

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeito da hipercortisolemia induzida pelo
desafio com *Aeromonas hydrophila* na
resposta imune inata do pacu**

M.V. Victor Alexander Cueva Quiroz

Jaboticabal, SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeito da hipercortisolemia induzida pelo
desafio com *Aeromonas hydrophila* na
resposta imune inata do pacu**

M.V. Victor Alexander Cueva Quiroz

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Co-orientador: Dr. Jefferson Yunis Aguinaga

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Aquicultura do Centro de
Aquicultura da UNESP - CAUNESP,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, SP
2018

C965e Cueva Quiroz, Victor Alexander
Efeito da hipercortisolemia induzida pelo desafio com *Aeromonas hydrophila* na resposta imune inata do pacu / Victor Alexander Cueva Quiroz – Jaboticabal, 2018
vi, 65 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp), 2018

Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Co-orientador: Jefferson Yunis Aguinaga

Banca examinadora: Fabiana Pilarski, Rogério Salvador

Bibliografia

1. Cortisol. 2. Inflamação. 3. Sepse. 4. Metirapona. 5. Pacu. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp).

CDU 639.3

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito da hipercortisolemia induzida pelo desafio com *Aeromonas hydrophila* na resposta imune inata do pacu

AUTOR: VICTOR ALEXANDER CUEVA QUIROZ

ORIENTADORA: JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

COORDINADOR: JEFFERSON YUNIS AGUINAGA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Pós-Doutorando JEFFERSON YUNIS AGUINAGA
Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP / FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP


Profa. Dra. FABIANA PILARSKI
./ Centro de Aquicultura - CAUNESP


Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR
Laboratório de Imunopatologia de Peixes / UENP - Bandeirantes/PR

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2018.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	1
AGRADECIMENTOS	2
APOIO FINANCIEIRO	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUÇÃO	11
II. MARCO TEÓRICO	13
II.1. Imunidade em peixes	13
II.2. Inflamação	14
II.3. Regulação da resposta imune-inflamatória	18
II.4. Cortisol na resposta imune	18
II.5. Metirapona	20
II.6. Pacu	21
21	
II.7. <i>Aeromonas hydrophila</i>	22
III. OBJETIVO GERAL	24
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
V. MATERIAL E MÉTODOS	24
V.1. Local de estudo	24
V.2. Material biológico e condições experimentais	24
24	
V.3. Fármacos e aplicação	25
V.4. Ensaio prévio: Padronização do protocolo de inibição da síntese de cortisol com MET	25
V.4.1. Protocolos testados	25
V.4.2. Indução da anestesia e colheita de sangue	26

V.4.3. Determinação da glicemia e cortisolemia	26
V.5. Experimento principal	27
V.5.1. Delineamento experimental	27
V.6. Determinação da concentração letal 50%-96h	28
V.6.1. Obtenção da bactéria	28
V.6.2. Cálculo da dose letal	28
V.7. Indução da inflamação por <i>A. hydrophila</i>	29
V.8. Avaliações hematológicas	29
V.9. Avaliação das variáveis de imunidade inata:	30
V.9.1. Atividade respiratória de leucócitos do sangue	30
V.9.2. Atividade da lisozima plasmática	30
V.9.3. Atividade lítica do plasma	31
V.10. Análise estatística	31
VI. RESULTADOS	32
VI.1. Ensaio prévio: Padronização do protocolo de inibição da síntese de cortisol com MET	32
VI.1.1. Cortisolemia plasmática	32
VI.1.2. Glicemia plasmática	33
VI.2. Experimento principal	34
VI.2.1. Cortisolemia plasmática	34
VI.2.2. Glicemia plasmática	36
VI.2.3. Hemograma	36
VI.2.4. Atividade respiratória dos fagócitos sanguíneos	40
VI.2.5. Lisozima sérica	40
VI.2.6. Atividade bactericida do plasma	40
VII. DISCUSSÃO	42
VIII. CONCLUSÃO	47
IX. REFERÊNCIAS	48

DEDICATÓRIA

Um faro no horizonte,
incandescente, mas inalcançável,
me guiando através da senda das dúvidas,
sinalizando não o lugar onde deveria ir
senão aonde quero ir.

Um exemplo de vida,
esculpido em pedra maciça,
me lembrando o importante de viver com paixão.
embora longe da terra,
sempre do meu lado.

Isto é dedicado para ti querido pai,
obrigado por ser esse faro,
obrigado por ser esse exemplo,
obrigado porque sem você eu não seria eu.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, sem ela nunca teria ido tão firmemente atrás dos meus sonhos, sempre apoiando meus loucos projetos, ainda quando nem eu mesmo tinha confiança absoluta neles. Ao meu pai por incentivar em mim a capacidade de sonhar, de fazer tudo na vida com paixão. Aos meus irmãos Tania, Carlos e Marco pelo apoio e os bons momentos nesse perpétuo processo de sonhar.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Julieta R. E. de Moraes pela grande oportunidade, confiança extrema, conselhos certos e amizade no transcurso do Mestrado.

Ao meu Co-orientador Dr. Jefferson Yunis Aguinaga pelas ideias para este e outros projetos, por compartilhar a sua experiência na ciência e especialmente pela inestimável amizade.

Ao Prof. Dr. Flávio R. de Moraes pelos conselhos e apoio nesta luta acadêmica.

À Dr^a. Fabiana Pilarski e à Dr^a Marita Cardozo pelas sugestões feitas na qualificação deste trabalho.

Ao Fernando, Gustavo, Fausto, Bruno, Karina, Lívia, Amanda, Sheyla, Sirlei pelo apoio nas coletas, análises laboratoriais, processamento de dados e grandes momentos no laboratório.

Ao técnico José Roberto Silva, à Dr^a. Paula Condé Lamparelli Elias e à Prof^a. Dr^a. Margaret de Castro da FMRP, USP-Ribeirão Preto, pelo apoio na realização das análises.

Ao pessoal administrativo que facilitou minha adaptação num novo ambiente com novas regras. Obrigado David, Valdecir, Mabel e Veralice.

CAUNESP

Aos meus amigos, do Peru, do Brasil, da vida, obrigado por estarem comigo até mesmo sem ser fisicamente, sempre os senti por perto. Obrigado Cristina García, Karla Campos, Kymberli Arana, Eluzai Dinai, Valeria Guerra, Mar Roldán, Diana Benito, Víctor Gómez, Álvaro Ojeda, David Galindo, Diego Torres, José Brenis, Wallynson Almeida, Tadeu Acuna e Caio Elias, levo vocês no meu coração.

A todo o pessoal que conheci neste lindo país, brasileiros e estrangeiros, vocês abriram a minha mente tanto na ciência, quanto fora dela.

A todos aqueles que contribuíram diretamente ou não com esta pesquisa.

¡Gracias totales!

APOIO FINANCIERO

Ao CAPES, pela bolsa de Mestrado.

À Fapesp, pela verba concedida no auxílio regular processo 2015/14289-8 e ao CNPq, Edital Universal processo 446917/2014-5, pelo apoio financeiro que permitiram este e outros estudos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	-	Hormônio adrenocorticotrófico
CRH	-	Hormônio liberador de corticotrofina
CSF-1	-	Fator estimular de colônias de macrófagos tipo 1
CXCL-8	-	Interleucina 8
EB	-	Energia bruta
DMF	-	N,N-dimetilformamida
DO	-	Densidade óptica
g	-	Grama
GC	-	Glicocorticoides
GH	-	Hormônio do crescimento
GR	-	Receptores glicocorticoides
h	-	Horas
HAD	-	Horas após desafio
IFN- γ	-	Interferon gamma
IL-1 β	-	Interleucina 1 beta
IL-8	-	Interleucina 8
kg	-	Quilograma
L	-	Litro
LPS	-	Lipopolisacarídeos
mL	-	mililitro
MCH	-	Hormônio concentrador de melanina
NBT	-	Azul nitro-tetrazólio
MET	-	Metirapona
NO	-	Óxido nítrico
NOD	-	Domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização
PB	-	Proteína bruta
PEG	-	Propilenglicol
PM	-	Peso molecular
POMC	-	Proiomelanocortina
PRL	-	prolactina
PV	-	Peso vivo
CAUNESP		

RIG-1	-	Receptor tipo RIG 1
RNA	-	Ácido ribunocléico
T3	-	Triiodotironina
T4	-	Tiroxina ou tetraiodotironina
TLR	-	Receptor tipo “toll”
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	-	Ágar triptona de soja
TSB	-	Caldo triptona de soja

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de grupos experimentais.

Tabela 2. Valores médios, erro padrão e análise de variância da série vermelha do hemograma de pacus submetidos a tratamento prévio com metirapona, desafiados com *A. hydrophila* e avaliados em diferentes tempos.

Tabela 3. Valores médios, erro padrão e análise de variância da série branca do hemograma de pacus submetidos a tratamento prévio com metirapona, desafiados com *A. hydrophila* e avaliados em diferentes tempos.

28

38

39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cortisolemia (média $\pm$ erro padrão) em pacus submetidos ao estresse agudo por exposição aérea e tratados previamente com MET.

Figura 2. Glicemia (média $\pm$ erro padrão) em pacus submetidos ao estresse agudo por exposição aérea e tratados previamente com MET.

Figura 3. Cortisolemia (média $\pm$ erro padrão) plasmática em pacus submetidos ao tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos.

Figura 4. Glicemia plasmática

(média $\pm$ erro padrão) em pacus submetidos ao tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. 33

Figura 5. Atividade respiratória dos fagócitos sanguíneos (média $\pm$ erro padrão) em pacus submetidos ao tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. 34

Figura 6. Atividade da lisozima sérica (média $\pm$ erro padrão) em pacus submetidos ao tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. 35

Figura 7. Atividade bactericida do plasma (média $\pm$ erro padrão) em pacus submetidos ao tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. 36

40

41

41

RESUMO

Os corticosteroides são importantes moduladores da resposta imune em vertebrados. Entretanto, o conhecimento sobre os mecanismos desta regulação em teleósteos tropicais é limitado. Neste trabalho, foi estudada a influência da hipercortisolemia induzida na fase inicial do desafio com *Aeromonas hydrophila* na resposta imune do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, através do bloqueio farmacológico com metirapona (MET). Pacus foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais. T1: controle basal, sem manuseio prévio. T2: sem suplementação prévia com MET, desafiado na bexiga natatória com concentração letal 50%-96h (CL_{50-96h}) de *A. hydrophila*. T3: suplementado previamente com MET 30 mg.kg⁻¹ na ração por cinco dias, e CAUNESP

injetado no sexto dia com reforço intracelomático de 50 mg.kg⁻¹ de MET, e inoculado com a bactéria. T4: suplementado com a MET sob as condições já descritas, sem o desafio bacteriano. Coletas de sangue foram realizadas às 1, 3, 6 e 9 horas após desafio bacteriano, para avaliação da cortisolemia, da glicemia, dos parâmetros hematológicos e da imunidade inata. Os resultados evidenciaram que a hipercortisolemia induzida na fase inicial do desafio com *A. hydrophila* inibiu a resposta imune-inflamatória. Ao contrário do observado no grupo tratado com a MET e desafiado com a bactéria, que apresentou aumento significativo do número de leucócitos totais e linfócitos do sangue, na atividade respiratória dos fagócitos sanguíneos e na atividade lítica do plasma. Conclui-se que a inibição do cortisol favoreceu a resposta imune-inflamatória na fase inicial do desafio.

Palavras-chave: Cortisol; Inflamação; Seps; Metirapona; Pacu.

ABSTRACT

Corticosteroids are key modulators of the immune response in vertebrates. However, knowledge about the mechanisms of this regulation in tropical teleosts is scarce. The aim of this work was to determine the effects of the initial hypercortisolemia induced by challenge with *Aeromonas hydrophila*, on the immune response of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, using a pharmacological blockade with metyrapone (MET). Pacus were randomly distributed into four experimental groups. T1: basal control, without previous handling. T2: without previous supplementation with MET, challenged in the swim bladder with lethal concentration 50% -96h (LC50- 96h) of *A. hydrophila*. T3: supplemented with 30 mg.kg⁻¹ MET in the diet for five days, injected on the sixth day with 50 mg.kg⁻¹ CAUNESP

MET and challenged one hour later with the bacterium. T4: supplemented with MET, without bacterial challenge. Blood samples were taken at 1, 3, 6 and 9 hours after bacterial challenge, for evaluation of cortisolemia, glycemia, hematological and innate immunity parameters. The results showed that high levels of cortisol, induced in the initial phase of the challenge with *A. hydrophila*, inhibited the immune-inflammatory response. Fact explained by the antagonistic effect evidenced in the group treated with MET and challenged with the bacterium that showed significant increase in total blood leukocytes and lymphocytes numbers, blood phagocyte respiratory activity and plasma lithic activity. It was concluded that the inhibition of cortisol favored the immune-inflammatory response in the initial phase of the challenge.

Keywords: Cortisol; Inflammation; Sepsis; Metyrapone; Pacu.

I. INTRODUÇÃO

Nos teleósteos, como em mamíferos, a homeostase do organismo é dependente da comunicação bidirecional entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune, que monitora as interações com o ambiente (ENGELSMA et al., 2002). A comunicação começa com a estimulação do sistema simpático e liberação de adrenalina, noradrenalina e dopamina (ENGELSMA et al., 2002). Posteriormente, fatores como citocinas, cortisol, prostaglandinas, GH, PRL, peptídeos derivados da POMC, hormônios reprodutivos, T3, T4 e insulina participam da regulação da resposta imune (HARRIS; BIRD, 2000; ENGELSMA et al., 2002; TORT, 2011; GÓMEZ-ABELLÁN; SEPULCRE, 2016; YUNIS-AGUINAGA, 2017).

Os corticosteroides são hormônios esteroides com importantes funções imunomoduladoras (PRUNET et al., 2006). Nos teleósteos, o principal corticosteroide é o cortisol (MOMMSEN et al., 1999). Este hormônio, junto com outros hormônios esteroides, são sintetizados pelo tecido interrenal, análogo das glândulas adrenais em mamíferos (VAN DER BOON et al., 1991).

O cortisol apresenta efeitos profundos no sistema imune dos teleósteos, mediados por um ou mais receptores glicocorticoides presentes nas células imunes (VERBURG-VAN KEMENADE et al., 2009). O cortisol é responsável por efeitos anti-inflamatórios tais como redução do número de linfócitos circulantes, proliferação linfocitária atenuada, redução do número e da atividade de células produtoras de anticorpos, fagocitose diminuída e aumento da apoptose (HARRIS; BIRD, 2000). Porém, efeitos pró-inflamatórios também foram verificados, como redução na taxa de apoptose em neutrófilos de carpa (WEYTS et al., 1998). Nesse sentido, Montoya et al., (2017) atribuíram à hipercortisolemia aguda após desafio bacteriano efeitos pró-inflamatórios como aumento da atividade da lisozima sérica. Contudo, pouco se sabe com relação às situações e os mecanismos que induzem respostas tão antagônicas.

Para entender melhor o papel do cortisol na regulação dos eventos fisiológicos são utilizados diversos protocolos experimentais que incluem estímulo ou inibição da biossíntese do hormônio. Várias substâncias são usadas para inibir a produção do cortisol, tais como metirapona, cetoconazol e fluconazol, que atuam inibindo a esteroidogênese (SCHTEINGART, 2009).

A metirapona é um inibidor da enzima 11-β-hidroxilase, a qual impede a conversão de desoxicortisol em cortisol, liberando 11-desoxicortisol, esteroide adrenal inativo (JENKINS et al., 1958). A metirapona é utilizada em peixes, em pesquisas nas áreas de reprodução (CHABBI; GANESH, 2014), metabolismo e estresse (MILLIGAN, 2003; TRIPATHI; VERMA, 2003). Porém, na área de patologia e resposta imune os estudos são poucos.

