cavidade celomática. Os resultados observados na avaliação celular do exsudato apresentam correlação aos resultados do leucograma 6 e 12 HPI, com diminuição de granulócitos no exsudato, aumento significativo de neutrófilos no sangue e da produção ROS, associado ao aumento na formação CMM no baço 12 HPI. O estudo de permeabilidade vascular demonstrou diminuição de exsudação 6 HPI em animais tratados com prometazina.

**Palavras-chave:** Aerocistite; anti-histamínico; histamina; inflamação; *Ciclídeos*; permeabilidade vascular;



# SUMÁRIO

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....                                                       | i  |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                                                       | ii |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                               | 1  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA.....                                                     | 2  |
| 2.1 Inflamação em peixes teleósteos.....                                         | 2  |
| 2.2 Centro de melanomacrófagos em peixes teleósteos .....                        | 3  |
| 2.3 Histamina e anti-histamínicos.....                                           | 4  |
| 2.4 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....                                            | 7  |
| 3 JUSTIFICATIVA .....                                                            | 8  |
| 4 OBJETIVOS .....                                                                | 8  |
| 4.1 Objetivos Específicos.....                                                   | 8  |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                        | 9  |
| 5.1 Peixes e acondicionamento .....                                              | 9  |
| 5.2 Delineamento experimental.....                                               | 9  |
| 5.3 Anestesia dos peixes.....                                                    | 11 |
| 5.4 Isolamento de <i>Aeromonas hydrophila</i> e infecção experimental.....       | 12 |
| 5.5 Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória.....         | 12 |
| 5.6 Avaliação hematológica .....                                                 | 14 |
| 5.7 Permeabilidade vascular .....                                                | 15 |
| 5.8 Avaliação da atividade respiratória dos leucócitos (burst respiratório)..... | 16 |
| 5.9 Avaliação histológica.....                                                   | 17 |
| 5.10 Análise estatística.....                                                    | 18 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                   | 19 |
| 6.1 Exsudato.....                                                                | 19 |
| 6.2 Leucograma.....                                                              | 20 |
| 6.3 Burst respiratório.....                                                      | 21 |
| 6.4 Histopatologia .....                                                         | 22 |
| 6.5 Permeabilidade vascular .....                                                | 24 |
| 7 CONCLUSÕES .....                                                               | 25 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                  | 26 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Administração de Prometazina na dose 0,5 mg/kg intramuscular em tilápia do Nilo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 10 |
| Figura 2. Administração de Prometazina na dose de 0,5 mg/kg na cavidade celomática em tilápia do Nilo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 10 |
| Figura 3. Aprofundamento em plano anestésico tilápia do Nilo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 11 |
| Figura 4. Bexiga natatória com exsudato inflamatório tilápia do Nilo. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 13 |
| Figura 5. Coleta de sangue de vaso caudal. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 14 |
| Figura 6. Amostra de sangue para determinação da contagem total de células vermelhas e brancas. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 15 |
| Figura 7. Administração de solução de Evans, para avaliação da permeabilidade vascular.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 16 |
| Figura 8. Aparelhos de processamento histológico. (A): Aparelho EFTP - Processador vertical da marca Easy Path® que desidrata, diafaniza e inclui as amostras. (B): Bellatrix - Corador automático de lâminas da marca Easy Path® usado para corar as lâminas com Hematoxilina-Eosina (HE). ....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 18 |
| Figura 9. Valores médios <sup>1</sup> observados na atividade respiratória de leucócitos (Burst oxidativo respiratório) de tilápias do Nilo ( <i>Oerochromis niloticus</i> ) desafiadas com inóculos de <i>Aeromonas hydrophila</i> , submetidas ou não ao tratamento parenteral com o anti-histamínico de receptores H1 (prometazina). ....                                                                                                                                                                                                                                   | 22 |
| Figura 10. Fotomicrografia do tecido esplênico (A e B) das tilápias com aerocistite infecciosa por <i>Aeromonas hydrophila</i> e tratadas com prometazina, as setas destacam a formação de centros de melanomacrófagos (HE, X400). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 24 |
| Figura 11. Valores médios (n=7) e análise de significância estatística observados na permeabilidade vascular em tilápias tratadas com prometazina durante aerocistite infecciosa por <i>Aeromonas hydrophila</i> . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo. Peixes inoculados: Controle (não tratado), IM (tratamento intramuscular) e IC (tratamento intra-celomático). .... | 25 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CHCM:** Concentração hemoglobina corpuscular média

**CMM:** Centros de Melanomacrófagos

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético

**EPC:** Produto extracelular

**H1:** Receptor histamina - músculo liso, endotélio, cérebro

**H2:** Receptor histamina - células parietais gástricas, músculo cardíaco, cérebro

**H3:** Receptor histamina - SNC e alguns nervos periféricos

**H4:** Receptor histamina - células hematopoiéticas, mucosa gástrica

**HE:** Hematoxilina-Eosina

**HG:** Hemoglobina

**HPI:** Horas pós infecção

**HT:** Hematócrito

**IC:** Intracelomática

**IM:** Intramuscular

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**NaCl:** Cloreto de sódio

**NBT:** Nitroblue Tetrazolium

**PBS:** Tampão fosfato-salino

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**PV:** Permeabilidade vascular

**ROS:** Espécies reativas de oxigênio

**SAS:** Sistema de análise estatística

**T1:** Tratamento 1

**T2:** Tratamento 2

**T3:** Tratamento 3

**TBS:** Caldo tríptico de soja

**UFC:** Unidade formadora de colônias

**VCM:** Volume corpuscular médio

# 1 INTRODUÇÃO

O setor de pescado no Brasil apresentou um crescimento de 31,2% na produção anual entre os anos 2008 e 2010, atingindo quase 500 mil toneladas/ano (FLORES & FILHO, 2003). Neste contexto, destaca-se a tilapicultura, devido à elevada precocidade e rusticidade da espécie, além também da sua carne ser altamente apreciada pelo consumidor. A biomanipulação dos ecossistemas aquáticos com a maximização dos recursos produtivos traz consigo inúmeros desafios, dentre os quais se destaca o controle sanitário das populações de peixes (BELO et al., 2005).

Agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem se tornar agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando os mesmos são submetidos às condições de criação (YOUSEFIAN & AMIRI, 2009). A bactéria *Aeromonas hydrophila* é considerada um patógeno oportunista, responsável por enormes perdas econômicas em tilapiculturas intensivas, e segundo a Organização Mundial da Saúde, é considerada uma doença de veiculação hídrica para os seres humanos, apresentado grande importância para a saúde pública (MERINO et al., 1995).

Segundo Reque et al. (2010), as infecções bacterianas são agressões biológicas ao organismo dos peixes que respondem através da reação inflamatória na tentativa de diluir, circunscrever e isolar ou destruir o agente agressor. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, e se caracteriza por vasodilatação arteriolar, capilar e venular, aumento de permeabilidade vascular e instituição de edema, aumento da viscosidade sanguínea e marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes (MORAES & MORAES, 2009). Neste contexto, a histamina é um autacóide importante mediador dos processos inflamatórios. Suas ações sobre o músculo liso e endotélio vascular, permitem a dilatação ou constrição de determinados vasos sanguíneos, participando de mecanismos de permeabilidade vascular (ARMSTRONG & KVEDAR, 2011).

Partindo-se da importância patogênica da aeromonose para tilapicultura intensiva e da importância da reação inflamatória na resposta de defesa dos peixes

teleósteos, este estudo propõe avaliar a participação da histamina na reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas hydrophila* e submetidas ao tratamento parenteral com o anti-histamínico de receptores H<sub>1</sub> prometazina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Inflamação em peixes teleósteos

A inflamação é uma reação do organismo contra um agente agressor ou lesão tecidual. Estímulos exógenos, químicos, físicos ou biológicos podem causar agressão celular e diante dessa agressão o organismo, por sua vez, libera mediadores químicos visando a cura e/ou o reparo do tecido. A inflamação pode ainda ser caracterizada através de dois padrões de resposta inflamatória, a aguda e a crônica.

Segundo Castro et al. (2014), os processos infecciosos, inflamatórios e cicatriciais e seus mecanismos de controle são bem conhecidos em mamíferos. Entretanto, pouco se conhece desses processos em outras classes, principalmente os peixes. De acordo com Bozzo (2007), as primeiras observações sobre a infecção e a inflamação em peixes foram realizadas por Metchnikoff em 1893.

