

DESAFIOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO E *S. agalatae* MODULAM VARIÁVEIS

HEMATOLÓGICAS EM TILÁPIA *Oreochromis niloticus**

Basia Schlichting MOROMIZATO¹, Ana Paula SIDEKERSKIS¹, André Fernando Nascimento GONÇALVES², Thais Daltoso da SILVA³, Ingrid Camargo dos REIS¹, Jaqueline Dalbello BILLER¹

¹ Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Câmpus de Dracena. Rod. Cmt. João Ribeiro de Barros, km 651, 17900-000, Dracena-SP/Brasil.

² Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias. Lages- SC/Brasil.

³ Universidade Estadual Paulista (Unesp), Centro de Aquicultura, Câmpus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal-SP/Brasil.

*Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº2016/21443-6

Palavras chave: Hematologia; LPS; imunomodulador, peixe

INTRODUÇÃO

Os lipopolissacarídeos (LPS), componentes estruturais da parede celular de bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas, são considerados endotoxinas. Estas moléculas são liberadas após a destruição das bactérias e são capazes de causar respostas imunológicas potentes, tais como respostas inatas pró-inflamatórias (MORRISON E RYAN, 1987). O LPS é detectado pelo sistema imune inato dos peixes através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, e inicia respostas comumente associadas a infecção por bactérias Gram-negativas, como respostas sistêmicas e com liberação de citocinas pró-inflamatórias, sendo muito estudado por seus efeitos imunomoduladores (SUCHECKA *et al.*, 2015; HA *et al.*, 2017).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta alta taxa de crescimento específico, baixo nível trófico, adaptabilidade às mudanças do ambiente, entre outros e como consequência é uma das espécies mais cultivadas no Brasil (ELSAYED, 2006). O objetivo desse estudo foi avaliar o uso do LPS como alternativa ao uso de microrganismos vivos, bem como avaliar a resposta hematológica em tilápias desafiadas com diversas concentrações de LPS e por *Streptococcus agalatae*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de aquicultura, metabolismo animal e laboratório de química e bioquímica da faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da

UNESP campus de Dracena. Foram utilizados 288 juvenis de tilápia, com peso médio 50g adquiridas em propriedades da região, divididos em 24 caixas de polietileno (100L) (12 peixes por caixa) dispostas num sistema de circulação aberto com renovação contínua e aeração forçada através de sopradores e pedras porosas com temperatura em torno de 28°C. A limpeza das caixas foi feita através de sifonação a cada três dias. Foi fornecida dieta comercial (28% PB e 3.600 Kcal EB kg⁻¹) durante 30 dias, quatro vezes ao dia até a saciedade aparente.

Após o período de aclimação, os peixes foram anestesiados em solução alcóolica de eugenol (0.1g L⁻¹), e realizou-se amostragem de 12 tilápias para colheita de sangue para análises hematológicas, determinando dessa foram a condição basal. Em seguida os peixes foram divididos em 6 tratamentos: tampão fosfato PBS (controle), 100, 250, 500 e 600 µg/PV de LPS e *S. agalatae*, com 4 repetições cada. Após sete dias do desafio, foram amostrados 12 peixes por tratamento, anestesiados para colheita de sangue para análises hematológicas.

As análises englobaram a determinação do hematócrito (HTC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), e o teste de Dunnett foi utilizado para comparação dos tratamentos com o basal (5%) (SAS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho visa verificar se a injeção de LPS pode ser uma alternativa ao método tradicional de desafio bacteriano, e fazer a comparação com a infecção causada pelo microrganismo vivo. Foi possível observar que tilápias (*Oreochromis niloticus*) obtiveram diminuição no peso quando comparados com o basal. Por outro lado, o HTC aumentou no controle/PBS e LPS 250µg/PV. Já a hemoglobina diminuiu no grupo tratado com LPS 500µg/PV e no desafio bacteriano. O HCM e CHCM apresentaram-se diminuídos e comparação com o basal (Tabela 1). Comparando entre os tratamentos, pode-se observar que tilápias desafiadas com *S. agalatae* apresentaram HTC, HGB, VCM e CHCM menores que o controle ou tratado com LPS, indicando que o desafio bacteriano promove alterações hematológicas a frente à demanda energética necessária para iniciar uma infecção real promovida pelo patógeno (Tabela 2), diferente do LPS que apesar de ser uma molécula advinda de bactérias, não apresenta virulência.