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, é das espécies nativas cultivadas mais importantes do Brasil (SOUZA et al., 2003). As pesquisas nesta espécie estão aumentando, principalmente nas áreas de larvicultura (PORTELLA et al., 2014), reprodução (KURADOMI et al., 2016), alimentação (ABIMORAD et al., 2017), suplementação com imunoestimulantes (FARIAS et al., 2016; COSTA et al., 2017).

al., 2017; PAHOR-FILHO et al., 2017), inflamação aguda (CLAUDIANO et al., 2013; CLAUDIANO, 2015), inflamação crônica (MANRIQUE et al., 2015), cicatrização (MORAES et al., 2010; BORTOLUZZI et al., 2017) e diabetes (YUNIS-AGUINAGA, 2017). Entretanto, estudos que visaram elucidar o papel do cortisol como regulador da resposta imune no pacu e outras espécies nativas são exíguos. Montoya et al., (2017) determinaram em matrinxãs que a hipercortisolemia, induzida pela suplementação com β -glucano, aumentou significativamente o número de monócitos circulantes e a atividade da lisozima sérica. No entanto, estes efeitos só puderam ser mantidos parcialmente 24h após desafio com *A. hydrophila*.

Contudo, são ilimitadas as informações sobre os mecanismos da modulação neuroendócrina na resposta imune inata durante a sepse, em teleósteos, principalmente nas espécies tropicais. Para tanto este trabalho objetiva investigar o papel do cortisol, como regulador primário da resposta imune inata contra *A. hydrophila* no pacu. A metirapona foi utilizada para bloquear a síntese do cortisol e foram avaliados parâmetros hematológicos e da resposta imune inata (burst respiratório, atividade da lisozima sérica e atividade bactericida do soro) após desafio bacteriano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Imunidade em peixes

O sistema imunológico dos teleósteos é composto pelo sistema imune inato e adaptativo, ambos subdivididos em imunidade do tipo humoral e mediada por células (RAUTA et al., 2012). O sistema imune inato conglomera todos os elementos presentes no peixe antes da aparição dos patógenos e atua como a primeira linha de defesa do organismo (MAGNADOTTIR, 2006). Por outro lado, o sistema imune adaptativo é caracterizado por mecanismos lentos baseados no reconhecimento antigênico específico prévio, que facilita a resposta mais acentuada e rápida na segunda exposição ao mesmo patógeno (CASTRO; TAFALLA, 2015).

CAUNESP

Estes sistemas não funcionam isolados, senão interatuam dinamicamente. A resposta inata precede à resposta adaptativa e modula o tipo e grau de resposta (DIXON; STET, 2001; RAUTA et al., 2012). As descobertas da última década comprovaram que a interação entre os componentes imunes inatos e adaptativos é muito mais complexa do que pensado, e muitas das células e moléculas atribuídas à imunidade inata também têm funções na imunidade adquirida (CASTRO; TAFALLA, 2015).

A imune inata em peixes, em comparação com mamíferos, é mais importante para o organismo, e exhibe funcionalidade potencialmente aprimorada, produto da falta de desenvolvimento do sistema imune adaptativo nestas espécies (RAUTA et al., 2012).

Os componentes da imunidade inata em peixes são classificados em barreiras físicas, humorais e celulares (URIBE et al., 2011). As barreiras físicas são integradas pelas escamas, pele, brânquias e muco (URIBE et al., 2011; ESTEBAN, 2012). Dentre as defesas humorais foram identificadas lecitinas, lisozimas, inibidores de proteases e outras enzimas bacterianas, proteínas do sistema complemento, pentraxinas, aglutininas, precipitinas, peptídeos antimicrobianos, imunoglobulinas naturais, interferon e citocinas (MAGNADOTTIR et al., 2006; SECOMBES; ELLIS, 2012). A defesa celular inata é desempenhada pelas células fagocíticas como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células “natural killers” (FISCHER et al., 2006; 2013).

A lisozima é um importante componente do sistema imune inato em várias espécies de peixes (SAURABH; SAHOO, 2008). Esta enzima lítica atua contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, principalmente sobre as ligações β ,1-4 entre a N-acetil-glucosamina e o ácido N-acetilmurâmico, produzindo a lise da parede celular bacteriana (ELLIS, 1990). A lisozima está presente no soro, no muco de epitélios, e associada a leucócitos e tecidos ricos em leucócitos como rim, baço e intestino (ELLIS, 1990). Como outros indicadores da resposta imune está submetida a variações relacionadas à espécie, ambiente (NIGAM et al., 2012), idade (ABDOLLAHI et al., 2016), indivíduo, sexo, qualidade da água (SAURABH; SAHOO, 2008), vacinação, estresse, infecções (COSTA et al., 2011), nutrição e suplementação alimentar (KIRON, 2012). A estimativa da lisozima pode ser de valor diagnóstico para CAUNESP

determinar o estado da saúde dos peixes e para melhorar a compreensão da interação imune hospedeiro-patógeno (SAURABH; SAHOO, 2008).

2.2. Inflamação

A inflamação aguda é a primeira resposta organizada do sistema imune inato. O principal papel da inflamação é a resolução de danos nos tecidos, incluindo a eliminação de células danificadas ou mortas e quaisquer agentes patogênicos, com o intuito de restaurar a homeostase (WIEGERTJES; FORLENZA, 2010; GRAYFER; BELOSEVIC, 2012).

O processo inflamatório é inespecífico e pode ser desencadeado por parasitas, bactérias, vírus e outros agentes como a radiação e toxinas químicas (OLABUENAGA, 2000). Os eventos que caracterizam o processo inflamatório são: 1) vasodilatação com aumento do fluxo e permeabilidade vascular, 2) extravasamento de proteínas plasmáticas, e 3) recrutamento de leucócitos aos tecidos lesados (WIEGERTJES; FORLENZA, 2010; SECOMBES; ELLIS, 2012).

O reconhecimento inicial da infecção ou lesão tecidual é mediado por macrófagos residentes, seguido da liberação de mediadores inflamatórios: quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, fatores do sistema complemento, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas (SECOMBES; ELLIS, 2012). O efeito principal e mais imediato desses mediadores é o extravasamento das proteínas e fagócitos sanguíneos, principalmente neutrófilos e monócitos (WIEGERTJES; FORLENZA, 2010).

As células inflamatórias reconhecem os patógenos através de características altamente conservadas ou padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), (KOPPANG et al., 2007; CASTRO; TAFALA, 2015). Fungos, β -1,3-glucanos, fitas duplas de RNA viral, produtos da parede bacteriana como os LPS ou peptidoglicano são os PAMPs mais conhecidos (VERBURG-VAN KEMENADE et al., 2011).

Os PAMPs e DAMPs ligam-se a receptores específicos. Dentre dos quais existem os TLRs, receptores de lecitinas tipo C, receptores tipo NOD, receptores tipo RIG-I e proteínas de reconhecimento de peptidoglicano

(PGRPs) (CASTRO; TAFALLA, 2015). Os cinco tipos de receptores foram relatados em teleósteos (BOLTAÑA et al., 2011).

Os leucócitos maduros devem migrar através do endotélio sinusoidal que separa o tecido hematopoiético da circulação. Posteriormente, eles são rapidamente recrutados do sangue para os locais da inflamação por sinais quimiotáticos derivados dos PAMPs ou DAMPs (HAVIXBECK; BARREDA, 2015). O reconhecimento dos PAMPs/DAMPs mediado por TLRs desencadeia cascatas que conduzem à ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteinoquinas ativadas por mitógenos (MAPKs), que controlam a indução de outros mediadores como IL -1 β , TNF- α , quimocinas (citocinas quimiotáticas) e receptores de quimiocinas (VERBURG-VAN KEMENADE et al., 2011).

A quimiotaxia inicial na resposta inflamatória é iniciada por mediadores de ação rápida como o peróxido de hidrogênio (MARTIN; FENG 2009). Mais tarde, quimionas secretadas pelos macrófagos ou leucócitos atraem e ativam células inflamatórias (ALEJO; TAFALLA, 2011). Os leucócitos apresentam quimiotaxia diferencial em relação aos diferentes tipos de quimiocinas (VERBURG-VAN KEMENADE et al., 2011). Uma molécula particular a CXCL-8 ou IL-8 desempenha um papel crucial na migração de neutrófilos em carpas (VAN DER AA et al., 2010) e “zebrafish” (OLIVEIRA et al., 2013).

Os neutrófilos, apesar da menor proporção na circulação dos teleósteos quando comparados aos mamíferos, são tipicamente os primeiros leucócitos recrutados no sítio inflamatório (HAVIXBECK et al., 2016). Existem evidências das semelhanças morfológicas e nas propriedades citoquímicas dos neutrófilos de teleósteos e de mamíferos, assim como de funções análogas como fagocitose, quimiotaxia e ação bactericida (HINE, 1992, PALIĆ et al., 2005; HAVIXBECK; BARREDA, 2015). Dados sobre o número e atividade dos neutrófilos e outros fagócitos são usados para determinar o estado de saúde dos peixes. Técnicas como a quantificação da atividade respiratória dos leucócitos são úteis para isto (PALIĆ et al., 2005).

Poucos minutos após reconhecimento da infecção ou lesão tecidual, os neutrófilos começam a "rolar" ao longo das paredes das vênulas ao redor do local afetado (BUTCHER, 1991). Nos mamíferos, interações entre proteínas L-

selectina dos neutrófilos e E e P-selectinas vasculares são responsáveis pelo extravasamento destas células (BUTCHER, 1991).

A fagocitose é um tipo de endocitose onde partículas ($>0,5\ \mu\text{m}$) são ingeridas em vesículas endocíticas chamadas fagossomas (NEUMANN et al., 2001). A ativação dos fagócitos é crucial para a indução rápida e equilibrada de atividades pró-inflamatórias que incluem recrutamento de células no local da inflamação, destruição de agentes patogênicos e liberação de moléculas sinalizadoras (VERBURG-VAN KEMENADE et al., 2011).

Este processo é iniciado pela estimulação de receptores na superfície do fagócito, que polimeriza a actina, resultando na internalização das partículas (ADEREM; UNDERHILL, 1999). Os receptores responsáveis pelo reconhecimento dos patógenos estão presentes principalmente em macrófagos e células dendríticas e em outras como células endoteliais (LUGO-VILLARINO et al., 2010; CASTRO; TAFALLA, 2015), linfócitos B e outros granulócitos (LIESCHKE et al., 2001, ØVERLAND et al., 2010).

A fagocitose contribui, por um lado, à depuração de patógenos, e ao mesmo tempo, constitui um passo necessário para a apresentação do antígeno e posterior ativação da resposta imune adaptativa (ADEREM; UNDERHILL, 1999; CASTRO; TAFALLA, 2015).

As defesas antimicrobianas podem ser divididas em duas categorias: intracelular e extracelular. As defesas intracelulares fornecem proteção contra patógenos localizados em estruturas de membrana (RIEGER; BARREDA, 2011). As defesas extracelulares são dirigidas contra agentes patogênicos dentro do espaço extracelular, provendo um meio para eliminar patógenos que escaparam à internalização ou aqueles que são demasiado grandes para serem fagocitados (RIEGER; BARREDA, 2011).

A degradação do material fagocitado começa, não apenas quando o patógeno é internalizado em um fagossoma como consequência da fagocitose ativa, senão também quando o próprio patógeno penetra nas células fagocíticas (HAVIXBECK; BARREDA, 2015). Quando o patógeno é fagocitado, os grânulos lisossômicos migram e se fundem com o fagossoma, formando um fagolisossoma, o que produz a liberação do conteúdo ácido e enzimático lisossomal no lúmen do fagossoma com a subsequente digestão do material

fagocitado (RIEGER; BARREDA, 2011). A fusão do fagolisosoma foi comprovada em células B de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (LI et al., 2006) e em monócitos e macrófagos maduros de kinguio *Carassius auratus* (RIEGER et al., 2010).

As células fagocíticas removem o material ingerido principalmente pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante o evento denominado explosão ou atividade respiratória (CASTRO; TAFALLA, 2015). A produção de radicais de oxigênio e nitrogênio é um processo catalisado pela ativação da enzima NADPH-oxidase que leva à produção de ânions superóxido (RIEGER; BARREDA, 2011). Várias citocinas podem estimular este processo, incluindo TNF- α (GRAYFER et al., 2008), IFN- γ (GRAYFER; BELOSEVIC, 2009), CSF-1 (GRAYFER et al., 2009) e IL-8 (HARUN et al., 2008).

Por outro lado, os neutrófilos possuem mieloperoxidase em seus grânulos citoplasmáticos, que na presença de halogenetos e peróxidos de hidrogênio eliminam os microrganismos pela halogenação da parede celular bacteriana (URIBE et al., 2011). Além disso, estas células possuem lisozimas, elastasas, defensinas e outras enzimas hidrolíticas nos lisossomos (FISCHER et al., 2006; FORLENZA et al., 2008).

A produção de citocinas inflamatórias, proteínas microbicidas, espécies reativas de oxigênio e o alto número circulante de células citotóxicas são potencialmente prejudiciais para o organismo, podendo se tornar fatais (FORLENZA et al., 2008; VERBURG-VAN KEMENADE et al., 2009). Portanto, as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β são produzidas para inibir a excessiva ativação da resposta imune e iniciar processos de cicatrização de feridas, remodelação de tecido e recuperação (HAVIXBECK; BARREDA, 2015).

Uma vez que a ameaça tenha sido neutralizada, os neutrófilos devem ser removidos para a resolução do processo inflamatório. A remoção dos neutrófilos no local da lesão tecidual ocorre por vários processos: por apoptose, seguida de captação por fagócitos, por remoção em exsudatos inflamatórios, (HENRY et al., 2013) ou por migração reversa (MATHIAS et al., 2006).

2.3. Regulação da resposta imune-inflamatória

Fatores intrínsecos e extrínsecos regulam a resposta imune inata em teleósteos. Tais fatores abrangem características genéticas, sazonalidade, poluição, temperatura, luz, salinidade, qualidade da água, manuseio e estresse, alimentação, imunostimulantes, e também os efeitos das doenças e da vacinação (MAGNADOTIR, 2006, 2010; BOWDEN, 2008; TORT, 2011). A modulação da resposta do organismo sob esta variedade de eventos e de agentes patogênicos sustenta-se na interação neuroendócrina-imune (YADA; NAKANISHI, 2002) e mediadores solúveis como as citocinas (GRAYFER; BELOSEVIC, 2012).

A interação neuroendócrina com o sistema imune é um fenômeno evolutivamente conservado (VERBURG-VAN KEMENADE et al., 2011). A presença de inervação simpática no tecido linfóide foi documentada em salmonídeos (FLORY, 1989). Por outro lado, receptores de catecolaminas estão presentes nas células imunes de teleósteos (ROY; RAI, 2008). Da mesma forma, impactos inibitórios ou estimulantes da resposta imune em teleósteos são descritos para diversos hormônios circulantes como cortisol, 11-ketotestosterone, estradiol, α -MSH, MCH, β -EP, ACTH, GH e PRL (HARRIS; BIRD, 2000).

2.4. Cortisol na resposta imune

O principal corticosteroide dos teleósteos é o cortisol, e em contraste com os mamíferos, existe escassa evidência de síntese significativa de corticosterona ou cortisona (KIME, 1987). Este hormônio é liberado pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (MOMMSEN et al., 1999). Em condições de estresse, o hipotálamo libera CRF à circulação sanguínea. Este polipeptídeo estimula a secreção de ACTH da hipófise (FRYER; LEDERIS; 1986) que finalmente ativa a liberação do cortisol pelo tecido interrenal (MOMMSEN et al., 1999).

O cortisol é essencial na regulação de diversos processos fisiológicos em peixes como metabolismo intermediário (VAN DER BOON et al., 1991), osmorregulação (MCCORMICK, 2011), reprodução e desenvolvimento sexual (GOIKOETXEA et al., 2017) e metamorfose (DEANE; WOO, 2002). Geralmente, o papel do cortisol em resposta aos estímulos estressantes é

induzir o sequestro generalizado de reservas energéticas regulando o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (LEACH; TAYLOR, 1982).

Efeitos imunomoduladores do estresse e os corticosteroides foram documentados em peixes (HARRIS; BIRD, 2000; TORT, 2011). A liberação de cortisol induzida pelo estresse provoca a supressão da resposta imune, e aumenta a suscetibilidade a doenças naturais (YADA; NAKANISHI, 2002).