A inoculação de *A. hydrophila* inativada, tioglicolato e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* na bexiga natatória de *Piaractus mesopotamicus*, demonstrou após 24 horas maior acúmulo de exsudato com presença marcante de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos que variaram de acordo com o tipo de estímulo inflamatório (BOZZO et al., 2007). No entanto, Endo et al. (1997) demonstraram que a injeção de LPS na bexiga natatória de *Oerochromis niloticus* induz a formação de exsudato constituído principalmente por neutrófilos (96%) 24 horas depois da aplicação. Resultados semelhantes como acúmulo de granulócitos foi encontrado por Moraes et al. (2011) em estímulo por *A. hydrophila* na mesma espécie, diferentemente de Claudiano et al. (2011; 2013) que verificaram intensa exsudação de trombócitos na fase mais aguda da resposta inflamatória aguda.

*P. mesopotamicus*, pacus alimentados com uma dieta suplementada com 450 mg de vitamina E mostraram aumento significativo no número de macrófagos e formação de células policariontes nas lamínulas de vidro. Os estudos revelou também que as concentrações de cortisol no plasma foram maiores em peixes não suplementados. Assim, pode-se observar que tal suplementação contribuiu para um aumento na atividade do recrutamento de macrófagos, bem como na formação de células gigantes tipo corpo estranho (BELO et al., 2005).

Belo et al. (2012) observaram que suplementação com 500 mg de ascorbil polifosfato na alimentação de pacus beneficia a atividade dos macrófagos na inflamação crônica do tipo corpo estranho, sendo inclusive observado que a alta concentração de cortisol no plasma tem um efeito inibidor na resposta da atividade dos macrófagos.

## **2.2 Centro de melanomacrófagos em peixes teleósteos**

Em virtude da riqueza de células fagocitárias, o baço constitui importante órgão de defesa contra microrganismos que penetram nos vasos sanguíneos, sendo também o principal órgão destruidor de eritrócitos desgastados (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Os centros de melanomacrófagos são agregados pigmentados de macrófagos. Lipofusina, hemossiderina, ceróide e melanina são pigmentos que os constituem (BALAMURUGAN et al., 2012). Estes pigmentos apresentam atividades funcionais sendo que a hemossiderina está relacionada com a estocagem e o reaproveitamento do ferro dos eritrócitos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004) fagocitados. Os teleósteos apresentam quantidade variável de centros melanomacrófagos ou agregados de macrófagos nos diferentes tecidos, em particular fígado, baço e rim (MESSEGUER et al., 1994). Os centros melanomacrófagos são comumente nodulares com delicada cápsula argirofílica e geralmente restrito aos canais vasculares (AGIUS, 1985). São inúmeras as funções atribuídas aos melanomacrófagos, tais como: fagocitose de patógenos resistentes como esporos de parasitos e bactérias (ROBERTS, 1975); processamento de antígenos na resposta imune (AGIUS, 1985); destruição, detoxificação ou reciclagem

de materiais endógenos e exógenos (FERGUSON, 1976; ELLIS, 1980, HERRAEZ; ZAPATA, 1986); depósito de metabólitos de células mortas, incluindo-se os eritrócitos (ROBERTS, 1975; AGIUS, 1980; FULOP; MCMILLAN, 1984) e resposta a corpos estranhos, incluindo agentes infecciosos (AGIUS; ROBERTS, 2003).

### **2.3 Histamina e anti-histamínicos**

A histamina é encontrada em numerosos tecidos. Sendo ela um autacóide, é secretada localmente para aumentar ou diminuir a atividade das células adjacentes, além de ser um importante mediador dos processos inflamatórios. Suas ações sobre o músculo liso e endotélio vascular, permitem a dilatação ou constrição de determinados vasos sanguíneos. A histamina dilata todas as arteríolas terminais e vênulas pós-capilares. Todavia as veias sofrem constrição com a ação da histamina. O efeito dilatador das vênulas pós-capilares constitui o efeito mais proeminente da histamina sobre a vasculatura (ARMOSTRONG & KVEDAR, 2011).

Na presença de infecção ou lesão, a dilatação das vênulas induzida pela histamina faz com que a microvasculatura local seja ingurgitada com sangue, aumentando o acesso das células imunes que iniciam os processos de reparo na área lesada. A contração das células endoteliais vasculares induzida pela histamina provoca a separação dessas células, permitindo o escape de proteínas plasmáticas e líquido das vênulas pós-capilares formando o edema. O aumento da permeabilidade vascular está associado à ação em receptores do tipo H<sub>1</sub> (ARMOSTRONG & KVEDAR, 2011).

Durante a inflamação aguda, os mastócitos residentes no foco inflamatório liberam histamina por mecanismos não imunológicos, representados por estímulos físicos (traumas, frio, calor) e estímulos químicos como outros mediadores químicos inflamatórios (substância P, bradicinina, interleucina I e VIII e anafilatoxinas – fração C3a e C5a do sistema complemento) e substâncias exógenas (veneno de abelha, morfina) (SPINOSA et al., 1996).

A ação da histamina é mediada por pelo menos quatro receptores farmacologicamente distintos, todos membros da família de receptores acoplados à



proteína G. O receptor H<sub>1</sub> é expresso no cérebro, células endoteliais e células da musculatura lisa. As principais ações do receptor H<sub>1</sub> são a contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular. O receptor H<sub>2</sub> apresenta papel importante na modulação da secreção gástrica ácida e antagonistas de receptor H<sub>2</sub> são amplamente utilizados no tratamento de úlceras gastrointestinais. Os receptores H<sub>3</sub> estão localizados nas terminações nervosas e corpos celulares de neurônios histaminérgicos presentes no núcleo tuberomamilar no hipotálamo. Muito pouco é conhecido sobre o papel biológico do receptor H<sub>4</sub>. Foi postulado papel na inflamação, visto que o receptor H<sub>4</sub> está limitado às células hematopoiéticas (ASHMAWI et al., 2009).

Os antagonistas H<sub>1</sub> podem ser caracterizados pela inibição da atividade constritora da histamina sobre a musculatura lisa não vascular, por antagonismo competitivo da histamina, bloqueio parcial da vasodilatação inflamatória, pois tais circunstâncias existe um efeito vasodilatador residual da histamina mediado por receptores H<sub>2</sub>, bloqueio total do aumento da permeabilidade vascular, prevenindo a formação do edema e ação anestésica local, por bloqueio de receptores H<sub>1</sub> das terminações nervosas presentes no local inflamado (SPINOSA et. al, 1996).

Mulero et al. (2007) mostraram que peixes teleósteos armazenam histamina nos seus mastócitos e que a histamina é biologicamente ativa nestes peixes, sendo ela capaz de regular a resposta inflamatória pela ativação de fagócitos. Vários estudos (APUD Mulero) mostraram que, há numerosas células granulares na mucosa intestinal, derme e no tecido conectivos das brânquias de vários peixes teleósteos (APUD Mulero). Este estudo desenvolvido por Mulero, mostrou que a injeção intraperitoneal de histamina na dose de 500 mg/kg é capaz de induzir a morte nos peixes, fazer a contração do músculo liso do intestino e constrição dos vasos sanguíneos branquiais dos peixes. Além da histamina, o dimaprit® agonista H<sub>2</sub>, também induziu a morte e contração do músculo liso do intestino na mesma dose. A histamina quando associada a chlorpheniramine® antagonistas H<sub>1</sub>, ranitidine® antagonista H<sub>2</sub> e clobenpropit® antagonista H<sub>3</sub> também foram letais para os peixes na dose de 1mg/kg (MULERO et al., 2007).

Ferrara (2006) verificou os efeitos da histamina sobre o processo de

recuperação funcional, após hemilabirintectomia em peixes da espécie *Carassius auratus*. Neste estudo foi observado que a inibição do sistema histaminérgico, pela administração de clorfeniramina, na dose de 24 mg/kg, acelera o processo de recuperação funcional, quando comparado ao grupo salina. O bloqueio dos receptores H<sub>2</sub>, pela administração de zolantidina na dose de 18 mg/kg, atrasa o processo de compensação vestibular, quando comparado ao grupo salina. O aumento da liberação de histamina, pela administração do antagonista H<sub>3</sub>, tioperamida, na dose de 15 mg/kg atrasa o processo de recuperação funcional em aproximadamente uma semana, quando comparado ao grupo salina em *C. auratus*. Os dados indicam que altas concentrações de histamina prejudicam a compensação vestibular em *C. auratus*, e que o bloqueio do receptor H<sub>1</sub> facilita esse processo de recuperação funcional.

Ellis (1985) mostrou que a injeção intramuscular e na cavidade celomática do produto extracelular (EPC) de *A. salmonicida* em truta arco-íris, 100 g peso corporal produziu lesão associada com furunculose, a dose utilizada causou morte dos peixes em 6 horas após a injeção. Ocorreu diminuição no volume de histamina no intestino, aparecimento da histamina no sangue e degranulação de células granulares eosinofílicas na parede do intestino 45 minutos após a injeção.