Os efeitos dos corticosteroides são mediados por receptores intracelulares que atuam como fatores de transcrição (PRUNETT et al., 2006). Em contraste com os mamíferos, os peixes têm dois tipos de receptores (GR1 e GR2) (STOLTE et al., 2006). Vários estudos indicaram a existência de sítios de ligação destes receptores em tecidos como brânquias, intestino, fígado, cérebro, hipotálamo e células como leucócitos e eritrócitos (PRUNETT et al., 2006). A capacidade dos GR para induzir a ativação de genes depende da concentração de cortisol, o GR2 tem uma sensibilidade sete vezes maior para o cortisol do que GR1, indicando que GR1 é ativado por níveis elevados de cortisol circulante (estresse) (STOLTE et al., 2008). Curiosamente, a expressão GR também é afetada pela estimulação imune. A injeção de LPS aumentou a expressão de GR no baço da dourada, *Spaurus aurata* (ACERETE et al., 2007). De forma similar, na carpa comum *Cyprinus carpio*, a expressão de GR1 em leucócitos peritoneais aumentou significativamente durante a inflamação, enquanto a expressão de GR2 não foi afetada (STOLTE et al., 2009).

O cortisol induziu apoptose de células B de carpa estimuladas previamente com LPS, sem alterar outros tipos de células linfocitárias (SAEIJ et al., 2003). Exposição aguda ao cortisol (induzida por estresse) e a suplementação na ração com cortisol exógeno em salmão coho *Oncorhynchus kisutch* diminuíram o número total de leucócitos circulantes, mas aumentaram seu número no timo e baço (MAULE; SCHRECK, 1990). Na perca, *Perca fluviatilis*, a injeção com cortisol exógeno diminui o número de linfócitos e trombócitos circulantes, mas aumentou o número de neutrófilos (MATHIEU et al., 2013). Os efeitos do cortisol sob a atividade respiratória e fagocítica são contraditórios. Pulsford et al., (1994) encontraram que a atividade respiratória e fagocítica dos fagócitos do rim cranial aumenta após estresse agudo, enquanto que Weyts et al., (1998) não reportaram efeitos do tratamento com cortisol in

CAUNESP

vitro ou *in vivo* na atividade respiratória de neutrófilos de carpa comum, *Cyprinus carpio*.

Análises transcricionais *in vitro* em culturas de macrófagos isolados do rim cranial de truta arco-íris *O. mykiss* mostraram que a adição de cortisol em presença de LPS leva a inibição de mais de 80% dos genes regulados por LPS (MACKENZIE et al., 2006). Antagonismo mediado pelo cortisol na expressão de genes anti-inflamatórios induzidos por LPS foi relatado em diferentes modelos de cultura de células de peixes, incluindo fagócitos do rim cranial da carpa (SAEIJ et al., 2003) e leucócitos do rim cranial da truta (HOLLAND et al., 2003). Assim, o efeito que o cortisol exerce sobre as citocinas inflamatórias é limitado e muitas vezes não significativo (STOLTE et al., 2008).

Por outro lado, aumento imediato do cortisol circulante melhora certos componentes dos mecanismos de defesa. O tratamento *in vitro* com cortisol provocou inibição da apoptose de neutrófilos de carpa, sendo o efeito dependente de GR (WEYTS et al., 1998). Haond et al. (2003) descobriram que a administração a curto prazo de cortisol exógeno em truta arco-íris, *O. mykiss* reduz a infecção parasitária pelo *Argulus japonicas*.

2.5. Metirapona

A metirapona (2-metil-1, 2-di-3-piridil-1-propanona) é um fármaco que atua como inibidor competitivo de diversas enzimas do sistema p450, dentre as quais encontra-se a 11-betahidroxilase, responsável pela síntese do cortisol a partir do 11-desoxicortisol (BROADLEY et al., 2005). A metirapona é utilizada comumente para avaliar a integridade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em animais e humanos e no tratamento de determinadas doenças (PERUZZO et al., 2010). Na atualidade, os estudos sobre a metirapona estão focados no tratamento da depressão (MCALLISTER-WILLIAMS et al., 2016), da síndrome de Cushing (SCHTEINGART, 2009; DANIEL et al., 2015), da epilepsia (GARCÍA-GARCÍA, 2017) e outros transtornos neurodegenerativos (BAITHARU et al., 2012). Este fármaco também foi utilizado como tratamento da dependência de cocaína em ratos (GOEDERS et al., 2014) e em ensaios clínicos em humanos (KABLINGER et al., 2012).

Os estudos sobre os efeitos diretos desta droga na resposta imune em humanos e animais são escassos. Existem evidências que na vigência do CAUNESP

processo inflamatório a metirapona incrementa a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-6, aumentando a severidade da resposta inflamatória num modelo experimental de periodontite em ratos Wistar (PERUZZO et al., 2010).

Pesquisas com peixes utilizaram esta droga para avaliar a participação do cortisol no metabolismo do estresse (TRIPATHI; VERMA, 2003; DINDIA et al., 2013), na reprodução (CHABBI; GANESH, 2014), e recentemente, na resposta imune (MONTROYA et al., 2017).

Os protocolos para a administração deste fármaco em peixes são diversos e vão desde a aplicação única endovenosa (PAGNOTTA et al., 1994; MILLIGAN, 2003), cateterização (RODELA et al., 2011), intracelomática (DOYON et al., 2006; DINDIA et al., 2013), injeções diárias por 7-22 dias (TRIPATHI; VERMA, 2003; CHABBI; GANESH, 2014), administração diária na água por entre 2-6 dias (LEACH; TAYLOR, 1980) e no alimento por 3-100 dias (YAMAGUCHI et al., 2010; ZANUZZO; URBINATI, 2015; MONTROYA et al., 2017).

2.6. Pacu

Esta espécie tropical é endêmica da América do Sul, principalmente das bacias dos rios Paraná-Paraguay (BENNETT; THORPE, 2008). É um peixe de porte médio a grande, atingindo até 20 kg com 50 a 100 cm de comprimento. Os adultos têm coloração castanho escura, com ventre amarelo-dourado. Possuem corpo alto, discoidal, lateralmente comprimido, com região ventral em forma de quilha serrilhada, formada por espinhos. As nadadeiras são escuras, a boca é terminal, com seis a oito dentes molariformes (SHIBATT; DIAS, 2006). O pacu caracteriza-se por hábito alimentar herbívoro-frugívoro e rápido crescimento (SOUZA et al., 2003).

2.7. *Aeromonas hydrophila*

O gênero *Aeromonas* é um dos grupos patogênicos de peixes mais antigos, caracterizado pela primeira vez na década de 1890 e cujas espécies são conhecidas pelos seus efeitos devastadores na indústria aquícola (HAVIXBECK et al., 2017). Dentre as *Aeromonas* móveis, *A. hydrophila* é considerada a mais patogênica para teleósteos (CYRINO et al., 2004), além

de atuar como zoonose, provocando diarreia e septicemia em humanos (BORCHARDT et al., 2003).

A *A. hydrophila* é uma das bactérias mais comuns na piscicultura mundial (RIDGEON et al., 2013) e brasileira (SILVA et al., 2012). Bactéria Gram-negativa, não encapsulada, aeróbia ou anaeróbia facultativa, com forma de bastonete móvel, possui flagelos polares e não produz esporos (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM, 2005). A infecção causa petéquias na pele e nas nadadeiras, progredindo para ulcerações com perda de epitélio (CARRASCHI et al., 2012). Em pacus, inoculados com doses crescentes de *A. hydrophila*, constatou-se, além destes sinais, o surgimento de sinais nervosos associados à natação errática “nado em círculos” e/ou “rodopio”, acompanhado de alterações histopatológicas como hemorragia, edema e infiltrado inflamatório no cérebro (CLAUDIANO et al., 2014). A mortalidade em peixes ocorre entre dois a 10 dias do início dos sinais clínicos (CARRASCHI et al., 2012).

Resultados anteriores do laboratório de Ictiopatologia, Unesp-Jaboticabal caracterizaram a fisiopatologia da fase inicial da infecção por *A. hydrophila* no pacu identificando alterações histopatológicas, hematológicas, bioquímicas, hormonais e imunológicas (CLAUDIANO et al., 2013; CLAUDIANO, 2015; YUNIS-AGUINAGA, 2017). As pesquisas confirmaram a participação de eicosanoides e citocinas pró-inflamatórias (CLAUDIANO et al., 2013) e insulina (YUNIS-AGUINAGA, 2017) como mediadores da resposta inflamatória.

Do exposto acima fica evidente a complexidade da regulação neuroendócrina-imune e os limitados conhecimentos na área, que tornam necessários estudos complementares que contribuam com a elucidar estas relações em peixes tropicais. Por outro lado, decorrente da posição filogenética e importância econômica, a utilização de peixes, como modelo experimental, traz também contribuições relevantes para a área da patologia comparada.

III. OBJETIVO GERAL

Determinar o papel da hipercortisolemia induzida durante a fase inicial do desafio com *A. hydrophila* na resposta imune inata do pacu.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar um método de inibição da liberação máxima do cortisol após estresse agudo com metirapona no pacu.

Caracterizar o perfil hematológico e parâmetros da imunidade inata em pacu desafiado com *A. hydrophila* submetido a tratamento prévio com metirapona.

V. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local de estudo

O estudo foi realizado no último semestre do ano 2017, no biotério de experimentação em Ictiopatologia “Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes” do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal CPPAR, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal (FCAV- Unesp), nos laboratórios de Ictiopatologia e de Patologia Comparada e Imunodiagnóstico (FCAV- Unesp), no laboratório Multiusuários do Centro de Aquicultura da Unesp e no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (FMRP/USP), adotando as normas da CEUA (Comitê de ética no uso de animais da FCAV-Unesp e os princípios éticos na experimentação animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (comitê de ética N° 01470/15).

5.2. Material biológico e condições experimentais

Foram utilizados 234 pacus, do mesmo lote, com peso médio $145,7 \pm 41,4$ g, comprimento médio $15,8 \pm 1,5$ cm, adquiridos de piscicultura comercial. Os peixes foram mantidos em tanques de concreto 10.000 L e fluxo contínuo de água (5 L.min^{-1}). Duas semanas antes do início de cada experimento os peixes foram transferidos para caixas de fibra de 250 L, abastecidas com água corrente proveniente de poço artesiano, vazão de 1 L.min^{-1} e aeração suplementar constante para sua aclimação afim de garantir níveis basais de cortisol. Durante todo o experimento, os peixes receberam ração comercial peletizada (26% PB e $3200 \text{ kcal.kg}^{-1}$ EB), duas vezes ao dia (8:00 e 16:00), numa quantidade total de 2,5% da biomassa (KOBBERSTEIN et al., 2004), somente quando indicado a ração foi alterada. As caixas foram sifonadas semanalmente e a qualidade da água determinada semanalmente, medidas mediante sondas multiparâmetros (YSI, modelo 55 e 63). Os parâmetros foram mantidos dentro da faixa adequada para a espécie (temperatura = $27 \pm 1,9^\circ\text{C}$; CAUNESP

pH = $7,20 \pm 0,7$; oxigênio dissolvido = $6,1 \pm 0,5$ mg/L; condutividade elétrica = $132,5 \pm 15,7$ μ S/cm) (JOMORI et al., 2003).

5.3. Fármacos e aplicação

A metirapona, 2-metil-1,2-di-3-piridilpropanona (856525, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU), foi aplicada de duas formas: intracelomática, diluída em solução de propilenglicol (PM 400) a 40%, dissolvido em solução salina a 0,9% (v/v); e oral, dissolvida em 5 mL de álcool etílico puro e aplicada por aspersão na ração. As rações com MET foram preparadas 24h antes do uso e armazenadas em capela de exaustão. As doses e as metodologias de aplicação da MET testadas foram adaptações de experimentos feitos com ratos, com aplicação intraperitoneal (ROTLLAND; ARMÁRIO, 2005; BAITHARU et al., 2012); e com peixes, com injeções únicas (PAGNOTTA et al., 1994; MILLIGAN, 2003) e via oral (ZANUZZO; URBINATI, 2015; MONTOYA et al., 2017).

5.4. Ensaio prévio: Padronização do protocolo de inibição da síntese de cortisol com MET

Prévio ao experimento principal foi testada a eficácia de dois protocolos de administração de MET para inibir a liberação máxima de cortisol após estresse agudo por exposição aérea por cinco minutos. Com o objetivo de certificar o efeito inibitório foram avaliadas a glicemia e a cortisolemia.

5.4.1. Protocolos testados

O primeiro protocolo testado incluiu uma dose intracelomática de 50mg.kg^{-1} PV de MET (0,2 mL/100 g). Para isto, 24 animais em jejum (12h) foram injetados com o fármaco e submetidos a estresse agudo por exposição aérea por cinco minutos. Nos tempos de 30 min, 2h e 4h após estresse foram coletadas amostras de sangue de oito peixes por tempo para determinação da glicemia e da cortisolemia. Outro grupo de peixes (n=24) foi inoculado com o veículo do fármaco e submetidos aos mesmos procedimentos (grupo controle). Finalmente um grupo de oito peixes sem manuseio foi utilizado para determinar os níveis basais (tempo zero).

No segundo protocolo (P2) a MET foi administrada na ração na dose de 30 mg.kg⁻¹ PV durante cinco dias, duas vezes ao dia. Ensaio prévios no laboratório evidenciaram que a inclusão de MET na ração por cinco dias foi insuficiente para bloquear a liberação de cortisol após estresse, provavelmente produto do jejum prévio ao estresse (dados não mostrados). Por este motivo, foi testada a inclusão de um reforço intracelomático de MET no sexto dia (8:00) (50 mg.kg⁻¹ PV) nos peixes suplementados por cinco dias. O grupo controle recebeu ração pulverizada com álcool puro, mas sem a MET. Os tempos de coleta e número de animais foram os mesmos que os descritos para o primeiro protocolo.

5.4.2. Indução da anestesia e colheita de sangue

Nos tempos pré-determinados após indução do estresse agudo, os pacus foram anestesiados em solução de benzocaína 100 mg.L⁻¹ (NEIFFER; STAMPER, 2009), diluída previamente em álcool puro 0,1 g.mL⁻¹ (WEDEMEYER, 1970). Atingido o plano anestésico cirúrgico desejado, os animais foram posicionados em decúbito lateral para coleta de sangue por punção do vaso caudal com seringas com EDTA a 10%. O sangue foi centrifugado imediatamente a 5000 rpm/5 min para coleta do plasma. O plasma foi utilizado para determinação da glicemia e o restante congelado a -80°C para dosagem do cortisol.

5.4.3. Determinação da glicemia e cortisolemia

Para dosagem da glicose, as amostras de plasma foram mantidas em refrigeração e processadas imediatamente utilizando kit comercial (Ref 133, Labtest Diagnóstica, Brasil), mediante o método enzimático-colorimétrico oxidase/peroxidase (GOD-POD) (TRINDER, 1969). A leitura foi feita em espectrofotômetro (SP-22, Biospectro, Curitiba, Brasil), no comprimento de onda de 405 nm. As amostras de plasma para determinação da cortisolemia foram processadas no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia da FMRP/USP. Para tanto, utilizou-se o método de radioimunoensaio, segundo Gazola et al. (1996), que consiste em ensaio de competição por quantidade fixa de hormônio marcado (100µL) + quantidade fixa de anticorpo anti-cortisol (PA1-85346, Thermo Scientific, Rockford, EEUU) (100 µL) + quantificação variável

do plasma dos animais (200 µL) + 500 µL tampão fosfato (0,05 M; pH 7,0), avaliada em contador de radiação Beta.

5.5. Experimento principal

Para este experimento, foi escolhido o segundo protocolo testado anteriormente (administração de MET na ração nos cinco dias prévios e injeção intracelomática de MET no sexto dia) que apresentou os melhores resultados na inibição da glicemia e cortisolemia após estresse agudo.

5.5.1. Delineamento experimental

Os peixes (n=104) foram distribuídos em quatro grupos segundo o observado na Tabela 1. O primeiro grupo (T1) foi utilizado como controle basal sem suplementação alimentar, sem injeção, nem manuseio. O segundo grupo (T2) foi utilizado como controle farmacológico, estes animais receberam ração aspergida com álcool puro durante cinco dias, no sexto dia receberam injeção intracelomática do veículo da MET (0,2 mL/100g) e foram inoculados com CL_{50-96h} de *A. hydrophila* diluída em PBS estéril. O grupo T3 recebeu a ração suplementada com MET, no sexto dia foi injetado com 50 mg.kg⁻¹ PV de MET via intracelomática e inoculado com a bactéria. O grupo T4 recebeu ração suplementada com MET, no sexto dia recebeu 50 mg.kg⁻¹ PV de MET via intracelomática e injetado com PBS estéril. Nos tempos de 1, 3, 6 e 9 horas após desafio bacteriano (HAD), oito animais dos grupos T2, T3 e T4 foram anestesiados em solução de benzocaína para colheita de sangue. As amostras do grupo T1 foram coletadas num único tempo (zero) e utilizadas como parâmetros basais. Os tempos foram pré-estabelecidos em experimentos prévios com pacu como modelo de estudo das fases iniciais da inflamação e da sepse (CLAUDIANO, 2015; YUNIS-AGUINAGA, 2017), pois nesses tempos foram evidenciadas variações importante nos parâmetros hematológicos e imunológicos.

Tabela 1. Distribuição de grupos experimentais

Grupo	n	Tratamento	Desafio	Colheita de sangue (HAD)
T1 CAUNESP	8	-	-	Única (0)

T2	3	Ração comum	CL ₅₀ de	1, 3, 6 e 9
	2		<i>A. hydrophila</i>	
T3	3	Ração suplementada	CL ₅₀ de	1, 3, 6 e 9
	2	com MET 30 mg.kg ⁻¹	<i>A. hydrophila</i>	
		P.V.		
T4	3	Ração suplementada	PBS estéril	1, 3, 6 e 9
	2	com MET 30 mg.kg ⁻¹		
		P.V.		

HAD: Horas após desafio

5.6. Determinação da concentração letal 50%-96h

5.6.1. Obtenção da bactéria

A cepa de *A. hydrophila* utilizada foi previamente isolada de tilápias naturalmente infectados, com lesões compatíveis com aeromonose (GARCIA; MORAES, 2009).

5.6.2. Cálculo da dose letal

A bactéria foi mantida congelada em ultrafreezer (-80°C) em caldo TSB suplementado com glicerol a 15% (v/v). A reativação foi feita em TSA a 30°C, por 24h. Após o crescimento, colônias características foram semeadas em 100 mL de TSB e incubadas sob as mesmas condições, em incubadora com agitador orbital (C24 Classic Series, New Brunswick, New Jersey, EEUU) a 200 rpm. A seguir, o material foi centrifugado a 5.000 g/10 min/4°C, o sobrenadante desprezado e a massa bacteriana precipitada diluída em PBS estéril. Foram preparadas suspensões bacterianas decrescentes de 1000; 0,750; 0,500; 0,250 e 0,125 de densidade óptica (DO) a 600 nm. No desafio foram utilizados seis grupos experimentais de seis peixes cada. A mortalidade de cada grupo foi avaliada até às 96h e os dados submetidos à análise estatística pelo método Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977). Durante o período de infecção, os peixes foram mantidos sem alimentação e sem sifonagem da água, com monitoramento diário das variáveis físico-químicas e da taxa de mortalidade. A CL₅₀ foi estimada em DO_{600nm}=0,750, de solução bacteriana dissolvida em CAUNESP

PBS, equivalente a $1,7 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. A determinação das UFC foi feita em triplicata, através do plaqueamento de 100 µL do inóculo em placas de 90 mm com meio TSA estéril, incubadas a 28°C por 20h.

5.7. Indução da inflamação por *A. hydrophila*

A inflamação foi induzida pela administração na bexiga natatória de *A. hydrophila* suspensa em PBS estéril, seguindo o protocolo de preparação do inóculo bacteriano descrito anteriormente. Os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (100 mg.mL⁻¹), colocados em decúbito dorsal para inoculação da solução bacteriana com auxílio de agulha e seringa de tuberculina estéril. Os grupos desafiados receberam 0,5 ml da solução bacteriana e o grupo T4 recebeu o mesmo volume de PBS estéril.

5.8. Avaliações hematológicas

O sangue foi coletado nos tempos pré-determinados, com auxílio de seringas de 3 mL e agulhas 26G contendo EDTA a 10%. Antes da centrifugação 5 µL do sangue foram diluídos em solução de Natt Herrick (1:200), a mistura repousou por cinco minutos e a contagem de células vermelhas foi realizada em duplicata em câmara de Neubauer segundo a metodologia de Grant et al., (2015). As contagens do número total de trombócitos e leucócitos foram realizadas pelo método indireto em extensões sanguíneas coradas com kit de hematologia rápido (Instant Prov, NewProv, Paraná, Brasil). A contagem diferencial de leucócitos sanguíneos foi realizada nas mesmas lâminas e num número total de 100 células (GRANT et al., 2015). Outras variáveis hematológicas avaliadas foram o percentual de hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) e a taxa de hemoglobina (COLLIER, 1944). A partir destes dados foram calculados os índices hematométricos: o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (WINTROBE, 1934).

5.9. Avaliação das variáveis de imunidade inata:

5.9.1. Atividade respiratória de leucócitos do sangue

A atividade respiratória dos leucócitos do sangue foi quantificada mediante a técnica de redução do corante NBT descrita por Sahoo et al., (2005) com modificações. Para isto, 100 µL de sangue com anticoagulante foram adicionados em 100 µL do corante NBT a 0,2% (N5514, Sigma-Aldrich), a solução final foi homogeneizada e incubada em escuridão por 30 minutos a 25°C. A solução de NBT foi preparada em PBS suplementado com Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (133 mM NaCl, 2,7mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; 1mM CaCl₂.2H₂O; 0,5 mM MgCl₂.6H₂O), pH 7,24. Após incubação e nova homogeneização, 50 µL da solução foram misturados com 1 mL de DMF (D4551, Sigma-Aldrich). A mistura foi centrifugada a 3000 g por 5 min e transferida para cubeta de quartzo. A DO_{540nm} da solução final foi determinada em espectrofotômetro. No branco o sangue foi substituído por água destilada.

5.9.2. Atividade da lisozima sérica

A concentração de lisozima sérica foi determinada mediante teste turbidimétrico em microplaca (LEE; YANG, 2002; HELAL; MELZIG, 2008). Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (m3770, Sigma-Aldrich) (0,36 mg.mL⁻¹) foi preparada imediatamente antes do uso, em tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 6,2). Posteriormente, 50 µL do soro foram adicionados em 200 µL da suspensão bacteriana em poços de microplaca de fundo plano, em triplicata. A microplaca foi agitada durante um minuto, colocada em leitora de microplacas (EZ Read 2000, Biochrome, Cambridge, Reino Unido) e lida a 450 nm. A densidade óptica foi avaliada no início e a cada cinco minutos por 10 minutos, a temperatura ambiente. A concentração de lisozima (µg.mL⁻¹) correspondeu à redução entre a DO inicial e a final. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade necessária para provocar diminuição de 0,001/min na absorbância. A equação da regressão linear da curva de calibração de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima nas amostras.

Na curva de calibração foram usadas distintas concentrações de lisozima de clara de ovo de galinha (L6876, Sigma-Aldrich). Para isto, 50 µL de tampão fosfato (0,1 M; pH 6,2) e 50 µL da lisozima padrão (4000 U/mL) foram adicionadas no primeiro poço, após mistura, 50 µL foram transferidos para o segundo poço. O processo foi repetido sete vezes, e os 50 µL do sétimo poço foram descartados.

5.9.3. Atividade bactericida do plasma

A atividade bactericida do plasma foi determinada mediante a metodologia descrita por El-Asely et al. (2014) com modificações. Culturas de *A. hydrophila* foram preparadas até obtenção de suspensão com $DO_{600nm} = 0,950$, posteriormente diluída em 1:100.000 em PBS estéril. A suspensão bacteriana (75 μ L) foi incubada em duplicata com 75 μ L do plasma colhido, em microplacas com fundo em U estéreis, durante 1h, a 28 °C. Logo, 100 μ L da suspensão resultante foram semeados em meio TSA, incubados por 20h, a 28 °C. Como controle positivo ao invés de ser incubada com plasma, a suspensão bacteriana foi incubada com PBS estéril. Após 20h, a atividade bactericida do plasma foi expressa como a percentagem de unidades formadoras de colônias em relação ao controle positivo: $1 - \text{UFC da amostra} / \text{UFC do controle positivo} \times 100\%$.

5.10. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. Os dados foram analisados quanto a normalidade e homocedasticidade. Confirmada a normalidade e homocedasticidade dos mesmos, foram analisados com teste t ou análise de variância (Anova), em caso de diferença significativa no Anova foi utilizado o teste de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

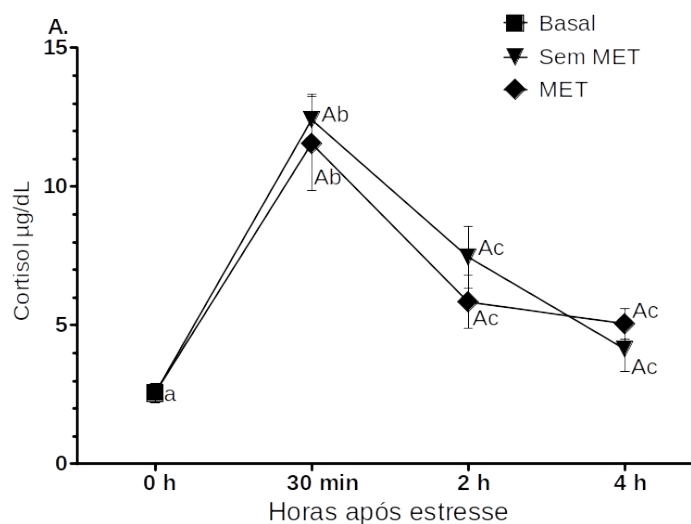
VI. RESULTADOS

6.1. Ensaio prévio: Padronização do protocolo de inibição da síntese de cortisol com MET

CAUNESP

6.1.1. Cortisolemia plasmática

A cortisolemia e a glicemia foram utilizadas para comprovar o efeito inibitório de dois protocolos de administração da MET após estresse agudo por exposição aérea no pacu. A Figura 1A mostra que a injeção única da MET foi ineficaz na inibição da liberação de cortisol após estresse agudo. Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos tempos avaliados. No protocolo 2, administração de MET na ração e injeção de MET no sexto dia, evidenciou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nos três tempos avaliados (Figura 1B). A aplicação da MET não inibiu completamente o incremento na cortisolemia após estresse, porém os níveis diminuíram até 50% 30 min após exposição aérea. Na análise dos tempos foi observado que valores máximos de cortisol foram alcançados aos 30 min após estresse, com diminuição gradativa, retomando aos valores basais às 2h após estresse no grupo com MET (protocolo 2), (Figura 1B).



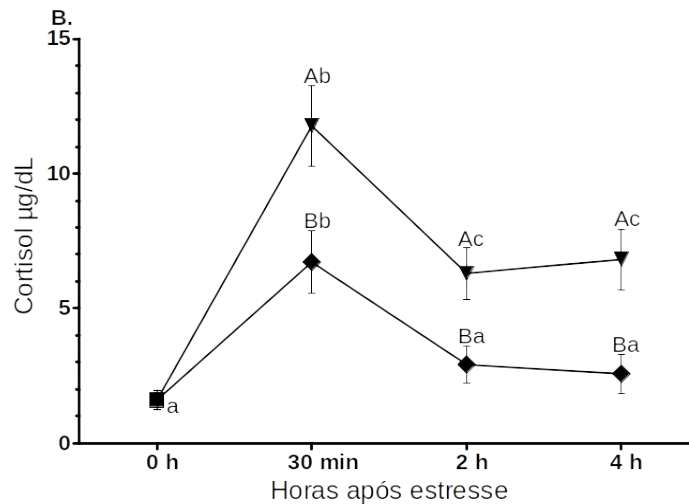


Figura 1. Cortisolemia (média $\pm$ erro padrão) em *P. mesopotamicus* submetidos a estresse agudo por exposição aérea e tratados previamente com MET. A. Injeção intracelomática de 50 mg.kg⁻¹ PV de MET; B. Suplementação na ração com 30 mg.kg⁻¹ PV de MET durante 5 dias, e no sexto dia injeção intracelomática de 50 mg.kg⁻¹ PV de MET. Letras maiúsculas diferentes denotam diferença significativa entre grupos pelo teste t para amostras independentes e letras minúsculas diferentes denotam diferença significativa entre os tempos de um mesmo grupo pelo teste de Tukey.

6.1.2. Glicemia plasmática

Na glicemia plasmática foi verificado que o protocolo 1, injeção intracelomática única de MET, foi ineficaz, pois não foi evidenciada diferença significativa ($p > 0,05$) entre grupos nos tempos de 30 min e 2 h após estresse, apenas houve diminuição estatística às 4h após o estresse no grupo com MET (Figura 2A). Por outro lado, o protocolo 2, administração de MET na ração e injeção de MET no sexto dia, mostrou diminuição significativa nos três tempos avaliados ($p < 0,05$) (Figura 2B). A administração do fármaco não inibiu o aumento na glicemia após estresse agudo em nenhum dos protocolos ou tempos avaliados, quando comparados ao tempo zero. A glicemia máxima foi alcançada 30 minutos após o estresse. A concentração de glicose diminuiu com o tempo, porém até às 4h pós-estresse os valores não retomaram à concentração basal ($p > 0,05$).

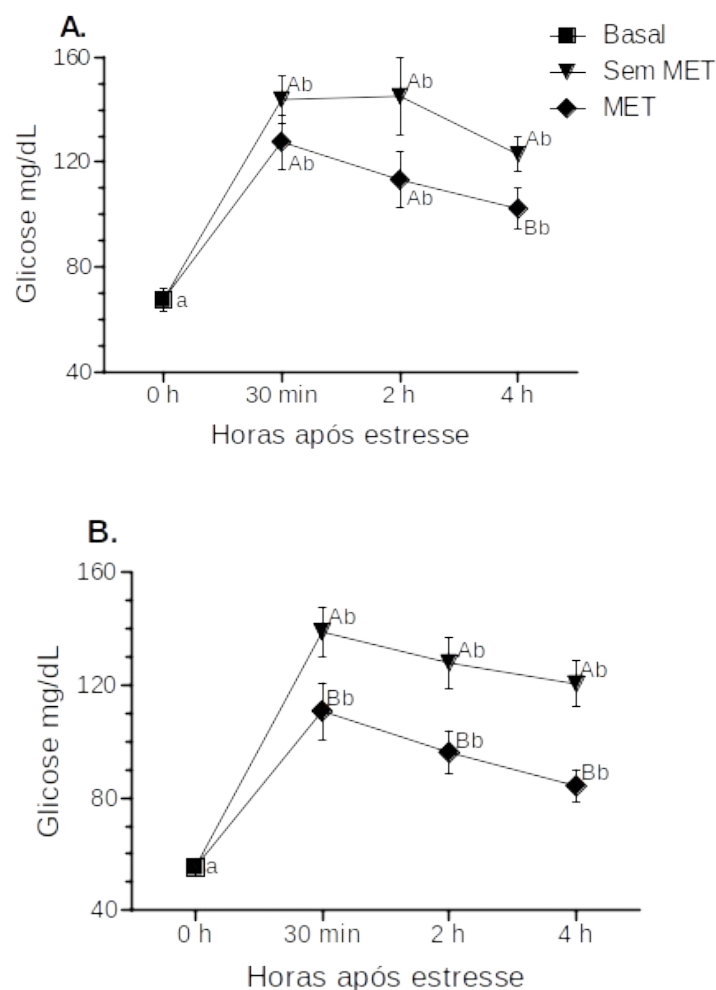


Figura 2. Glicemia (média $\pm$ erro padrão) em *P. mesopotamicus* submetidos a estresse agudo por exposição aérea e tratados previamente com MET. A. Injeção intracelomática de 50 mg.kg⁻¹ PV de MET; B. Suplementação na ração com 30 mg.kg⁻¹ PV de MET durante 5 dias, e no sexto dia injeção intracelomática de 50 mg.kg⁻¹ PV de MET. O controle basal foi considerado como tempo zero. Letras maiúsculas diferentes denotam diferença significativa entre grupos pelo teste t para amostras independentes e letras minúsculas diferentes descrevem diferença significativa entre os tempos de um mesmo grupo pelo teste de Tukey.