Alterações nas brânquias de *Oerochromis niloticus* expostas ao cloridrato de prometazina por 96 horas foram observadas em diferentes doses deste anti-histamínico, resultando em comportamento anormal caracterizado por movimentos irregulares, perda do reflexo e hiperventilação durante o período de exposição. A análise histológica das brânquias mostrou alterações, como desprendimento de células epiteliais na lamela primária e secundária. A osmorregulação e respiração fraca e o acúmulo de muco com desprendimento do epitélio, sugeriu a causa da mortalidade nos peixes. A concentração baixa de (0,01 e 0,02 g/L<sup>-1</sup>), não afeta as estruturas das brânquias, já concentrações elevadas (0,04 e 0,05 g/L<sup>-1</sup>) reduziu os filamentos em comprimento e sem a presença de lamelas. Também ocorreu degeneração parcial da lamela e hipertrofia dos filamentos da estruturas do arco das brânquias. A dose letal de prometazina® para *Oerochromis niloticus* foi determinada 0.035 g/L<sup>-1</sup> (PAPOOLA & OLUFAYO, 2007).

## 2.4 *Aeromonas hydrophila*

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

Consideradas oportunistas, se manifestam em hospedeiros debilitados ou infectados por outros patógenos (DOOLEY & TRUST, 1988; MERINO et al., 1995). Neste caso, o estresse, principalmente provocado por condições ambientais e fisiológicas adversas, é considerado um fator predisponente ao aparecimento da doença causada por esta bactéria (MERINO et al., 1995).

Fatores de risco predisponentes incluem alterações bruscas de temperatura, elevadas densidades de estocagem, poluição orgânica, hipóxia, entre outros. As aeromonas móveis geralmente invadem feridas na pele, comumente com infecções por fungos ou ectoparasitos (NOGA, 1986). Fatores produzidos pela bactéria, que podem facilitar o contágio, são importantes elementos de virulência bacteriana. Dentre estes destacam-se as fimbrias, que facilita sua adesão às células do hospedeiro (CIPRIANO, 2001). Os sinais clínicos característicos da aeromonose são a septicemia hemorrágica, petéquias distribuídas por toda a superfície corporal do animal, anemia, corrosão de nadadeira, ulcerações oculares, eritrodermatite, escamas protusas, exoftalmia e distensão abdominal por ascite (AUSTIN & AUSTIN, 1999; KIROV et al., 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, *Aeromonas hydrophila* é considerada uma doença de veiculação hídrica para os seres humanos, apresentado grande importância para a saúde pública (MERINO et al., 1995). Em seres humanos, esta bactéria pode causar febre, dor abdominal, vômito, diarreias, meningite, endocardite, septicemia, inflamação do tecido conjuntivo e síndrome urêmica, além de infecções respiratórias e intestinais, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (JANDA & ABBOTT, 1998).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista o importante papel biológico da histamina sobre a permeabilidade vascular e a escassa literatura deste autacóide em peixes teleósteos, este estudo propôs avaliar a participação da histamina na reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo desafiadas com inóculos de *Aeromonas hydrophila*, submetidas ou não ao tratamento parenteral com o anti-histamínico de receptores H<sub>1</sub> prometazina®. Para isso foram utilizados duas formas de administração deste anti-histamínico: uma diluída em solução oleosa para administração intramuscular, aumentando o seu tempo de absorção e tornando o efeito mais prolongado e contínuo e outra de administração na cavidade celomática em solução aquosa, tornado seu efeito mais rápido porém mais intenso, permitindo uma resposta aguda potencializada. Assim sendo, a correlação entre os estudos propostos: acúmulo celular presente no exsudato inflamatório, a avaliação celular no leucograma e de permeabilidade vascular forneceram subsídios importantes na compreensão da participação da histamina na fisiopatologia da reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo.

### **4 OBJETIVOS**

Avaliar a participação da histamina na reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo desafiadas com inóculos de *Aeromonas hydrophila*, submetidas ou não ao tratamento parenteral com o anti-histamínico de receptores H<sub>1</sub> prometazina.

#### **4.1 Objetivos Específicos**

1. Análise celular presente no exsudato inflamatório,
2. Avaliação do leucograma, estudo da permeabilidade vascular,
3. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)
4. Análise de formação de centros de melanomacrófagos no tecido esplênico.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Peixes e acondicionamento

Foram realizados dois estudos: um contendo 63 tilápias do Nilo (*Oerochromis niloticus*), com peso médio de  $18,78 \pm g$ , oriundas da mesma desova, foram distribuídas aleatoriamente em 10 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 para realização do estudo do exsudato inflamatório e outro contendo 84 tilápias do Nilo, com peso médio de  $77,15 \pm g$ , oriundas da mesma desova, foram distribuídas aleatoriamente em 12 aquários com capacidade de 250 L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano, com vazão de 1 L/min para realização do estudo de permeabilidade vascular. Após o transporte para os aquários em ambos os estudos, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltassem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L (CARNEIRO & URBINATI, 2001). Os peixes receberam ração comercial peletizada (32% de proteína bruta), constituindo a dieta basal. O arraçoamento dos animais foi feito duas vezes ao dia, alimentados pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa dos aquários. A qualidade da água determinada nos momentos da alimentação, sendo a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido medidos pela sonda YSI, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pela sonda YSI, modelo 63.

### 5.2 Delineamento experimental

As 63 tilápias no estudo do exsudato foram distribuídas aleatoriamente em 10 aquários, constituindo três tratamentos: T1 = sem anti-histamínico (controle); T2 = com administração de prometazina via intramuscular (Figura 1); T3 = com administração de prometazina na cavidade celomática (Figura 2). No primeiro ensaio

experimental foram amostrados sete animais por tratamento para estudo do acúmulo celular na aerocistite e análise hematológica em três períodos, isto é: 6, 12 e 24 horas pós infecção (HPI). Num segundo ensaio foram amostrados sete animais por tratamento para análise de permeabilidade vascular realizado 3, 6 e 12 HPI, para a avaliação da resposta no tempo, constituindo 9 grupos experimentais, sendo três por tratamento.



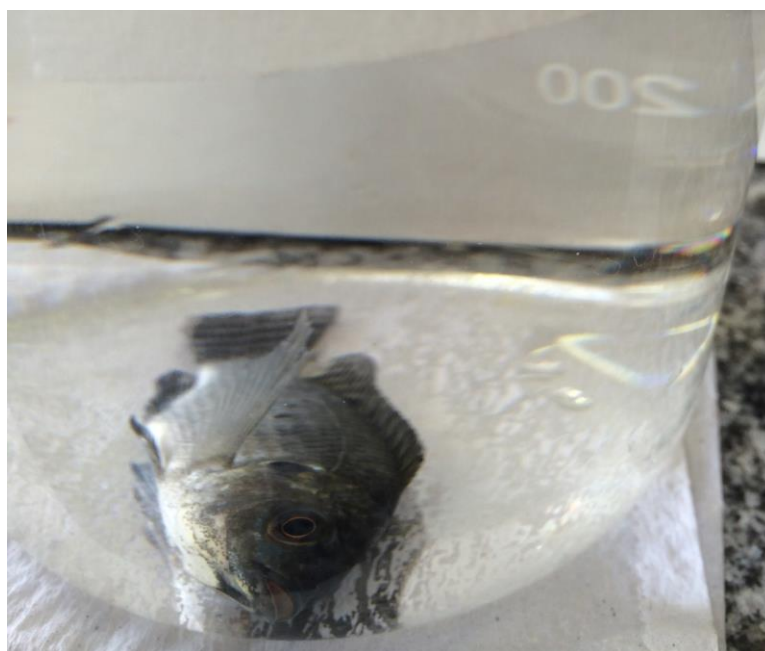
**Figura 1. Administração de Prometazina na dose 0,5 mg/kg intramuscular em tilápia do Nilo.**



**Figura 2. Administração de Prometazina na dose de 0,5 mg/kg na cavidade celomática em tilápia do Nilo.**

### 5.3 Anestesia dos peixes

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína (Figura 3) (Wedemeyer, 1970) na proporção de 1:10.000 v/v para sedação e a para captura dos animais para indução da infecção e de 1:500 v/v no momento da eutanásia. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1 L. Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados nos aquários com fluxo de água contínuo e aeração.