6.2. Experimento principal

6.2.1. Cortisolemia plasmática

Os resultados da cortisolemia permitem concluir que existiu efeito inibitório do tratamento prévio com MET na liberação de cortisol após desafio CAUNESP

bacteriano. Houve diferença significativa entre os três grupos experimentais nos tempos de 3, 6 e 9 horas após desafio (HAD). O grupo T2 apresentou os valores máximos, seguido pelo T3 e T4, que apresentou valores mínimos em todos os tempos avaliados. No tempo 1h houve diferença entre o grupo T2 e T4. Nos grupos T3 e T4 não existiu diferença entre o tempo 0h e 1h. Todos os tempos restantes avaliados dos grupos T2 e T3 avaliados apresentaram diferença significativa quando comparados com o tempo 0h, com exceção das 9 HAD no grupo T3. A cinética hormonal no grupo T3 foi similar à do grupo T2, porém com valores mais altos. No grupo T4 não foram evidenciadas diferenças em nenhum dos tempos. A cortisolemia máxima após inoculação bacteriana foi alcançada 3 HAD. Logo após, as concentrações diminuíram gradativamente, sem diferença significativa entre tempos consecutivos (Figura 3).

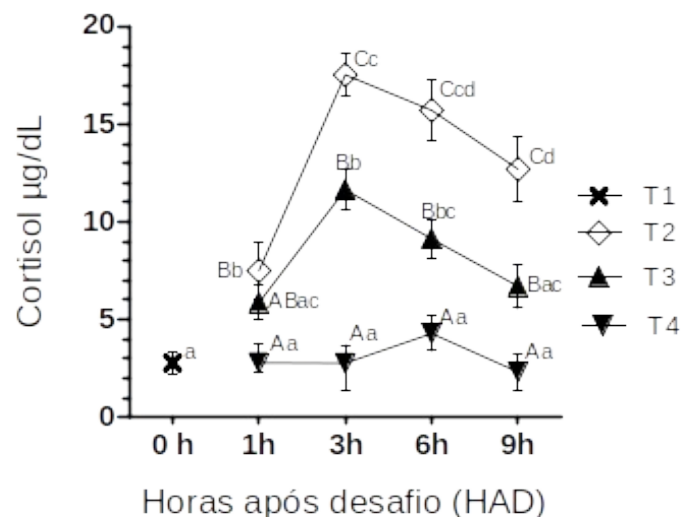


Figura 3. Cortisolemia (média $\pm$ erro padrão) plasmática em *P. mesopotamicus* submetidos a tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. O grupo basal foi usado como tempo zero para todos os outros grupos. T1: Basal. T2: Sem MET, com bactéria. T3: Com MET, com bactéria. T4: Com MET, sem bactéria. Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula em comum não diferiram no mesmo tempo entre grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula em comum não diferiram comparando diferentes tempos do mesmo grupo, pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

6.2.2. Glicemia plasmática

As diferenças na glicemia entre os grupos desafiados com a bactéria com MET ou sem MET foram discretas. Às 3 HAD, os grupos T3 e T4 apresentaram valores significativamente menores que T2. Às 6h não houve diferença e finalmente às 9h, T4 apresentou valores maiores que T2 e T3. Houve aumento significativo 1 HAD em todos os grupos, os níveis mantiveram-se altos até 3 HAD no grupo T2 e diminuíram significativamente após 3h nos grupos T3 e T4. Entre as 3 e 6 HAD houve diferença no grupo T2. Entre os tempos de 6 e 9h foi identificada queda significativa no grupo T3. O grupo T4 só apresentou incremento significativo à 1 HAD (Figura 4).

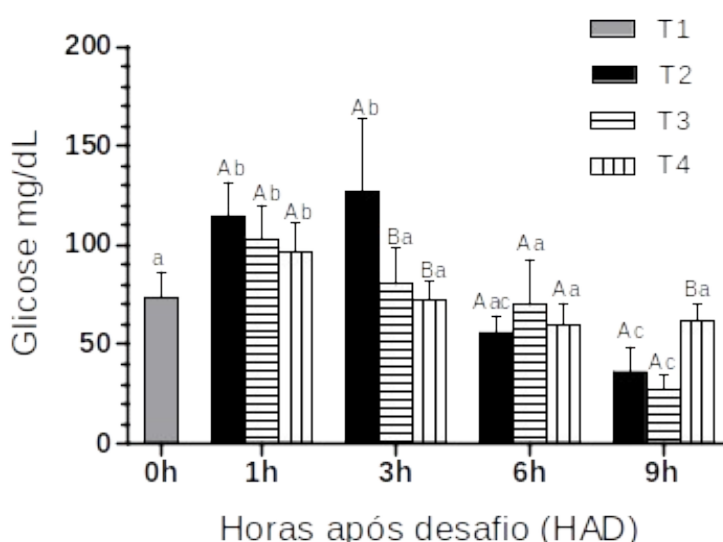


Figura 4. Glicemia plasmática (média $\pm$ erro padrão) em *P. mesopotamicus* submetidos a tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. T1: Basal. T2: Sem MET, com bactéria. T3: Com MET, com bactéria. T4: Com MET, sem bactéria. O grupo basal foi usado como tempo zero para todos os outros grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula em comum não diferiram no mesmo tempo entre grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula em comum não diferiram comparando diferentes tempos do mesmo grupo, pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

6.2.3. Hemograma

Os resultados do hemograma podem ser observados na Tabela 2. Não foram identificadas diferenças significativas entre grupos em nenhum dos quesitos avaliados. Na hemoglobina foi observada diminuição significativa 9 HAD no grupo T2, quando comparada com o tempo zero. Peixes que receberam tratamento com MET e o desafio bacteriano tiveram decremento significativo 6 HAD, quando comparados com o tempo zero. Finalmente os peixes que receberam tratamento com MET, sem estímulo inflamatório apresentaram diminuição significativa 3h após injeção. No hematócrito existiu diferença significativa entre o tempo 9h e os tempos restantes do grupo com MET e a bactéria.

Na contagem total de células sanguíneas foram observados predominantemente trombócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos. Dentre os granulócitos foram considerados predominantemente neutrófilos, células granulocíticas especiais, eosinófilos e basófilos.

Na análise do leucograma podem-se verificar diferenças significativas entre grupos no número de leucócitos totais, linfócitos e trombócitos. No número de leucócitos totais observou-se valor significativamente maior às 6 e 9 HAD no grupo com MET e sem bactéria quando comparado ao grupo sem MET e com bactéria. Também foi observado número significativamente maior de linfócitos nos grupos T3 e T4 quando comparados com o T2. O número de trombócitos foi significativamente maior no grupo T4 quando comparado aos grupos T3 e T2.

Não houve diferença significativa entre grupos e entre tempos no número de monócitos. O número de granulócitos totais mostrou diferenças entre tempos do mesmo grupo. A inoculação da bactéria induziu redução significativa dos granulócitos às 3h no grupo T2, e aumento no grupo T3 às 6 e 9h (Tabela 3).

Tabela 2. Valores médios, erro padrão e análise de variância da série vermelha do hemograma de *P. mesopotamicus* submetidos a tratamento prévio com metirapona e desafiados com *A. hydrophila* em diferentes tempos.

	Hb (g.dL ⁻¹)				Hct (%)				Ert (10 ⁶ .µL ⁻¹)				CHCM (g.dL ⁻¹)				HCM (pg)				VCM (fL)			
T1: Basal																								
0h	9,59	±	1,68	a	36,2	±	3,30	a	1,82	±	0,31	a	26,4	±	3,6	a	0,5	±	0,10	a	2,04	±	0,37	a
T2: Sem MET bactéria																								
1h	8,52	±	0,31	Aab	33,0	±	4,04	Aa	1,69	±	0,21	Aa	26,1	±	3,0	Aa	0,5	±	0,07	Aa	1,97	±	0,21	Aa
3h	8,81	±	0,82	Aab	34,7	±	3,58	Aa	1,65	±	0,25	Aa	25,4	±	2,1	Aa	0,5	±	0,07	Aa	2,14	±	0,34	Aa
6h	8,53	±	1,53	Aab	35,2	±	5,28	Aa	1,71	±	0,33	Aa	24,2	±	2,8	Aa	0,5	±	0,08	Aa	2,09	±	0,27	Aa
9h	7,32	±	2,26	Ab	33,2	±	4,03	Aa	1,78	±	0,47	Aa	23,4	±	3,8	Aa	0,4	±	0,27	Aa	2,08	±	0,80	Aa
T3: Com MET bactéria																								
1h	9,17	±	1,06	Aab	34,5	±	4,04	Aa	1,58	±	0,31	Aa	26,6	±	2,3	Aa	0,6	±	0,13	Aa	2,24	±	0,47	Aa
3h	9,12	±	1,45	Aab	34,6	±	2,50	Aa	1,85	±	0,13	Aa	26,3	±	3,9	Aa	0,5	±	0,08	Aa	1,89	±	0,21	Aa
6h	7,15	±	1,35	Ab	33,6	±	4,07	Aa	1,58	±	0,28	Aa	21,2	±	3,0	Aa	0,4	±	0,14	Aa	2,17	±	0,34	Aa
9h	8,42	±	1,98	Aab	30,2	±	4,46	Ab	1,71	±	0,38	Aa	26,9	±	5,3	Aa	0,5	±	0,19	Aa	1,93	±	0,61	Aa
T4: Com MET sem bactéria																								
1h	9,38	±	0,77	Aab	31,3	±	3,62	Aa	1,68	±	0,20	Aa	24,2	±	5,3	Aa	0,4	±	0,09	Aa	1,90	±	0,35	Aa
3h	8,00	±	1,13	Ab	33,7	±	4,38	Aa	1,64	±	0,19	Aa	24,8	±	3,7	Aa	0,5	±	0,08	Aa	2,08	±	0,40	Aa
6h	8,46	±	1,22	Aab	34,8	±	3,72	Aa	1,67	±	0,21	Aa	22,4	±	6,2	Aa	0,4	±	0,13	Aa	2,11	±	0,31	Aa
9h	8,47	±	0,82	Aab	35,5	±	4,81	Aa	1,66	±	0,22	Aa	23,7	±	2,1	Aa	0,5	±	0,06	Aa	2,16	±	0,39	Aa

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula em comum não diferiram no mesmo tempo entre grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula em comum não diferiram comparando diferentes tempos do mesmo grupo, pelo teste de Tukey ($p>0,05$). O grupo controle basal foi utilizado como o tempo zero de todos os grupos experimentais. Hb – Hemoglobina; Hct – Hematócrito; Ert – Eritrócitos totais; CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Médida; HCM – Hemoglobina Corpuscular Média; VCM Volume Corpuscular Médio.

Tabela 3. Valores médio, erro padrão e análise de variância da série branca do hemograma de *P. mesopotamicus* submetidos a tratamento prévio com metirapona e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos.

	Leucócitos totais (10 ⁴ µL ⁻¹)				Granulócitos* (10 ⁴ µL ⁻¹)				Linfócitos (10 ⁴ µL ⁻¹)				Monócitos (10 ⁴ µL ⁻¹)				Trombócitos (10 ⁴ µL ⁻¹)			
T1: Controle basal																				
0h	5,8	±	1,1	a	0,7	±	0,2	a	1,1	±	0,3	a	0,1	±	0,3	a	3,9	±	1,6	a
T2: Sem MET bactéria																				
1h	5,6	±	2,1	Aa	0,5	±	0,3	Aab	0,9	±	0,7	Aa	0,1	±	0,6	Aa	4,1	±	0,7	Aa
3h	4,6	±	2,4	Aab	0,1	±	0,1	Ab	1,3	±	0,4	Aa	0,2	±	0,3	Aa	3,0	±	1,2	Aa
6h	3,9	±	1,3	Aab	0,7	±	0,4	Aa	0,5	±	0,2	Ab	0,8	±	0,4	Aa	1,9	±	1,1	Aa
9h	3,0	±	0,9	Ab	0,9	±	0,6	Aa	0,4	±	0,3	Ab	0,7	±	0,4	Aa	1,0	±	0,5	Ab
T3: Com MET bactéria																				
1h	5,7	±	1,5	Aa	0,5	±	0,3	Aa	1,7	±	0,9	Aab	0,4	±	0,3	Aa	3,1	±	1,3	Aa
3h	4,2	±	2,2	Aa	0,7	±	0,5	Aa	0,9	±	0,4	Aab	0,3	±	0,5	Aa	2,3	±	0,4	Aa
6h	4,8	±	1,1	Aa	1,4	±	0,3	Ab	0,6	±	0,3	Ab	0,7	±	0,3	Aa	2,1	±	1,4	Aab
9h	4,9	±	0,5	Aa	0,8	±	0,4	Aab	2,2	±	0,6	Ba	0,4	±	0,2	Aa	1,5	±	0,8	Ab
T4: Com MET sem bactéria																				
1h	5,4	±	1,9	Aa	0,5	±	0,5	Aa	1,3	±	0,4	Aa	0,2	±	0,4	Aa	3,4	±	1,9	Aa
3h	4,5	±	0,8	Aa	0,3	±	0,6	Aa	1,5	±	0,7	Aa	0,3	±	0,7	Aa	2,4	±	1,3	Aa
6h	7,0	±	0,9	Ba	0,6	±	0,7	Aa	2,0	±	1,5	Aa	0,4	±	0,4	Aa	4,0	±	0,7	Ba
9h	6,0	±	0,7	Ba	0,6	±	0,9	Aa	1,8	±	0,3	Ba	0,2	±	0,3	Aa	3,4	±	0,6	Ba

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula em comum não diferiram no mesmo tempo entre grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula em comum não diferiram comparando diferentes tempos do mesmo grupo, pelo teste de Tukey (p>0,05). O grupo controle basal foi utilizado como o tempo zero em todos os grupos experimentais. *Granulócitos constituídos de neutrófilos, basófilos, eosinófilos e células granulocíticas especiais.

6.2.4. Atividade respiratória dos fagócitos sanguíneos

Na análise da atividade respiratória foram observadas diferenças significativas entre grupos às 3h, T2 significativamente menor que T3 e T4, e às 6h, T3 significativamente maior que T2 e T4. Reporta-se queda significativa às 3h no grupo T2 quando comparado com o tempo zero (Figura 5).

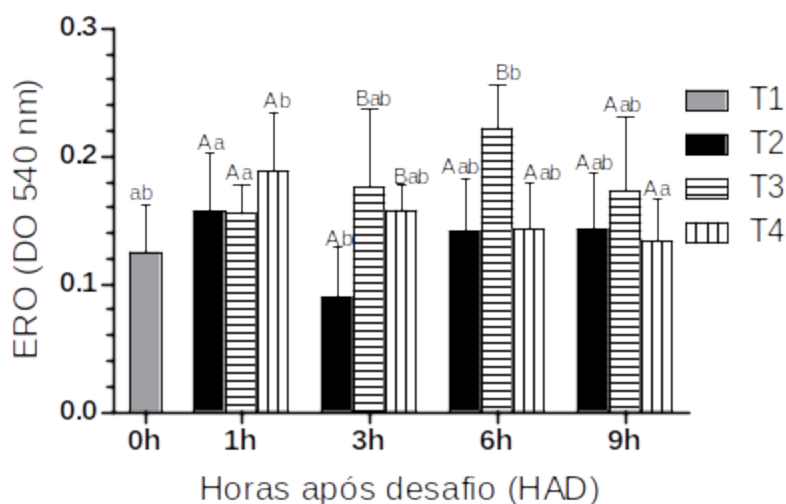


Figura 5. Atividade respiratória dos fagócitos sanguíneos (média $\pm$ erro padrão) em pacus submetidos a tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. T1: Basal. T2: Sem MET, com bactéria. T3: Com MET, com bactéria. T4: Com MET, sem bactéria. O grupo Basal foi usado como tempo zero para todos os outros grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula em comum não diferiram no mesmo tempo entre grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula em comum não diferiram comparando diferentes tempos do mesmo grupo, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

6.2.5. Lisozima sérica

Não foram observadas diferenças entre grupos avaliados ou entre tempos do mesmo grupo ($p > 0,05$) (Figura 6).

6.2.6. Atividade bactericida do plasma

A atividade bactericida do plasma apresentou diferenças entre grupos nos tempos de 6 e 9 HAD. Às 6h, o grupo T3 foi significativamente maior que os grupos T2 e T4, e às 9h o grupo T2 foi significativamente maior que o grupo T4. (Figura 7).

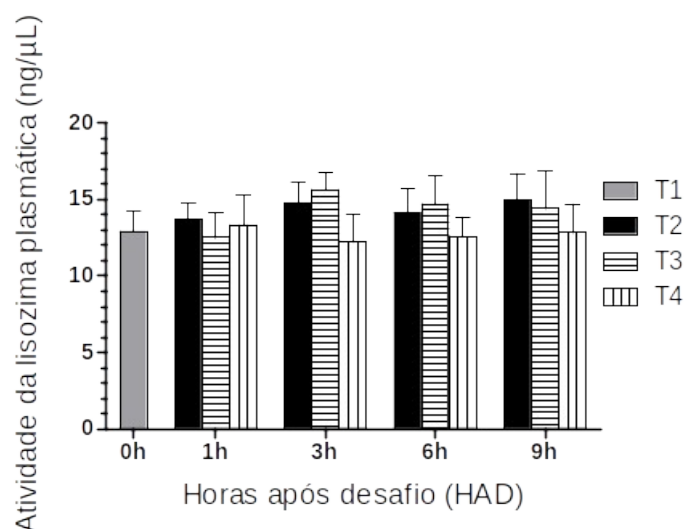


Figura 6. Atividade da lisozima sérica (média $\pm$ erro padrão) em *P. mesopotamicus* submetidos a tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. T1: Basal. T2: Sem MET, com bactéria. T3: Com MET, com bactéria. T4: Com MET, sem bactéria. O grupo Basal foi usado como tempo zero para todos os outros grupos.

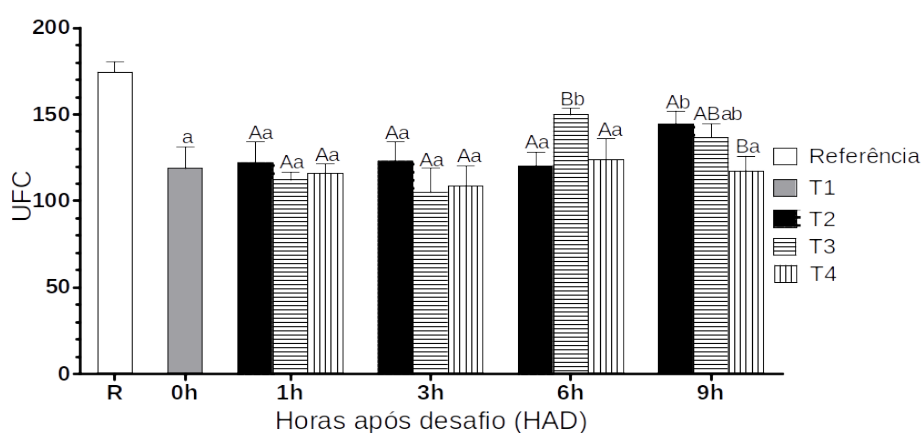


Figura 7. Atividade bactericida do plasma (média + erro padrão) em pacus submetidos a tratamento prévio com MET e desafiados com *A. hydrophila*, em diferentes tempos. R: Valor de referência (PBS estéril + *A. hydrophila*). UFC: Unidades formadoras de colônias. T1: Basal. T2: Sem MET, com bactéria. T3: Com MET, com bactéria. T4: Com MET, sem bactéria. O grupo T1 foi usado como tempo zero para todos os outros grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula em comum não diferiram no mesmo tempo entre grupos. Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula em comum não diferiram comparando diferentes tempos do mesmo grupo, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

VII. DISCUSSÃO

A aplicação de metirapona, na maioria dos casos, não consegue diminuir significativamente os níveis basais do cortisol (LEACH; TAYLOR, 1980), sendo necessário induzir a liberação de altas quantidades de cortisol para testar a capacidade de inibição hormonal deste fármaco. No presente trabalho, o modelo escolhido para induzir a liberação do cortisol foi o estresse agudo por exposição aérea, modelo amplamente validado para peixes, particularmente para o pacu (ZANUZZO; URBINATI, 2015; MONTOYA et al., 2017).

A administração de injeções únicas de MET mostrou-se eficaz para inibir a liberação de cortisol após estresse agudo em salmonídeos (MILLIGAN, 2003; DINDIA et al., 2013), ao contrário do observado em pacus neste ensaio (protocolo 1). Como alternativa, foi testada a inclusão oral e reforço por injeção de MET (protocolo 2). A literatura recomenda utilizar protocolos não invasivos para evitar interferências hormonais no bloqueio do cortisol (ZANUZZO; URBINATI, 2015), motivo pelo qual não foram testadas injeções múltiplas que provocassem maior estresse aos animais (BENNETT; RHODES, 1986). Porém, a administração oral de MET por períodos prolongados, mostrou-se ineficaz para bloquear o aumento imediato de cortisol em matrinxãs (MONTOYA et al., 2017). Pelo exposto, no segundo protocolo testado neste estudo foi incluído um reforço intracelomático de MET junto com o estresse.

Uma dose intracelomática de 50 mg.kg⁻¹ PV de MET foi incapaz em inibir a liberação de cortisol e o incremento da glicemia após estresse agudo por exposição aérea por cinco minutos em juvenis de pacu, ao contrário do observado em juvenis de truta arco-íris em que doses únicas de 30 mg.kg⁻¹ de MET foram capazes de bloquear o pico da cortisolemia induzida pelo exercício intenso (perseguição por 5 minutos) via endovenosa (PAGNOTTA et al., 1994; MILLIGAN, 2003). Nesta mesma espécie, doses menores (1 mg.kg⁻¹ PV) conseguiram inibir o aumento significativo da cortisolemia 30 min após exercício intenso e adensamento, porém diferença na glicemia não foi observada (DINDIA et al., 2013).

Diferenças fisiológicas entre as espécies e na temperatura da água dos citados experimentos podem ter alterado a farmacodinâmica e farmacocinética da MET. A temperatura da água possui efeitos profundos no metabolismo dos fármacos em peixes (TREVES-BROWN, 2000). O presente estudo foi realizado a 27°C e os estudos com truta arco-íris foram realizados a 12-15°C. Diferenças no protocolo experimental, tipo de estresse (perseguição contra exposição aérea) e anestésico utilizado (benzocaína contra MS-222 e 2-fenoxietanol) também poderiam explicar a

ineficácia da injeção única intracelomática para inibir a liberação de cortisol após estresse no pacu. Martínez-Porchas et al., (2009) fez uma revisão listando valores de cortisol espécie-específicos e estressor-específicos. Estes autores relataram variações nas respostas do cortisol decorrentes do tipo de anestésico e da temperatura da água. Destes dados conclui-se que variáveis como dose ou vias de administração tem papel fundamental no sucesso do efeito inibitório do fármaco.

O segundo protocolo testado, administração oral de MET por cinco dias e injeção intracelomática de 50 mg.kg⁻¹ de MET no sexto dia, não conseguiu inibir completamente a elevação da cortisolemia, porém a manteve em valores reduzidos em todos os tempos avaliados. As diferenças foram mais discretas na glicemia. Estes resultados corroboram com os relatados por Bennett e Rhodes, (1986), que utilizando doses de 30 e 40 mg.kg⁻¹ de MET na ração, três vezes por dia durante 7 dias, conseguiram diminuir significativamente os níveis basais do cortisol em trutas arco-íris. Os resultados também são similares aos descritos por Zanuzzo e Urbinati, (2015), em que a administração de 30 e 40 mg.kg⁻¹ de MET na ração por 10 dias inibiu o incremento na cortisolemia 30 min após exposição aérea por quatro minutos, no pacu. Porém, não houve efeito inibitório quando a droga foi administrada por apenas três ou sete dias. Outro experimento feito com matrinxãs relata diminuição significativa nos níveis basais de cortisol após suplementação com 30 mg.kg⁻¹ ração, durante 15 dias, porém não foi possível suprimir o aumento na cortisolemia 30 min após estresse agudo, nem 24h após inoculação com *A. hydrophila* (MONTTOYA et al., 2017). A diferença entre os protocolos supracitados é o reforço de MET via intracelomática, considerado no presente estudo, que poderia ter acrescentado o efeito inibidor imediato da MET.

A inoculação na bexiga natatória de *A. hydrophila* no pacu induziu a sepse e forte resposta imune-inflamatória, evidenciada pelas alterações clínicas, hematológicas e nos parâmetros da resposta imune avaliados. Pacus desafiados com *A. hydrophila* manifestaram elevação progressiva da cortisolemia, detectável uma hora após desafio (HAD), com valor máximo às 3 e 6 HAD e redução às 9 HAD, último tempo avaliado. O estresse é conhecido por provocar diversas respostas fisiológicas que ajudam o organismo na manutenção da homeostase. O aumento na concentração plasmática de cortisol em resposta ao estresse agudo é um desses exemplos (ACKERMAN; IWAMA, 2001). A cinética da liberação do cortisol após infecções bacterianas foi estudada anteriormente no pacu com resultados similares. Claudiano (2015) descreveu aumento significativo na cortisolemia 3 HAD e Pahor-

Filho et al., (2017) 1 HAD, em ambos casos com *A. hydrophila*. Por outro lado, Castro et al., (2014) reportaram aumento tardio na cortisolemia 24 após desafio com *A. hydrophila* inativada pelo calor, que explica a reação mais lenta quando comparada ao uso de bactéria viva.

O tempo de liberação máxima e a quantidade de cortisol liberada varia entre diferentes espécies de peixes e com o tipo de estímulo aplicado. Ackerman e Iwama, (2001) relatam incremento tardio no nível de cortisol, entre o quinto e oitavo dia após desafio com *Vibrio anguillarum*. Mesa et al. (1998) relataram aumento na cortisolemia durante a fase tardia da infecção por *Renibacterium salmoninarum* no salmão chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*. No entanto, Suzumoto et al. (1977) relataram diminuição no cortisol durante o desenvolvimento da mesma doença no salmão coho. Laidley et al. (1988) não observaram aumento significativo na cortisolemia em trutas arco-íris infectadas com o hemoflagelado *Cryptobia salmositica*. Rand e Cone (1990) também não observaram resposta do cortisol à infecção pelo fungo *Ichthyophonus hoferi*, em trutas arco-íris *O. mykiss*. O tempo da liberação máxima do cortisol após o desafio bacteriano coincide com os resultados descritos por Haukenes e Barton, (2004), que injetaram LPS de *Escherichia coli* via intracelomática em *Perca flavescens* e avaliaram a cinética da liberação de cortisol reportando incremento significativo a partir dos 90 minutos com valor máximo às 6h pós-inoculação, e normalização dos níveis 22h após-inoculação.

As endotoxinas modificam o eixo hipotálamo-hipófise-tecido inter-renal trazendo profundas alterações endócrinas. A exposição a LPS em peixes tem mostrado incrementar os níveis de CRH, ACTH, cortisol e modular a expressão de GR (MATHIEU et al., 2014). A *A. hydrophila* é uma bactéria Gram-negativa, com LPS na sua parede celular que interage fortemente com as células imunes do hospedeiro (PAKIET et al., 2017), fato que explica os efeitos observados na cortisolemia. O aumento transitório nas concentrações do cortisol plasmático é apenas uma característica de diversas mudanças fisiológicas associadas ao desafio com LPS em peixes. Os LPS também são responsáveis por alterações na imunidade celular e humoral, metabolismo dos carboidratos e lipídeos e mudanças nos parâmetros hematológicos (SWAIN et al., 2008).

A hiperglicemia imediata e transitória seguida de hipoglicemia observadas no presente estudo foi relatada anteriormente na mesma espécie em desafios com *A. hydrophila* (CLAUDIANO, 2015). Assim mesmo, os resultados coincidem com o observado em carpas, *Cyprinus carpio* que se mantiveram hipoglicêmicas até 30

dias após a inoculação intracelomática com *A. hydrophila* (HARIKRISHNAN et al., 2003). Porém, trutas injetadas com LPS não apresentaram diferenças na glicemia 24 e 72 HAD (MAGNONI et al., 2015). As diferenças podem ser produto da espécie, tempos de coleta, concentração do inóculo bacteriano, tipo de anestésico empregado e do modelo de desafio experimental (MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2009).

A glicemia aumentou significativamente 1 HAD em todos os grupos experimentais. No caso do grupo sem MET e desafiado com *A. hydrophila* este aumento pode ser produto do incremento significativo na cortisolemia. O cortisol estimula a liberação de glicose através da ativação da glicogenólise e gliconeogênese (MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2009).

No entanto, nos grupos suplementados, o aumento na glicemia não foi acompanhado por níveis elevados de cortisol, indicando que outros mecanismos hiperglicêmicos não relacionados ao cortisol estão envolvidos. Alguns autores consideram que casos de hiperglicemia sem alteração na cortisolemia podem ser explicados pelo efeito das catecolaminas (TRENZADO et al. 2006). As catecolaminas possuem efeitos hiperglicêmicos conhecidos em teleósteos (EPPLE; NIBBIO, 1985). Estas moléculas promovem a fosforilação da enzima glicogênio fosforilase que resulta em aumento de glicogenólise (VIJAYAN; MOON, 1992). Finalmente a medição da glicemia frequentemente apresenta inconsistências, e deve ser um complemento de testes de estresse ao invés de um parâmetro primário (MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2009).

Os parâmetros hematológicos são importantes indicadores do estado imunológico e fisiológico dos peixes, e ajudam no monitoramento de alterações por fatores, como estresse, infecção, nutrição, suplementação com nutracêuticos e condições ambientais e poluição (YARAHMADI et al., 2016). No entanto, não houve maiores alterações na série vermelha produto da infecção ou da aplicação da MET. Estes resultados coincidem com os descritos em outras pesquisas para a mesma espécie e a mesma bactéria até 9 HAD (YUNIS-AGUINAGA, 2017). Reque et al., (2010) também não conseguiram identificar alterações hematológicas evidentes até 6 HAD com *A. hydrophila* inativada, em tilápias do Nilo.

Neste estudo constatou-se que a diminuição no número de leucócitos e linfócitos na fase inicial da inflamação por *A. hydrophila* está associada com a elevação marcada do cortisol, uma vez que o grupo desafiado com a bactéria e suplementado com a MET apresentou resultado antagônico ao observado no grupo

desafiado não suplementado. Pulsford et al., (1994) descreveram também diminuição do número de linfócitos e trombócitos após estresse agudo *Limanda limanda*. Reque et al., 2010 sugeriram que a diminuição significativa no número total de leucócitos, principalmente de neutrófilos e monócitos circulantes 6 HAD com *A. hydrophila* no pacu poderia ser resultado do incremento dos níveis de corticosteroides endógenos plasmáticos. Não obstante, os resultados contradizem os reportados por Montoya et al., (2017) sobre o aumento no número de monócitos diretamente associado aos níveis altos de cortisol.

Pacus desafiados com *A. hydrophila* evidenciaram queda na atividade respiratória dos fagócitos sanguíneos. O grupo com MET e desafiado com a bactéria apresentou valores maiores às 3 e 6 HAD quando comparado ao grupo sem MET e desafiado com a bactéria, o que permite concluir que a queda neste parâmetro está relacionada aos altos níveis de cortisol. Estes dados corroboram o efeito negativo *in vitro* da incubação de leucócitos do rim cranial, com cortisol na atividade respiratória de *Spaurus aurata* (ESTEBAN et al., 2004). Por outro lado, os resultados diferem com os descritos por Soares et al., (2018) para o aumento significativo na atividade respiratória dos fagócitos sanguíneos 3 HAD com *A. hydrophila* no pacu. No entanto, no citado experimento não foi observado aumento significativo na cortisolemia, provavelmente pela baixa dose do inóculo (1×10^6 UFC/mL⁻¹) ou devido às diferenças na patogenicidade da cepa utilizada. Este fato poderia explicar o efeito oposto de aumento na atividade respiratória dos leucócitos.