**Figura 3. Aprofundamento em plano anestésico tilápia do Nilo.**

#### **5.4 Isolamento de *Aeromonas hydrophila* e infecção experimental**

A cepa de *Aeromonas hydrophila* que foi utilizada neste trabalho foi isolada de peixes naturalmente infectados e foram fornecidas pelo Laboratório de Imunopatologia de Peixes, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP). A identificação foi realizada segundo Popoff (1984), acrescido de outras provas recomendadas por Buchanan & Palumbo (1985) e Abeyta Júnior et al., (1989). 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  $3 \times 10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. hydrophila*, utilizando-se 3 a 4 na escala de MacFarland (BOZZO, 2007). Com os peixes anestesiados, foi injetado o inóculo de *A. hydrophila* na bexiga natatória.

#### **5.5 Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória**

Para a avaliação do acúmulo de células totais, ao término dos tempos pré-estabelecidos de seis, 12 e 24 horas pós-infecção, os animais foram dissecados por um corte longitudinal ventral após anestesia profunda (conforme descrito item 5.2), 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 4). 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 monocal (100 a 1000µL), e transferido para eppendorf mantidos em gelo. 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 ressuspenso com a adição de 100 µL 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, coradas pelo método. 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 mantido refrigerado. 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 & MORAES, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz de até 200 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório.



**Figura 4. Bexiga natatória com exsudato inflamatório tilápia do Nilo.**

## 5.6 Avaliação hematológica

Foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal (Figura 5 e 6). A determinação da contagem total 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 v/v. 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 540 nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo  $VCM = (HT/HE) * 100$  e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo  $CHCM = (HG/HT) * 100$ . A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald-Giensa-Wright (TAVARES-DIAS & MORAES, 2003).



**Figura 5. Coleta de sangue de vaso caudal.**



**Figura 6. Amostra de sangue para determinação da contagem total de células vermelhas e brancas.**

### **5.7 Permeabilidade vascular**

Para avaliação do aumento de permeabilidade vascular (PV) uma solução de azul de Evans (25 mg/kg), a 2,5% em solução salina 0,65%, foi injetada na veia caudal 3, 6 e 12 HPI em todos os grupos (Figura 7). Depois de 30 min. da aplicação do corante os peixes foram mortos por aprofundamento de plano anestésico, a bexiga natatória foi lavada com 0,5 mL de solução gelada de PBS com EDTA (0,09%). O mesmo volume foi recolhido, centrifugado a 201 xg, por 5 min. e o sobrenadante com o corante submetido à espectrofotometria, na densidade óptica de 620 nm (HARA et al., 1994).



**Figura 7. Administração de solução de Evans, para avaliação da permeabilidade vascular.**

### **5.8 Avaliação da atividade respiratória dos leucócitos (burst respiratório)**

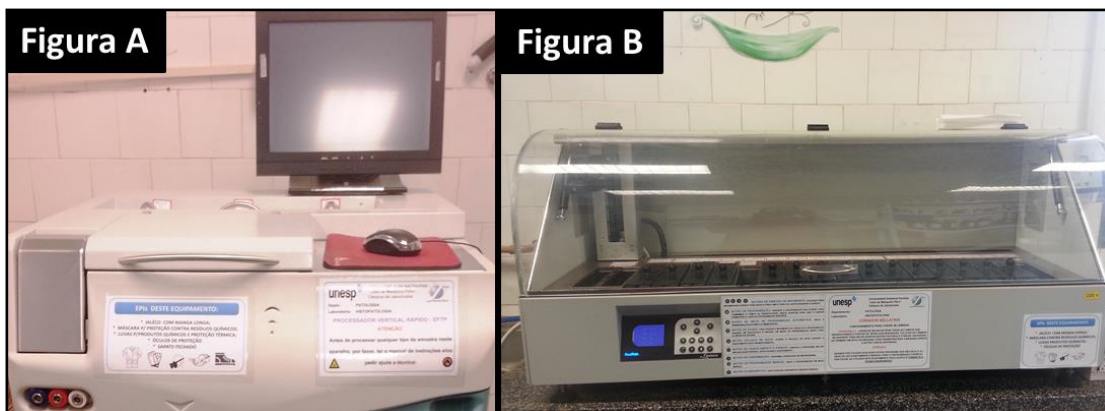
O sangue coletado para as análises hematológicas e bioquímicas também foi utilizado para a análise da atividade respiratória dos leucócitos (burst respiratório), segundo protocolo de Anderson & Siwichi (1995) modificado por Biller (2008). O método consistiu em determinar as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo burst respiratório por meio do ensaio calorimétrico baseado na redução do corante Nitroblue Tetrazolium (NBT) que formam grânulos de formazan, que são precipitados de material insolúvel e apresentam coloração escuro no interior dos fagócitos (KLEIN, 1990). Uma alíquota de 0,1 mL de sangue heparinizado foi colocada em tubos com 0,1mL de NBT (Sigma, St. Louis, MO, USA). Solução a 0,2% foi homogeneizada e incubada por 30 min em 25°C no escuro. Após esse período, 50 µL da suspensão formada foi colocada em tubos de ensaio com 1 mL de n,n-dimetil-formamida (DMF, Sigma, St. Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5

min. O DMF produz a lise da parede celular dos grânulos de formazan e assim libera na solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectro em comprimento de onda de 540 nm (SAHOO et al., 2005).

## **5.9 Avaliação histológica**

Os fragmentos de tecido esplênico coletados foram devidamente fixados em formol a 10% tamponado. Estas amostras foram processadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV- UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, onde foram reduzidas de tamanho, com cortes transversais, longitudinais dependendo de cada órgão, para uma espessura em média de 5 milímetros. Estes fragmentos foram acondicionados em cassetes numerados e processados pelo EFTP - Processador vertical da marca Easy Path® (Figura 8), sendo as amostras desidratadas com a finalidade de substituir a água contida nos tecidos por outros fluídos químicos (Álcool etílico) miscível com o agente diafanizador, tornando o tecido translúcido, após segue-se a diafanização com xilol, com a finalidade de substituir o agente desidratante por um fluido miscível com o agente de inclusão (parafina).

Após estas etapas de processamento, as amostras foram inclusas em blocos de parafina e foram realizados cortes histológicos de quatro micrômetros para confecção das lâminas histológicas, que posteriormente foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) usando o aparelho Bellatrix da marca Easy Path®.



**Figura 8. Aparelhos de processamento histológico. (A): Aparelho EFTP - Processador vertical da marca Easy Path<sup>®</sup> que desidrata, diafaniza e inclui as amostras. (B): Bellatrix - Corador automático de lâminas da marca Easy Path<sup>®</sup> usado para corar as lâminas com Hematoxilina-Eosina (HE).**

As lâminas histológicas foram avaliadas com microscopia óptica, para observar possíveis alterações nos tecidos, e estudo da formação de centros de melanomacrófagos (CMM), com a quantificação do número total e o percentual de área ocupada por estes por milímetro quadrado de tecido foram realizados em analisador de imagem (Motic Image Plus), seguindo metodologia descrita por Montero et al. (1999).

### **5.10 Análise estatística**

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância através de delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com parcela subdividida no tempo “Split Plot Design” (3 tratamentos X 3 tempos), utilizando-se o pacote estatístico SAS, pelo procedimento PROC GLM, versão 8.2 (SAS, 2001). As comparações múltiplas foram aferidas pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança de acordo com Snedecor e Cochran (1974).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Exsudato

O estudo do acúmulo celular no foco inflamado demonstrou significativa diminuição nos valores médios de contagem em animais tratados com prometazina IM e IC, seis e 12 HPI quando comparados ao grupo controle. Assim como em mamíferos, a histamina exerce papel fundamental no processo de permeabilidade vascular na fase mais aguda da reação inflamatória (Tabela 1). O uso da prometazina que bloqueia seletivamente os receptores da histamina pode ter influenciado a migração celular para o foco inflamado, resultando em diminuição destas células no exsudato, sugerindo a participação deste autacóide na fase inicial da reação inflamatória em tilápias.

A diferenciação celular no exsudato mostrou diminuição significativa no acúmulo de granulócitos na fase mais aguda da inflamação (6 e 12 HPI) de peixes tratados com prometazina (Tabela 1). Os granulócitos, constituídos principalmente de neutrófilos, migram em grande quantidade na fase inicial da reação inflamatória, participando efetivamente da defesa do organismo. Outros estudos verificaram a participação deste grupo celular na fase aguda de processos inflamatórios de peixes teleósteos (REQUE et al., 2010; CLAUDIANO et al., 2013; CASTRO et al., 2014). Diminuição significativa no número de linfócitos presentes no exsudato foi observado em peixes tratados com prometazina 12 e 24 HPI. Assim como em mamíferos, os linfócitos exercem importantes papéis na quimiotaxia.