Não foram observadas alterações significativas na atividade da lisozima plasmática em nenhum dos grupos experimentais. Yunis-Aguinaga, (2017) também reportou ausência de alterações evidentes neste parâmetro na fase inicial da infecção com *A. hydrophila* no pacu. Não obstante, utilizando modelo de infecção similar, Soares et al., (2018) descreveram aumento significativo na atividade da lisozima sérica 3 HAD. Por outro lado, incrementos tardios na atividade da lisozima sérica decorrentes da suplementação com cortisol exógeno via implante foram descritos em trutas arco-íris (CORTÉS et al., 2013), indicando efeito do cortisol sob este parâmetro. Nesse sentido, Montoya et al., (2017) reportaram efeitos favoráveis na atividade da lisozima sérica associados à exposição aguda ao cortisol.

Em trutas arco-íris suplementadas com prebióticos a melhora dos parâmetros imunológicos como atividade da lisozima, atividade do sistema complemento e de enzimas antioxidantes foi acompanhada pela diminuição na cortisolemia três semanas após o desafio com *A. hydrophila*. Porém, não foi determinada uma

associação causa-efeito entre ambas variáveis (YARAHMADI et al., 2016). Montoya et al., (2017) determinaram em matrinxãs que a hipercortisolemia, induzida pela suplementação com β -glucano, aumentou significativamente o número de monócitos circulantes e a atividade da lisozima sérica. Baixos níveis de estresse podem induzir melhora do sistema imune, enquanto eventos mais severos tendem a ser imunossupressores (YADA; TORT, 2016), que podem explicar que ambos efeitos pró ou anti-inflamatórios estejam associados ao cortisol.

Acredita-se que respostas de estresse aos desafios, como o aumento na cortisolemia sejam necessários para a manutenção da homeostase (SEYLE, 1973). Entretanto, os corticosteroides são classicamente considerados como imunossupressores (YADA; TORT, 2016), razão pela qual respostas de hipercortisolemia marcadas durante processos infecciosos poderiam ser interpretadas como prejudiciais comprometendo a capacidade do peixe para combater a infecção (ELLIS et al., 2007). Todavia, existe uma hipótese na qual considera-se a resposta dos corticosteroides como "pró-adaptativa", e que o papel de cortisol é suprimir e moderar a resposta de defesa, para assim impedir possíveis danos colaterais.

VIII. CONCLUSÃO

A hipercortisolemia induzida na fase inicial após desafio experimental com *A. hydrophila* no pacu é responsável por alterações na resposta imune inibindo alguns parâmetros hematológicos e imunológicos. O bloqueio farmacológico com MET foi capaz de incrementar a quantidade de linfócitos e leucócitos totais no sangue, incrementar a atividade respiratória dos fagócitos sanguíneos e a atividade lítica do plasma.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. ABDOLLAHI, R.; HEIDARI, B.; AGHAMAAALI, M. Evaluation of lysozyme, complement C3, and total protein in different developmental stages of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum* K.). **Archives of Polish Fisheries**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2016.
2. ABIMORAD, E. G.; DUCATTI, C.; CASTELLANI, D.; JOMORI, R. K.; PORTELLA, M. C.; SARTORI, M. M. P.; CARNEIRO, D. J. Dietary lysine

- deficiency increases the incorporation rate of nitrogen-free compounds in muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v. 479, p. 522-527, 2017.
3. ACERETE, L.; BALASCH, J. C.; CASTELLANA, B.; REDRUELLO, B.; ROHER, N.; CANARIO, A. V.; PLANAS, J. V.; MACKENZIE, S.; TORT, L. Cloning of the glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*): differential expression of GR and immune genes in gilthead seabream after an immune challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, n. 1, p. 32-43, 2007.
 4. ACKERMAN, P. A.; IWAMA, G. K. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, n. 2, p. 173-180, 2001.
 5. ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, n. 1, p.593-623, 1999.
 6. ALEJO, A.; TAFALLA, C. Chemokines in teleost fish species. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1215-1222, 2011.
 7. BAITHARU, I.; DEEP, S. N.; JAIN, V.; BARHWAL, K.; MALHOTRA, A. S.; HOTA, S. K.; PRASAD, D.; ILAVAZHAGAN, G. Corticosterone synthesis inhibitor metyrapone ameliorates chronic hypobaric hypoxia induced memory impairment in rat. **Behavioral Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 53-65, 2012.
 8. BENNETT, R. O.; RHODES, R. C. Evaluation of oral administration of cortisol and metyrapone: the effects on serum cortisol in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 83, n. 4, p. 727-730, 1986.
 9. BENNETT, E.; THORPE, A. Review of river fisheries valuation in Central and South America. In: NEILAND, A. E.; BÉNÉ, C. (Eds.). **Tropical river fisheries valuation: background papers to a global synthesis**. Penang, Malásia: WorldFish Center, p. 1-46, 2008.
 10. BOLTAÑA, S.; ROHER, N.; GOETZ, F. W.; MACKENZIE, S. A. PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1195-1203, 2011.
 11. BORCHARDT, M. A.; STEMPER, M. E.; STANDRIDGE, J. H. Aeromonas isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 224-228, 2003.
 12. BORTOLUZZI, N. L.; CASTRO, M. P.; SILVA, C. G.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVA-QUIROZ, V. A.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Cicatrização

- cutânea em *Piaractus mesopotamicus* suplementados com carboquelato de cromo e *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 178-187, 2017.
13. BOWDEN, T. Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 373-383, 2008.
14. BROADLEY, A. J.; KORSZUN, A.; ABDELAAL, E.; MOSKVINA, V.; JONES, C. J.; NASH, G. B.; CLARE, R.; DEANFIELD, J.; FRENNEAUX, M. P. Inhibition of cortisol production with metyrapone prevents mental stress-induced endothelial dysfunction and baroreflex impairment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 46, n. 2, p. 344-350, 2005.
15. BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1033–1036, 1991.
16. CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO-NETO, G. J.; MORAES, F. R.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER-NETO, A.; BORTOLUZZI, N. L. Evaluation of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887). **International Journal of Fisheries and Aquaculture**, n. 4, n. 5, p. 81-84, 2012.
17. CASTRO, M. P.; CLAUDIANO, G. S.; BORTOLUZZI, N. L.; GARRIDO, E.; FUJIMOTO, R. Y.; BELO, M. A. A.; SHIMADA, M. T.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Chromium carbochelate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 432, p. 114-118, 2014.
18. CASTRO, R.; TAFALLA, C. Overview of fish immunity. In: BECK, B. H.; PEATMAN, E. (Ed.). **Mucosal Health in Aquaculture**, Oxford, UK: Academic Press, 2015, p. 3-54.
19. CHABBI, A.; GANESH, C. B. Glucocorticoid synthesis inhibitor metyrapone blocks stress-induced suppression along luteinizing hormone secreting cells–ovary axis in the fish *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 321, n. 3, p. 125-134, 2014.
20. CLAUDIANO, G. S. **Aspectos da fisiopatologia da sepse em *Piaractus mesopotamicus* induzida por *Aeromonas hydrophila***. 94 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

21. CLAUDIANO, G. S.; FERNANDES, D. C.; ETO, E. F.; SHIMADA M. T.; MANRIQUE, W. G.; AGUINAGA, Y. J.; SALVADOR R.; MORAES, J. R. E.; MORAES F. R. Evaluation LD50 (LD (i) (50-96h)) and first report of neurophatological in *Piaractus mesopotamicus* inoculated with different concentration of *Aeromonas hydrophila*. In: **World Aquaculture Society**, Adelaide, Australia. Anais. 2014.
22. CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; MANRIQUE, W. G.; MARCUSSO, P. F.; CASTRO, M. P.; LOUREIRO, B. A.; BELO, M. A. A.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 5, p. 1057-1062, 2013.
23. COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, n. 50, v. 6, p. 550-552, 1944.
24. CORTÉS, R.; TELES, M.; TRIDICO, R.; ACERETE, L.; TORT, L. Effects of cortisol administered through slow-release implants on innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Genomics**, v. 2013, 7 p., 2013.
25. COSTA, A. A.; LEEF, M. J.; BRIDLE, A. R.; CARSON, J.; NOWAK, B. F. Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture**, v. 315, n. 3-4, p. 201-206, 2011.
26. COSTA, J. C.; VALLADÃO, G. M. R.; PALA, G.; GALLANI, S. U.; KOTZENT, S.; CROTTI, A. E. M.; FRACAROLLI, L.; SILVA, J. J. M.; PILARSKI, F. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 471, p. 72-79, 2017.
27. CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: TecArte, 2004, 533 p.
28. DANIEL, E.; et al. Effectiveness of metyrapone in treating Cushing's Syndrome: a retrospective multicenter study in 195 patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 11, p. 4146-4154, 2015.
29. DINDIA, L.; FAUGHT, E.; LEONENKO, Z.; THOMAS, R.; VIJAYAN, M. M. Rapid cortisol signaling in response to acute stress involves changes in plasma membrane order in rainbow trout liver. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 11, p. E1157-E1166, 2013.

30. DIXON, B.; STET, R. J. M. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 683-699, 2001.
31. DOYON, C.; LECLAIR, J.; TRUDEAU, V. L.; MOON, T. W. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are modified by glucocorticoids in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 146, n. 2, 126-135, 2006.
32. ENGELSMA, M. Y.; HUISING, M. O.; VAN MUISWINKEL, W. B.; FLIK, G.; KWANG, J.; SAVELKOUL, H. F.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. L. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3, p. 467-479, 2002.
33. EL-ASELY, A. M.; ABBASS, A. A.; AUSTIN, B. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 2, p. 500-506, 2014.
34. ELLIS, A. E. Lysozyme assays. In STOLEN, J. S.; Fletcher, T. C.; ROWLEY, A. F. (Eds.). SOS publications. **Techniques in fish immunology**, 1990, p. 101-103
35. ELLIS, T.; BAGWELL, N.; POND, M.; BAYNES, S.; SCOTT, A. P. Acute viral and bacterial infections elevate water cortisol concentrations in fish tanks. **Aquaculture**, v. 272, n. 1, p. 707-716, 2007.
36. EPPLE, A.; NIBBIO, B. Catecholaminotropic effects of catecholamines in a teleost fish, *Anguilla rostrata*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 155, n. 3, p. 285-290, 1985.
37. ESTEBAN, M. A. An overview of the immunological defenses in fish skin. **ISRN Immunology**, v. 2012, ID 853470, 29 p. 2012.
38. ESTEBAN, M. A.; RODRIGUEZ, A.; AYALA, A. G.; MESEGUER, J. Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream (*Sparus aurata* L.). **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 89-98, 2004.
39. FARIAS, T. H. V.; LEVY-PEREIRA, N.; ALVES, L. O.; DIAS, D. C.; TACHIBANA, L.; PILARSKI, F.; BELO, M. A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 137-144, 2016.

40. FISCHER, U.; KOPPANG, E. O.; NAKANISHI, T. Teleost T and NK cell immunity. **Fish & Shellfish immunology**, v. 35, n. 2, p. 197-206, 2013.
41. FISCHER, U.; UTKE, K.; SOMAMOTO, T.; KÖLLNER, B.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T. Cytotoxic activities of fish leucocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 209-226, 2006.
42. FLORY, C. M. Autonomic innervation of the spleen of the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: a histochemical demonstration and preliminar assessment of its immunoregulatory role. **Brain Behavioural Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331–344, 1989.
43. FORLENZA, M.; SCHARSACK, J. P.; KACHAMAKOVA, N. M.; TAVERNE-THIELE, A. J.; ROMBOUT, J. H. W. M.; WIEGERTJES, G. F. Differential contribution of neutrophilic granulocytes and macrophages to nitrosative stress in a host-parasite animal model. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 11, p. 3178–3189, 2008.
44. FRYER, J. N.; LEDERIS, K. Control of corticotropin secretion in teleost fishes. **American Zoologist**, v. 26, n. 4, p. 1017-1026, 1986.
45. GARCIA, F.; MORAES, F. R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 17-21, 2009.
46. GARCÍA-GARCÍA, L.; SHIHA, A. A.; ROSA, R. F. DE LA; DELGADO, M.; SILVÁN, Á.; BASCUÑANA, P.; BANKSTAHL, J. P.; GÓMEZ, F.; POZO, M. A. Metyrapone prevents brain damage induced by status epilepticus in the rat lithium-pilocarpine model. **Neuropharmacology**, v. 123, n. 1, p. 261-273, 2017.
47. GAZOLA, R.; BORELA, M. I.; DONALDSON, E. M.; VAL-SELLA, M. V.; SUKUMASAVIN, N.; FAVA-DE-MORAES, F.; BERNARDINO, G. Plasma steroid and corticosteroid levels in female pacu *Piaractus mesopotamicus*, Teleostei-Characidae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 5, p. 659-664, 1996.
48. GOEDERS, N. E.; GUERIN, G. F.; SCHMOUTZ, C. D. The combination of metyrapone and oxazepam for the treatment of cocaine and other drug addictions. In: DWOSKIN, L. P.; ENNA, S. J.; LECOUNT, L. (Ed.) **Advances in Pharmacology: Emerging targets & therapeutics in the treatment of pschyhostimulant abuse**. San Diego, USA: Academic Press, 2014, p 419-479.
49. GOIKOETXEA, A.; TODD, E. V.; GEMMELL, N. J. Stress and sex: does cortisol mediate sex change in fish? **Reproduction**, v. 154, n. 6, p. R149-R160, 2017.

50. GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.
51. GÓMEZ-ABELLÁN, V.; SEPULCRE, M. P. The role of prostaglandins in the regulation of fish immunity. **Molecular Immunology**, v. 69, p. 139-145, 2016.
52. GRANT, K. R. Fish hematology and associated disorders. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 83-103, 2015.
53. GRAYFER, L.; WALSH, J.G.; BELOSEVIC, M. Characterization and functional analysis of goldfish *Carassius auratus* tumor necrosis factor-alpha. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 5, p. 532–543, 2008.
54. GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon gamma. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 2, p. 235–246, 2009.
55. GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. Cytokine regulation of teleost inflammatory responses. In TURKER, H. (Ed.) **New Advances and Contributions to Fish Biology**. InTech, 2012.
56. GRAYFER, L.; HANINGTON, P.C.; BELOSEVIC, M. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) induces pro-inflammatory gene expression and enhances antimicrobial responses of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, 406–413, 2009.
57. HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays **Environmental Science & Technology**, v. 10, n. 7, p. 714–719, 1977.
58. HAOND, C.; NOLAN, D. T.; RUANE, N. M.; ROTLLANT, J.; BONGA, S. W. Cortisol influences the host–parasite interaction between the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the crustacean ectoparasite *Argulus japonicus*. **Parasitology**, v. 127, n. 6, p. 551-560, 2003.
59. HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 13, n. 4, p. 281-320, 2005.
60. HARIKRISHNAN, R.; RANI, M. N.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v. 221, n. 1, 41-50, 2003.

61. HARUN, N. O.; ZOU, J.; ZHANG, Y. A.; NIE, P.; SECOMBES, C. J. The biological effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant interleukin-8. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 6, p. 673–681, 2008.
62. HARRIS, J.; BIRD, D. J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 3, p. 163-176, 2000.
63. HAUKENES, A. H.; BARTON, B. A. Characterization of the cortisol response following an acute challenge with lipopolysaccharide in yellow perch and the influence of rearing density. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 4, p. 851-862, 2004.
64. HAVIXBECK, J. J.; BARREDA, D. R. Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. **Biology**, v. 4, n. 4, p. 715-734, 2015.
65. HAVIXBECK, J. J.; RIEGER, A. M.; WONG, M. E.; HODGKINSON, J. W.; BARREDA, D. R. Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 2, p. 241-252, 2016.
66. HAVIXBECK, J. J.; RIEGER, A. M.; CHURCHILL, L. J.; BARREDA, D. R. Neutrophils exert protection in early *Aeromonas veronii* infections through the clearance of both bacteria and dying macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 63, p. 18-30, 2017.
67. HELAL, R.; MELZIG, M. F. Determination of lysozyme activity by a fluorescence technique in comparison with the classical turbidity assay. **Pharmazie**, v. 63, n. 6, p. 415-419, 2008.
68. HENRY, K. M.; LOYNES, C. A.; WHYTE, M. K.; RENSHAW, S. A. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 633-642, 2013.
69. HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, n. 2, p. 79-98, 1992.
70. HOLLAND, J. W.; GOULD, C. R. W.; JONES, C. S.; NOBLE, L. R.; SECOMBES, C. J. The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during a natural outbreak of proliferative kidney disease (PKD). **Parasitology**, v. 126, n. 7, p. S95-S102, 2003.
71. JENKINS, J. S.; MEAKIN, J. W.; NELSON, D. H.; THORN, G. W. Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. **Science**, v. 128, n. 3322, p. 478–480, 1958.

72. JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1, p. 277-287, 2003.
73. KIME, D. E. 1987. The steroids. In: CHESTER-JONES, I.; INGLETON, P.; PHILLIPS, J. G. (Eds.). **Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology**. New York: Plenum Press, 1987, p. 3-56.
74. KURADOMI, R. Y.; SOUZA, T. G. DE; FORESTI, F.; SCHULZ, R. W.; BOGERD, J.; MOREIRA, R. G.; FURLAN, L. R.; ALMEIDA, E. A.; MASHIO, L. R.; BATLOUNI, S. R. Effects of re-stripping on the seminal characteristics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the breeding season. **General and Comparative Endocrinology**, v. 225, p. 162-173, 2016.
75. KABLINGER, A. S.; LINDNER, M. A.; CASSO, S.; HEFTI, F.; DEMUTH, G.; FOX, B. S.; MCNAI, L. A.; MCCARTHY, B. G.; GOEDERS, N. E. Effects of the combination of metyrapone and oxazepam on cocaine craving and cocaine taking: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 7, p. 973-981, 2012.
76. KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 111-133, 2012.
77. KOBERSTEIN, T. C. R. D.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Comportamento alimentar de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) por meio das observações do tempo de retorno do apetite e do tempo de saciação dos peixes em duas temperaturas. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v. 26, n. 3, p. 339-344, 2004.
78. KOPPANG, E. O.; FISCHER, U.; SATOH, M.; JIRILLO, E. Inflammation in fish as seen from a morphological point of view with special reference to the vascular compartment. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 36, p. 3649-3655, 2007.
79. LAIDLEY, C. W.; WOO, P. T. K.; LEATHERLAND, J. F. The stress-response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. **Journal of Fish Biology**, v. 32, n. 2, p. 253-261, 1988.
80. LEACH, G. J.; TAYLOR, M. H. The effects of cortisol treatment on carbohydrate and protein metabolism in *Fundulus heteroclitus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 48, n. 1, p. 76-83, 1982.

81. LEE, Y. C.; YANG, D. Determination of lysozyme activities in a microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 223-224, 2002.
82. LI, J.; BARREDA, D.R.; ZHANG, Y.A.; BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; LAPATRA, S.; TORT, L.; SUNYER, J.O. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. **Nature Immunology**, v. 7, n. 10, p. 1116–1124, 2006.
83. LIESCHKE, G. J.; OATES, A. C.; CROWHURST, M. O.; WARD, A. C.; LAYTON, J. E. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. **Blood**, v. 98, n. 10, p. 3087-3096, 2001.
84. LUGO-VILLARINO, G.; BALLA, K. M.; STACHURA, D. L.; BAÑUELOS, K; WERNECK, M. B.; TRAVER, D. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 36, p. 15850-15855, 2010.
85. MACKENZIE, S.; ILIEV, D.; LIARTE, C.; KOSKINEN, H.; PLANAS, J. V.; GOETZ, F. W.; KRASNOV, A.; TORT, L. Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 9, p. 1340-1348, 2006.
86. MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.
87. MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Journal of Marine Biotechnology** v. 12, p. 361–379, 2010.
88. MAGNONI, L. J.; ROHER, N.; CRESPO, D.; KRASNOV, A.; PLANAS, J. V. In Vivo Molecular Responses of Fast and Slow Muscle Fibers to Lipopolysaccharide in a Teleost Fish, the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biology**, v. 4, n. 1, p. 67-87, 2015.
89. MANRIQUE, W. G.; CLAUDIANO, G. S.; CASTRO, M. P.; PETRILLO, T. R.; FIGUEIREDO, M. A. P.; BELO, M. A. A.; BERDEL, M. I. Q.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Expression of cellular components in granulomatous inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus* model. **PloS one**, v. 10, n. 3, e0121625, 2015.
90. MATHIAS, J. R.; PERRIN, B. J.; LIU, T. X.; KANKI, J.; LOOK, A. T.; HUTTENLOCHER, A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of

- neutrophils in transgenic zebrafish. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1281–1288, 2006.
91. MARTIN, P.; FENG, Y. Inflammation: Wound healing in zebrafish. **Nature**, v. 459, p. 921-923, 2009.
 92. MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MARTÍNEZ-CORDOVA, L. R.; RAMOS-ENRIQUEZ, R. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 2, p. 158-178, 2009.
 93. MATHIEU, C.; MILLA, S.; MANDIKI, S. N. M.; DOUXFILS, J.; DOUNY, C.; SCIPPO, M. L.; PAUWN, E. DE; KESTEMONT, P. First evidence of the possible implication of the 11-deoxycorticosterone (DOC) in immune activity of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.): Comparison with cortisol. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 165, n. 2, p. 149-158, 2013.
 94. MATHIEU, C.; MILLA, S.; MANDIKI, S. N. M.; DOUXFILS, J.; KESTEMONT, P. In vivo response of some immune and endocrine variables to LPS in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) and modulation of this response by two corticosteroids, cortisol and 11-deoxycorticosterone. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 167, p. 25-34, 2014.
 95. MAULE, A. G.; SCHRECK, C. B. Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 2, n. 4, p. 298-304, 1990.
 96. MCALLISTER-WILLIAMS, R. H., et al. Antidepressant augmentation with metyrapone for treatment-resistant depression (the ADD study): a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 117-127, 2016.
 97. MCCORMICK, S. D. Hormonal control of metabolism and ionic regulation | The hormonal control of osmoregulation in teleost fish. In FARRELL, A. P. (Ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, Vol. 2, Oxford: Academic Press, 2011, p 1466-1473.
 98. MESA, M. G.; POE, T. P.; MAULE, A. G.; SCHRECK, C. B. Vulnerability to predation and physiological stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) experimentally infected *Renibacterium salmoninarum*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, n. 7, p. 599–1606, 1998.

99. MILLIGAN, C. L. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 18, p. 3167-3173, 2003.
100. MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211-268, 1999.
101. MONTOYA, L. N. F.; MARTINS, T. P.; GIMBO, R. Y.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. β -Glucan-induced cortisol levels improve the early immune response in matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 60, p. 197-204, 2017.
102. MORAES, J. R. E.; IWASHITA, M. K. P.; OZÓRIO, R. O. A.; REMA, P.; MORAES, F. R. Influence of vitamin E supplementation on dermal wound healing in Tilapia, *Oreochromis niloticus*. In: Carlo, F. DE; Bassano, A. (Ed.). **Freshwater ecosystems and aquaculture research**. New York: Nova Science, 2010, p. 177-192.
103. NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **ILAR J.** v. 50, n. 4, p. 343-360, 2009.
104. NEUMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A. J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 8, p. 807-825, 2001.
105. NIGAM, A. K.; KUMARI, U.; MITTAL, S.; MITTAL, A. K. Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1245-1256, 2012.
106. OLABUENAGA, S. E. Sistema inmune en peces. **Gayana (Concepción)**, v. 64, n. 2, p. 205-215, 2000.
107. OLIVEIRA, S.; REYES-ALDASORO, C. C.; CANDEL, S.; RENSHAW, S. A.; MULERO, V.; CALADO, A. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 4349–4359, 2013.
108. ØVERLAND, H. S.; PETTERSEN, E. F.; RØNNESETH, A.; WERGELAND, H. I. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and

- Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 193-204, 2010.
109. PAGNOTTA, A.; BROOKS, L.; MILLIGAN, L. The potential regulatory roles of cortisol in recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 12, p. 2136-2146, 1994.
 110. PAHOR-FILHO, E.; CASTILLO, A. S. C.; PEREIRA, N. L.; PILARSKI, F.; URBINATI, E. C. Levamisole enhances the innate immune response and prevents increased cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 65, p. 96-102, 2017.
 111. PAKIET, K.; TURSKA-SZEWCZUK, A.; KARAS, M. A.; PEKALA, A.; PIETRAS, H. Structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Aeromonas hydrophila* strain K691 containing 4-acetamido-4, 6-dideoxy-d-glucose. **Carbohydrate Research**, v. 439, p. 23-29, 2017.
 112. PALIĆ, D.; ANDREASEN, C. B.; MENZEL, B. W.; ROTH, J. A. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, n. 3, p. 217-227, 2005.
 113. PERUZZO, D. C.; BENATTI, B. B.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S.; CASATI, M. Z. NOCITI, F. H. Evidence that metyrapone in the presence of inflammation modulates cytokine mRNA expression. **Cytokine**, v. 52, n. 3, p. 184-189, 2010.
 114. PORTELLA, M. C.; JOMORI, R. K.; LEITÃO, N. J.; MENOSSI, O. C. C.; FREITAS, T. M.; KOJIMA, J. T.; LOPES, T. S.; CLAVIJO-AYALA, J. A.; CARNEIRO, D. J. Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review. **Aquaculture**, v. 432, n. 20, p. 402-417, 2014.
 115. PRUNET, P.; STURM, A.; MILLA, S. Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 17-23, 2006.
 116. PULSFORD, A. L.; LEMAIRE-GONY, S.; TOMLINSON, M.; COLLINGWOOD, N.; GLYNN, P. J. Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 109, n. 2, p. gomez129-139, 1994.

117. RAND, T. G.; CONE, D. K. Effects of *Ichthyophonus hoferi* on condition indices and blood chemistry of experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 3, p. 323-328, 1990.
118. RAUTA, P. R.; NAYAK, B.; DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. **Immunology Letters**, v. 148, n. 1, p. 23-33, 2012.
119. REQUE, V. R.; MORAES, J. R. E.; BELO, M. A. A.; MORAES, F. R. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture**, v. 300, n. 1, p. 37-42, 2010.
120. RIEGER, A. M.; HALL, B. E.; BARREDA, D. R. Macrophage activation differentially modulates particle binding, phagocytosis and downstream antimicrobial mechanisms. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 11, p. 1144-1159, 2010.
121. RIEGER, A. M.; BARREDA, D. R. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1238-1245, 2011.
122. RODELA, T. M.; ESBAUGH, A. J.; MCDONALD, M. D.; GILMOUR, K. M.; WALSH, P. J. Evidence for transcriptional regulation of the urea transporter in the gill of the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 160, n. 2, p. 72-80, 2011.
123. ROTLLANT, D.; ARMARIO, A. A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. **Neuroscience**, v. 130, n. 2, p. 427-434, 2005.
124. ROY, B.; RAI, U. Role of adrenoceptor-coupled second messenger system in sympatho-adrenomedullary modulation of splenic macrophage functions in live fish *Channa punctatus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, n. 2, p. 298–306, 2008.
125. SAEIJ, J. P. J.; VERBURG-VAN KEMENADE, L. B. M.; VAN MUISWINKEL, W. B.; WIEGERTJES, G. F. Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: in vitro modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, n. 3, p. 233–245, 2003.

126. SAHOO, P. K.; KUMARI, JAYA; MISHRA, B. K. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, n. 2, p. 151-155, 2005.
127. SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.
128. SCHTEINGART, D. E. Drugs in the medical treatment of Cushing's syndrome. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 14, n. 4, p. 661-671, 2009.
129. SECOMBES, C. J.; ELLIS, A. E. The immunology of teleosts. In ROBERTS, R. J. (Ed.). **Fish Pathology**, 4^{ta} ed. Oxford: Wiley-Blackwell 2012, p 144-166.
130. SEYLE, H. The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. **American Scientist**, v. 61, n. 6, p. 692-699, 1973.
131. SHIBATT, O. A.; DIAS, J. H. P. **40 peixes do Brasil: CESP 40 anos**. Rio de Janeiro: Dois, p. 78-79, 2006.
132. SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* × *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 6, p. 908-916, 2012.
133. SOARES, M. P.; OLIVEIRA, F. C.; CARDOSO, I. L.; URBINATI, E. C.; CAMPOS, C. M.; HISANO, H. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 133-140, 2018.
134. SOUZA, V. L.; URBINATI, E. C.; MARTINS, M. I. E. G.; SILVA, P. C. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 19-28, 2003.
135. STOLTE, E. H.; VAN KEMENADE, B. L. V.; SVELKOU, H. F.; FLIK, G. Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. **Journal of Endocrinology**, v. 190, n. 1, p. 17-28, 2006.
136. STOLTE, E. H.; NABUURS, S. B.; BURY, N. R.; STURM, A.; FLIK, G.; SVELKOU, H. F.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. L. Stress and innate immunity in carp: corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 1, p. 70-79, 2008.

137. STOLTE, E. H.; CHADZINSKA, M.; PRZYBYLSKA, D.; FLIK, G.; SVELKOU, H. F.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. L. The immune response differentially regulates Hsp70 and glucocorticoid receptor expression in vitro and in vivo in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 1, 9-16, 2009.
138. SUZUMOTO, B. K.; SCHRECK, C. B.; MCINTYRE, J. D. Relative resistances of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 34, n. 1, p. 1–8, 1977.
139. SWAIN, P.; NAYAK, S. K.; NANDA, P. K.; DASH, S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 3, p. 191-201, 2008.
140. TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.
141. TRENZADO, C. E.; CARRICK, T. R.; POTTINGER, T. G. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. **General and Comparative Endocrinology**, v. 133, n. 3, p. 332-340, 2003.
142. TREVES-BROWN, K. M. **Applied Fish Pharmacology**, Aquaculture Series 3. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, 308 p.
143. TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor **Annals of clinical Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 24-27, 1969.
144. TRIPATHI, G.; VERMA, P. Pathway-specific response to cortisol in the metabolism of catfish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 3, p. 463-471, 2003.
145. URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486-503, 2011.
146. VAN DER AA, L. M.; CHADZINSKA, M.; TIJHAAR, E.; BOUDINOT, P.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L. CXCL8 chemokines in teleost fish: Two lineages with distinct expression profiles during early phases of inflammation. **PLoS ONE**, 5, n. 8, e12384, 2010.
147. VAN DER BOON, J.; VAN DEN THILLART, G. E.; ADDINK, A. D. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. **Comparative**

- Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 100, n. 1, p. 47-53, 1991.
148. VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L.; STOLTE, E. H.; METZ, J. R.; CHADZINSKA, M. Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish. In **Fish physiology**. London: Academic Press. Volume 28. 2009, p.3 13-364.
149. VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L.; RIBEIRO, C. M. S.; CHADZINSKA, M. Neuroendocrine-immune interaction in fish: differential regulation of phagocyte activity by neuroendocrine factors. **General and Comparative Endocrinology**, v. 172, n. 1, p. 31-38, 2011.
150. VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 49, n. 11, p. 2260- 2266, 1992.
151. WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS 222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 27, n. 5, p. 909-914, 1970.
152. WEYTS, F. A. A.; FLIK, G.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 22, n. 5, p. 563-572, 1998.
153. WIEGERTJES, G. F.; FORLENZA, M. Nitrosative stress during infection-induced inflammation in fish: lessons from a host-parasite infection model. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 38, p. 4194-4202, 2010.
154. WINTROBE, M. M. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologie**, v. 51, p. 32-49, 1934.
155. YADA, T.; NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune systems in fish. In KWANG, W. J. (Ed.). **International Review of Cytology** Vol. 220. Academic Press. 2002, p. 35-92.
156. YADA, T.; TORT, L. Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions. In Schreck, C. B.; Tort, L.; Farrell, A. P.; Brauner, C. J. **Fish Physiology** Vol. 35. Academic Press. 2016, p. 365-403.
157. YAMAGUCHI, T.; YOSHINAGA, N.; YAZAWA, T.; GEN, K.; KITANO, T. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3900-3908, 2010.
158. YUNIS-AGUINAGA, J. Tese de Doutorado (Aquicultura). **Caracterização fisiopatológica da infecção por *Aeromonas hydrophila* em peixes**

diabéticos. Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2017.

159. YARAHMADI, P.; FARSANI, H. G.; KHAZAEI, A.; KHODADADI, M.; RASHIDIYAN, G.; JALALI, M. A. Protective effects of the prebiotic on the immunological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 54, p. 589-597, 2016.
160. ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. Dietary metyrapone blocks cortisol synthesis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), stressed by air exposure. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, n. 6, p. 1093-1095, 2015.