Tabela 1 - Valores médios (n=7) e análise de variância<sup>1</sup> dos resultados absolutos e relativos observados no estudo celular do exsudato de tilápias submetidas aos diferentes tratamentos com prometazina durante aerocistite aguda por *Aeromonas hydrophila*.

| Tempo <sup>2</sup>            | Tratamento <sup>3</sup> | Total<br>( $\mu$ L)     | Granulócitos         |                         | Linfócitos           |                         | Macrófagos          |                       |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
|                               |                         |                         | Relativo (%)         | Absoluto ( $\mu$ L)     | Relativo (%)         | Absoluto ( $\mu$ L)     | Relativo (%)        | Absoluto ( $\mu$ L)   |
| 6                             | Controle                | 85357.14 <sup>Ab</sup>  | 57.16 <sup>Aa</sup>  | 51781.25 <sup>Aa</sup>  | 42.83 <sup>Ab</sup>  | 37802.08 <sup>Ab</sup>  | 0.00 <sup>Ba</sup>  | 0.00 <sup>Ba</sup>    |
| 6                             | IM                      | 65250.02 <sup>Ab</sup>  | 51.67 <sup>Aab</sup> | 35772.64 <sup>Ab</sup>  | 47.12 <sup>Aab</sup> | 28731.40 <sup>Aa</sup>  | 1.21 <sup>ABa</sup> | 745.94 <sup>ABa</sup> |
| 6                             | IC                      | 66071.42 <sup>Ab</sup>  | 54.83 <sup>Aa</sup>  | 34246.14 <sup>Ab</sup>  | 41.87 <sup>Aa</sup>  | 29315.70 <sup>Aa</sup>  | 2.73 <sup>Aa</sup>  | 2251.19 <sup>Aa</sup> |
| 12                            | Controle                | 104541.66 <sup>Ab</sup> | 29.41 <sup>Aab</sup> | 30333.29 <sup>Aa</sup>  | 70.58 <sup>Aab</sup> | 74208.37 <sup>Ab</sup>  | 0.00 <sup>Aa</sup>  | 0.00 <sup>Aa</sup>    |
| 12                            | IM                      | 62928.57 <sup>Ab</sup>  | 43.62 <sup>Ab</sup>  | 29715.62 <sup>Ab</sup>  | 56.06 <sup>Aa</sup>  | 32974.85 <sup>Aa</sup>  | 0.31 <sup>Aa</sup>  | 238.09 <sup>Aa</sup>  |
| 12                            | IC                      | 60541.66 <sup>Ab</sup>  | 50.30 <sup>Aa</sup>  | 31941.83 <sup>Ab</sup>  | 49.69 <sup>Aa</sup>  | 28599.83 <sup>Aa</sup>  | 0.00 <sup>Ab</sup>  | 0.00 <sup>Ab</sup>    |
| 24                            | Controle                | 465528.57 <sup>Aa</sup> | 16.59 <sup>Bb</sup>  | 63887.29 <sup>Ba</sup>  | 83.40 <sup>Aa</sup>  | 467229.37 <sup>Aa</sup> | 0.00 <sup>Aa</sup>  | 0.00 <sup>Aa</sup>    |
| 24                            | IM                      | 391041.66 <sup>Aa</sup> | 76.70 <sup>Aa</sup>  | 318358.52 <sup>Aa</sup> | 22.21 <sup>Ba</sup>  | 69700.22 <sup>Ba</sup>  | 0.165 <sup>Aa</sup> | 412.12 <sup>Aa</sup>  |
| 24                            | IC                      | 409833.33 <sup>Aa</sup> | 68.27 <sup>Aa</sup>  | 351374.82 <sup>Aa</sup> | 31.73 <sup>Ba</sup>  | 128925.17 <sup>Ba</sup> | 0.00 <sup>Ab</sup>  | 0.00 <sup>Ab</sup>    |
| Tempo <sup>4</sup>            |                         | 10.71 <sup>**</sup>     | 1.25 <sup>NS</sup>   | 12.01 <sup>**</sup>     | 1.432 <sup>NS</sup>  | 3.71 <sup>*</sup>       | 3.71 <sup>*</sup>   | 2.22 <sup>NS</sup>    |
| Tratamento <sup>4</sup>       |                         | 0.17 <sup>NS</sup>      | 3.80 <sup>*</sup>    | 2.07 <sup>NS</sup>      | 4.13 <sup>*</sup>    | 2.02 <sup>NS</sup>      | 1.50 <sup>NS</sup>  | 1.15 <sup>NS</sup>    |
| Tratamento*Tempo <sup>4</sup> |                         | 0.02 <sup>NS</sup>      | 2.28 <sup>NS</sup>   | 2.43 <sup>NS</sup>      | 2.20 <sup>NS</sup>   | 1.41 <sup>NS</sup>      | 1.59 <sup>NS</sup>  | 1.59 <sup>NS</sup>    |
| Coeficiente de variação       |                         | 142.06                  | 58.95                | 148.48                  | 58.59                | 246.49                  | 295.47              | 336.41                |

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

<sup>2</sup> Períodos amostrados 6,12 e 24 horas após a inoculação com *A. hydrophila*;

<sup>3</sup> Peixes inoculados: Controle (não tratado), IM (tratamento intramuscular) e IC (tratamento intracelomático).

<sup>4</sup> Significância estatística: NS- não significativo para P<0,05; \* - Significativo para P<0,05;\*\* - Significativo para P<0,01

## 6.2 Leucograma

Os resultados observados no leucograma apresentaram forte correlação aos achados celulares no exsudato, sugerindo a participação da histamina no processo de permeabilidade vascular das tilápias, influenciando o mecanismo de diapedese e acúmulo celular no foco inflamado (Tabela 2). Pois os animais tratados com o anti-histamínico prometazina apresentaram baixas contagens celulares no exsudato e aumento significativo nas contagens circulantes de leucócitos 6 e 12 HPI demonstrando que houve resposta ao estímulo exercido pelo inóculo bacteriano na bexiga natatória, mas as células não conseguiram migrar do compartimento sanguíneo para o foco inflamado. Claudiano et al. (2013) verificaram efeito semelhante em *P. mesopotamicus* com elevado níveis de glicocorticóide circulantes.

Assim como observado no exsudato (Tabela 1), o número de neutrófilos foi altamente influenciado na fase inicial do processo inflamatório 6 e 12 HPI confirmando a hipótese de que o bloqueio inicial exercido pelos anti-histamínicos tenha participado na exsudação deste grupo celular que migra com grande intensidade na fase inicial da inflamação.



Tabela 2 - Valores médios (n=7) e análise de variância<sup>1</sup> dos resultados absolutos e relativos observados no estudo leucocitário de tilápias submetidas aos diferentes tratamentos com prometazina durante aerocistite aguda por *Aeromonas hydrophila*.

| Tempo <sup>2</sup>            | Tratamento <sup>3</sup> | Leucócito<br>(célis/μL) | Neutrófilos         |                        | Linfócitos           |                         | Monócitos           |                        |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
|                               |                         |                         | Relativo (%)        | Absoluto (μL)          | Relativo (%)         | Absoluto (μL)           | Relativo (%)        | Absoluto (μL)          |
| 6                             | Controle                | 54749.28 <sup>Bab</sup> | 2.57 <sup>Ba</sup>  | 1455.65 <sup>Ba</sup>  | 91.85 <sup>Aa</sup>  | 50154.35 <sup>Aa</sup>  | 5.57 <sup>Ab</sup>  | 3139.28 <sup>Ba</sup>  |
| 6                             | IM                      | 62410.00 <sup>ABa</sup> | 21.28 <sup>Aa</sup> | 13860.60 <sup>Aa</sup> | 71.28 <sup>Ba</sup>  | 44184.61 <sup>Aab</sup> | 7.42 <sup>Ab</sup>  | 4364.78 <sup>ABa</sup> |
| 6                             | IC                      | 74746.42 <sup>Aa</sup>  | 23.57 <sup>Aa</sup> | 16938.75 <sup>Aa</sup> | 68.00 <sup>Bb</sup>  | 51409.95 <sup>Aa</sup>  | 8.42 <sup>Ab</sup>  | 6397.72 <sup>Aab</sup> |
| 12                            | Controle                | 60995.00 <sup>Aa</sup>  | 5.85 <sup>Ba</sup>  | 3629.95 <sup>Ba</sup>  | 87.42 <sup>Aa</sup>  | 53095.07 <sup>Aa</sup>  | 6.71 <sup>Ab</sup>  | 4269.96 <sup>Aa</sup>  |
| 12                            | IM                      | 65832.14 <sup>Aa</sup>  | 15.71 <sup>Ab</sup> | 10750.47 <sup>Ab</sup> | 75.71 <sup>Ba</sup>  | 49004.05 <sup>Aa</sup>  | 8.57 <sup>Ab</sup>  | 6067.61 <sup>Aa</sup>  |
| 12                            | IC                      | 59977.14 <sup>Aa</sup>  | 14.05 <sup>Ab</sup> | 7991.85 <sup>Ab</sup>  | 79.28 <sup>Ba</sup>  | 47843.47 <sup>Aa</sup>  | 6.71 <sup>Ab</sup>  | 4141.81 <sup>Ab</sup>  |
| 24                            | Controle                | 37947.14 <sup>Bb</sup>  | 2.42 <sup>Ba</sup>  | 912.94 <sup>Ba</sup>   | 86.14 <sup>Aa</sup>  | 32101.74 <sup>Ab</sup>  | 11.42 <sup>Aa</sup> | 4482.45 <sup>Ba</sup>  |
| 24                            | IM                      | 42329.28 <sup>ABb</sup> | 8.57 <sup>Ac</sup>  | 3692.87 <sup>ABb</sup> | 77.00 <sup>Ba</sup>  | 32436.72 <sup>Ab</sup>  | 14.41 <sup>Aa</sup> | 6200.15 <sup>ABa</sup> |
| 24                            | IC                      | 59456.42 <sup>Aa</sup>  | 12.57 <sup>Ab</sup> | 7714.78 <sup>Ab</sup>  | 73.42 <sup>Bab</sup> | 43356.72 <sup>Aa</sup>  | 14.02 <sup>Aa</sup> | 8384.92 <sup>Aa</sup>  |
| Tempo <sup>4</sup>            |                         | 5.28 <sup>**</sup>      | 16.03 <sup>**</sup> | 13.22 <sup>**</sup>    | 2.00 <sup>NS</sup>   | 5.42 <sup>**</sup>      | 19.13 <sup>**</sup> | 1.95 <sup>NS</sup>     |
| Tratamento <sup>4</sup>       |                         | 2.65 <sup>NS</sup>      | 52.00 <sup>**</sup> | 27.20 <sup>**</sup>    | 39.02 <sup>**</sup>  | 0.73 <sup>NS</sup>      | 2.21 <sup>NS</sup>  | 3.15 <sup>*</sup>      |
| Tratamento*Tempo <sup>4</sup> |                         | 0.98 <sup>NS</sup>      | 5.53 <sup>**</sup>  | 4.72 <sup>**</sup>     | 3.70 <sup>**</sup>   | 0.60 <sup>NS</sup>      | 0.43 <sup>NS</sup>  | 1.25 <sup>NS</sup>     |
| Coeficiente de variação       |                         | 33.51                   | 38.43               | 56.29                  | 7.72                 | 33.88                   | 39.54               | 58.59                  |

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

<sup>2</sup> Períodos amostrados 6, 12 e 24 horas após a inoculação com *A. hydrophila*;

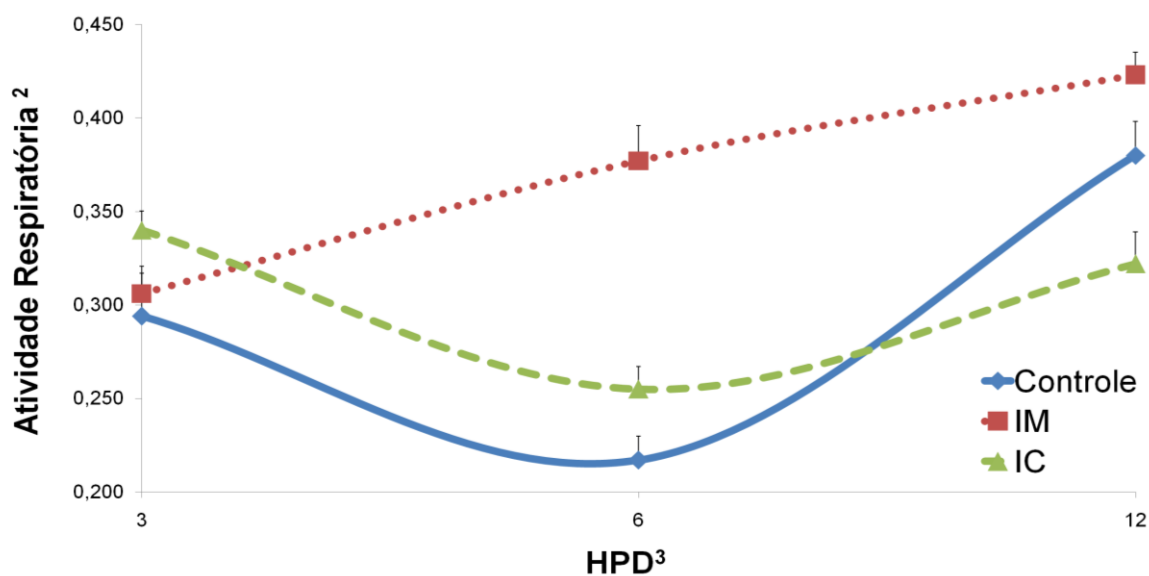
<sup>3</sup> Peixes inoculados: Controle (não tratado), IM (tratamento intramuscular) e IC (tratamento intracelomático).

<sup>4</sup> Significância estatística: NS- não significativo para P<0,05; \* - Significativo para P<0,05; \*\* - Significativo para P<0,01

### 6.3 Burst respiratório

Para três tratamentos (T1, T2 e T3) foram calculadas as médias dos valores de Burst dos 7 peixes (de cada grupo) após 3, 6 e 12 horas. A média em T1 foi 0.294, 0.217 e 0.380 respectivamente. Em T2, as medições após 3, 6 e 12 horas revelaram médias 0.306, 0.377 e 0.423. Finalmente para T3, obteve-se 0.340, 0.255 e 0.322 após 3, 6 e 12 horas (Figura 9). Os resultados mostraram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em peixes tratados com prometazina na cavidade celomática. Tais resultados sugerem podem refletir a atividade de neutrófilos e monócitos presentes na circulação e que não conseguem chegar ao foco inflamado, pois a atividade anti-histamínica da prometazina pode ter diminuído a permeabilidade vascular. De acordo com Reque et al. (2010), a diminuição da permeabilidade diminui a diapedese e o acúmulo celular no exsudato. Após 6 e 12 horas, houve um aumento do efeito da prometazina IM, resultando em aumento expressivo da produção de ROS, sendo efeito tardio resultado da lentidão

do processo de absorção por esta via, enquanto a administração intra-celomática que é absorvida rapidamente os efeitos caíram 6 e 12 horas após a inoculação com *A. hydrophila*.



**Figura 9. Valores médios<sup>1</sup> observados na atividade respiratória de leucócitos (Burst oxidativo respiratório) de tilápias do Nilo (*Oerochromis niloticus*) desafiadas com inóculos de *Aeromonas hydrophila*, submetidas ou não ao tratamento parenteral com o anti-histamínico de receptores H1 (prometazina).**

**1 Médias e desvios-padrões (n=7); 2 Absorbância 540nm; 3 Períodos amostrados: 3, 6 e 12 horas pós desafio (HPI).**

#### 6.4 Histopatologia

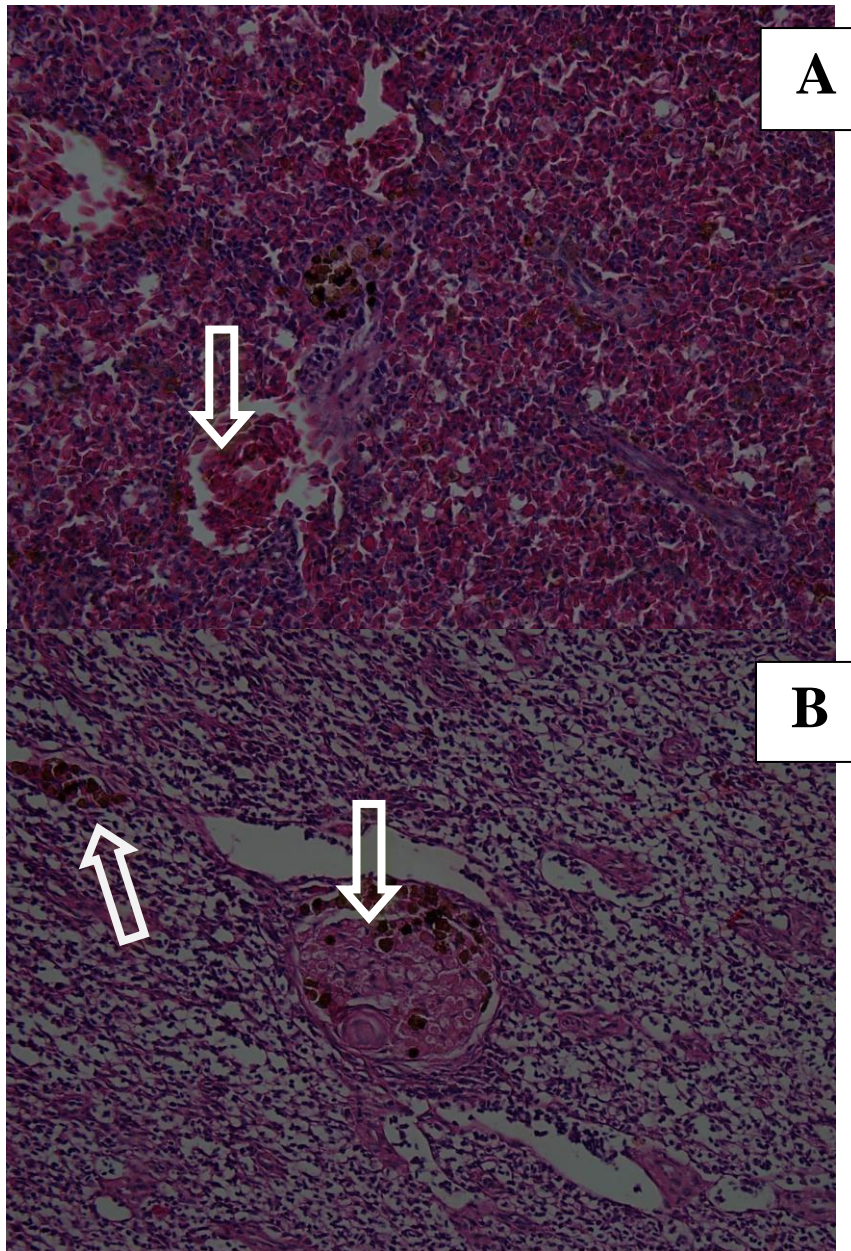
O estudo histopatológico do baço das tilápias revelou alteração na formação centros de melanomacrófagos (Tabela 3, Figura 10), pois peixes tratados com prometazina apresentaram aumento precoce na formação de centros de melanomacrófagos quando comparados com peixes controles 12 HPI, sendo estatisticamente significativo para peixes tratados com prometazina via intramuscular.

Tabela 3. Valores médios (n=7) e análise de variância estatística<sup>1</sup> da área (mm<sup>2</sup>) média da formação de centros de melanomacrófagos no baço das tilápias tratadas com prometazina.

| Período Experimental | Prometazina |            |             |
|----------------------|-------------|------------|-------------|
|                      | Controle    | IM         | IC          |
| 6 horas              | 665.33 Aa   | 522.72 Aa  | 506.87 Aa   |
| 12 horas             | 287.32 Ab   | 1285.12 Aa | 1144.15 Aab |
| 24 horas             | 1165.32 Aa  | 953.35 Aa  | 660.48 Aa   |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam a evolução de cada tratamento na coluna e letras minúsculas comparam nas linhas os diferentes tratamentos em cada dia analisado.

<sup>2</sup> Coeficiente de variação: 15,72%; Valor de F: 0.74; Pr>F 0.6590.

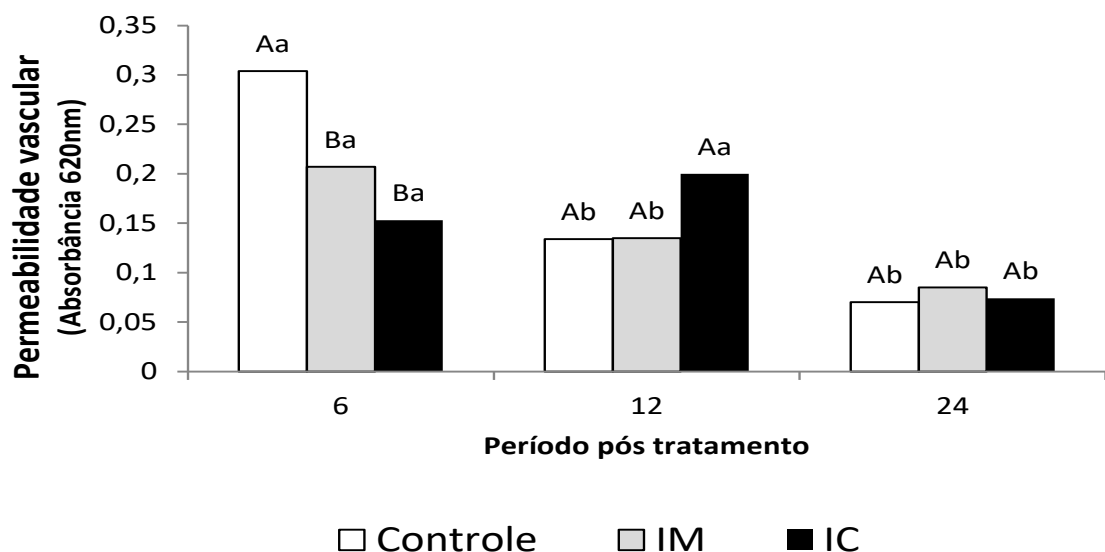


**Figura 10. Fotomicrografia do tecido esplênico (A e B) das tilápias com aerocistite infecciosa por *Aeromonas hydrophila* e tratadas com prometazina, as setas destacam a formação de centros de melanomacrófagos (HE, X400).**

### **6.5 Permeabilidade vascular**

O estudo da permeabilidade vascular (Figura 11) demonstrou o efeito do tratamento com prometazina sobre a exsudação inflamatória das tilápias. Peixes tratados com o anti-histamínico via IM e IC apresentaram diminuição significativa

( $P < 0,05$ ) nos valores de absorvância determinados no conteúdo das exsudações inflamatórias quando comparados às tilápias controles 6 HPI. Tais resultados corroboram os achados observados nos estudos da exsudação celular no foco inflamado e no leucograma, demonstrando o efeito da histamina na fase mais aguda da reação inflamatória de tilápias, assim como, ocorre em mamíferos em que este autacóide apresenta importante papel no processo de permeabilidade vascular.



**Figura 11.** Valores médios ( $n=7$ ) e análise de significância estatística observados na permeabilidade vascular em tilápias tratadas com prometazina durante aerocistite infecciosa por *Aeromonas hydrophila*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo. Peixes inoculados: Controle (não tratado), IM (tratamento intramuscular) e IC (tratamento intra-celomático).

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados observados na avaliação celular do exsudato apresentam forte correlação aos resultados do leucograma 6 e 12 HPI, com diminuição de granulócitos no exsudato, aumento significativo de neutrófilos no sangue e da produção ROS,

associado ao aumento na formação centros de melanomacrófagos no baço 12 HPI quando comparados aos animais controles. O estudo de permeabilidade vascular demonstrou diminuição de exsudação 6 HPI em animais tratados com prometazina. Tais achados em seu conjunto sugerem a participação da histamina no processo de permeabilidade vascular das tilápias, influenciando o mecanismo de diapedese e acúmulo celular no foco inflamado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELARDO, N. V.; ELLIS, A. E. Ultrastructural Study Of The Response Of Eosinophil Granule Cells To *Aeromonas Salmonicida* Extracellular Products And Histamine Liberators In *Rainbow Trout Salmo Gairdneri Richardson*. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 13, pp. 133-148, 1989.

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*; vol. 49, pp. 643-646, 1989.

AGIUS, C. The melano-macrophage centers in fish: a review. In: MANNING, M.J.; TATNER, M.F. (Eds.). *Fish Immunology*. London: Academic Press, 1985, p.85-105.

ALEXANDRINO, A. C.; OKUMURO, M. P. M.; BALDASSI, L; ARAUJO, A. P.; KURODO, C. K.; ARAUJOC. K.; WALKASA, Y. S. Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intenso - Relato de caso. *Bol. Inst. Pesca*, Vol. 26, n.1, pp.111-117, 2000.

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

ARMSTRONG, W. A.; KVEDAR, C. J. – Principles of Pharmacology - 3rd edition, Chapter 42, 2011.

ASHMAWI, H. A.; BRAUN, L. M.; SOUSA, A. M.; POSSO, I. P. Efeito analgésico de antagonistas do receptor da histamina H1 em modelo de dor provocada por formalina em Ratos. Revista Brasileira Anestesiologia. Vol. 59, n4, pp. 461- 470, 2009.

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

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

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES F. R.; SOARES V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, D J. E. R. Effect of Dietary Supplementation with Vitamin E and Stocking Density on Macrophage Recruitment and Giant Cell Formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus*. J. Comp. Path. Vol. 133, pp.146–154, 2005.

BILLER, J. D. Respostas fisiopatológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila*, em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano. Dissertação (Mestre em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. pp106, 2008.

BOZZO, F. R. et al. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). J World Aquac Soc, v. 38, n. 2, pp.302-308, 2007.

BOZZO, F. R. Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato em *Piaractus mesopotamicus* suplementados com vitamina c, e ou sua associação. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CAMPUS DE JABOTICABAL. Jaboticabal - São Paulo - Brasil (Tese de Doutorado), 2007.

BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *J Food Safety*, Vol.7, pp. 15-29, 1985.

BALAMURUGAN, S.; DEIV ASIGAMANI, B.; KUMARAN, SAKTHIVEL, M.; RAJSEKAR, T.; PRIYADHARSINI, Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen bioindicator of environmental change. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, p. S635-S638, 2012.

CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO, RIM E BAÇO DE *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* E *Pseudoplatystoma fasciatum* PARASITADOS POR MYXOSPORÍDIOS, CAPTURADOS NO RIO AQUIDAUANA, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17, 4, 200-205 (2008) (*Brazil. J. Vet. Parasitol.*)

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. *Aquaculture Research*, v.32, pp. 297-304, 2001.

CASTRO, M. P. et al. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fish Shellfish Immunology*. Vol.31, pp.284-290, 2014.

CIPRIANO, R. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. In: *Fish diseases of Leaflet*. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research, Washington, pp.68, 2001.

CLAUDIANO, G. S.; CASTRO, M. P.; PETRILLO, T. R.; MELLO, H.; MANRIQUE, W. G.; BELO, M. A. A.; MORAES, J. E. R.; MORAES, F. R. Inibição da fosfolipase A2 sobre a resposta de exsudação inflamatória na aerocistite em pacus, *Piaractus mesopotamicus*. In: 38º CONBRAVET - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Florianópolis/SC. 38º CONBRAVET - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2011.

CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; MANRIQUE, W. G.; CASTRO, M. P.; LOUREIRO, B. A.; MARCUSO, P. F.; BELO, M. A. A.; MORAES, J. R. E.;



MORAES, F. R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. *Fish & Shellfish Immunology* Vol. 34, pp. 1057-1062, 2013.

DOOLEY, J. S. H.; TRUST, T. J. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-Layer protein. *J. Bacteriology*. Vol.170, pp.499-506, 1988.

ELLIS, A.E. Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Disease*. v. 3, n. 5, p. 413-426, 1980.

ELLIS, A. E. Eosinophilic granular cells (egc) and histamine responses to *Aeromonas salmonicida* toxins in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 9, pp. 251-260, 1985.

ELLIS A. E. The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. *International Journal Tissue React* 8(4): 263-70, 1986.

ELLIS, A. E. The leucocytes of fish. A review. *Journal of Fish Biology* Vol.11, pp. 453-491, 1977.

ENDO, M. et al. A new method for collection neutrophils using swim bladder. *Fishery Science*, Vol. 63, n. 4, pp. 644-645, 1997.

FERGUSON, H.W. The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centers in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Comparative Pathology*, v. 86, n. 3, p. 377-380, 1976.

FERRARA, A. C. P. Efeitos da L-Histidina e de antagonistas histaminérgicos sobre a recuperação funcional após hemilabirintectomia em *Carassius Auratus*. Universidade Federal de São Carlos Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. São Carlos, 2006.

FLORES, R.; FILHO, M. Como multiplicar os peixes? Perspectivas da aquicultura brasileira. 2003. Disponível em: [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252013000200002&script=sci\\_arttext](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252013000200002&script=sci_arttext). Acesso em: Setembro de 2013.

FULOP, G.M.I.; McMILLAN, D. Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. *Journal of Morphology*, v. 179, n. 2, p. 175-195, 1984.

GARCIA et al. Histamine regulates the inflammatory responses of the túnica *Styela plicata*. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 46, pp. 382-391, 2014.

HARA, C.; MORAES, F. R.; KLEIN JUNIOR, M.; PAULILLO, A. C. Cinética das alterações vasculares e celulares na peritonite induzida pela carragenina em *Gallus gallus*. Efeito de drogas anti-inflamatórias esteroidais e não esteroidais. *Brazilian J. Vet Res Anim. Sci.*, 31(3/4): 173-180, 1994.

HERRAEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. Structure and function of the melano-macrophage centers of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 12, n. 1-4, p. 117-126, 1986.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas* an expanding panorama of species diseases presentations and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 27, pp. 332-344, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 3. ed. Guanabara Koogan. p. 540-555, 1999.

KIROV, M. et al. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* Species. *Journal Bacteriology*. Vol.184, pp. 547-555, 2002.

KLEIN, J. *Immunology*. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. pp. 311-334, 1990.

MARTINS, M. L. et al. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthues: Characidae) cultured in Brazil. *Boletim Instituto da Pesca*, Vol.32, pp.31 - 39, 2006.

MATUSHIMA, E. R.; Mariano, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). Braz J Vet Ani Sci, 33(1):5-10. 1996.

MERINO, S. et al. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. International Journal Food Microbiology. Vol. 28. pp.157-168,1995.

MESSEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. Cell Tissue Research, v. 277, n. 1, p. 1-10, 1994.

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

MONTERO, D. et al. Dietary and culture influences on macrophage aggregate parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Aquaculture, Vol. 179, pp. 523-534, 1999.

MORAES, A. C.; BELO, M. A. A.; PRADO, E. J. R.; MARINELLI, L. A.; GAGLIARDI, P. C.; CARDOSO, F. Glucocorticoid activity of dexamethasone on cellular response in inflammatory exudate of tilapia, vaccinated and challenged with *Aeromonas hydrophila*. In: 38 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária - CONBRAVET, 2011, Florianópolis - SC. 38 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária - CONBRAVET, 2011.

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

MULERO, I.; SEPULCRO, M. P.; MESEGUER, J.; AYALA A. G.; MULERO, V. Histamine is storage in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. – PNAS - 19434-19439, Vol. 104, n. 49, 2007.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. Poultry Sci. Vol. 31, pp. 735-738, 1952.

NETO, J. N.; Hematologia e histologia de tilápia do Nilo alimentada com própolis na dieta.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura. Florianópolis, 2013.

NOGA, E. J. The importance of *Learanea crucita* (leSeuer) in the initiation of skin lesions in largemouth bass *Micropterus salmonides* (Lacepede) in the Chowan River, North Carolina, J. Fish Dis. Vol.9, pp.295-302, 1986.

PAPOOLA. M. O.; OLUFAYO, O. M. Histological changes in the gills of *Oreochromis niloticus* exposed to promethazine hydrochloride. J. Fisheries Aquat Sci. 2 (5): 366-370, 2007.

PLUMB, J. A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames, Iowa: Iowa State University Press, v.328, p.1-64, 1999.

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. P.545–548, 1984.

REITE, O. B. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. Fish & Shellfish Immunology . Vol.8, pp. 489–513 Article No. fi980162. 1998.

REQUE, V. R. et al. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. Aquaculture, Vol. 300, pp. 37-42, 2010.

ROBERTS, R.J. Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. In: RIBELIN, W. E.; MIGAKI, G. (Ed.) The Pathology of Fishes. Madison: University of Wisconsin Press, 1975. p. 339-428.

ROBERTS, R.J. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. In: ROBERTS, R.J. (Ed.) Fish pathology. 2nd ed. London: Baillière Tindall, 1989. p. 56-134.

SAHOO, P.K. et al. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. J Appl Ichthyol, 21( 2 ):151-155. 2005.

SAMPAIO, M. C. Estudo do componente leucocitário e de mediadores quimiotáticos da reação inflamatória induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni* participação de mastócitos e da histamina no recrutamento leucocitário. - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2009.

SAS Institute Inc. (2001) SAS/STAT software changes and enhancements through computer program. Release 8.2. Cary: SAS Institute.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. Statistical Methods. Iowa State University Press. Ames. 1974.

SPINOSA, S. H.; GÓRNIK, L. S.; BERNARDI. M. M. Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1996.

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

TAVARES-DIAS, M; MORAES, F.R. Hematologia de peixes a teleósteos. 1 ed. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, p. 09-56, 2004.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fisher. Res. Board Can. v.22, n.5, 1970.

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