Tabela 1. Variáveis hematológicas após 7 dias do desafio com LPS e *S. agalatae*, comparadas com coleta basal.

	Basal	µg/PV de LPS					<i>S. agalatae</i>	CV
		Controle PBS	100	250	500	600		
Peso	75,75±8,5	66,7±13,6	58,1±8,08*	58,58±10,4*	54,1±9,9*	50,43±8,3*	69,76±15,8	17,8
Comp	16,13±0,7	16,02±0,98	15,54±0,56	15,4±0,94	14,78±1,0*	14,76±0,9*	16,47±1,3	6,0
HTC	27,95±3,5	35,8±4,9*	28,7±5,3	33,9±4,25*	28,9±2,40	30,3±7,7	22,88±1,8	15,9
RBC ^{NS}	1,4±0,2	1,66±0,3	1,7±0,23	1,7±0,28	1,58±0,37	1,75±0,35	1,6±0,5	20,0
HGB	8,88±1,2	8,8±1,5	8,46±2,7	8,2±1,87	6,4±2,36*	8,1±0,95	5,33±1,74*	24,0
VCM	201,9±28,4	219,02±48,4	167,2±34,6	205,54±29,6	186,4±45,2	177,3±41,7	144±34,9*	20,2
HCM	65,17±15,8	53,48±9,26	48,88±14,0*	50,0±13,6*	47,33±11,9*	47,33±9,55*	33,8±11,4*	25,0
CHCM	32,3±6,4	25,6±3,76*	27,5±6,5	25,8±4,07*	23,7±2,94*	27,48±6,14	25,32±3,4*	18,8

Valores são médias ± desvio padrão. Médias seguidas com * diferenciam do basal pelo teste de Dunnett (P>0,05).

PV= peso vivo; CV=coeficiente de variação; Comp= comprimento; HTC= hematócrito; RBC= eritrócito; HGB= hemoglobina; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 2. – Variáveis hematológicas após 7 dias do desafio com LPS e *S. agalatae*.

	µg/PV de LPS						
	Controle PBS	100	250	500	600	<i>S. agalatae</i>	CV
Peso	66,7±13,6AB	58,1±8,08ABC	58,58±10,36ABC	54,1±9,9BC	50,4±8,3C	69,76±15,8A	19,08
Comp	16,02±0,98A	15,54±0,56AB	15,4±0,94AB	14,78±1,0B	14,76±0,9B	16,47±1,3A	6,26
HTC	35,81±4,9A	28,7±5,3AB	33,9±4,25A	28,9±2,4AB	30,3±7,7A	22,88±1,8B	16,57
RBC ^{NS}	1,66±0,3	1,7±0,2	1,7±0,28	1,58±0,37	1,75±0,35	1,6±0,5	20,74
HGB	8,8±1,5A	8,46±2,7AB	8,2±1,87AB	6,4±2,36BC	8,1±0,95AB	5,3±1,74C	25,75
VCM	219,02±48,4A	167,2±34,6AB	205,54±29,56AB	186,4±45,2AB	177,4±41,7AB	144,5±34,9B	21,95
HCM	53,48±9,26A	48,88±14,03AB	50,0±13,6A	47,3±11,9AB	47,3±9,55AB	33,76±11,37B	24,93
CHCM ^{N. S}	25,6±3,76	27,5±6,5	25,8±4,07	23,7±2,94	27,48±6,14	25,3±3,4	18,14

Valores são médias ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). PV= peso vivo; CV=coeficiente de variação; Comp= comprimento; HTC= hematócrito; RBC= eritrócito; HGB= hemoglobina; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados são resultados preliminares, entretanto pode-se concluir que o tratamento com LPS promoveu alterações hematológicas e pode ser usado como alternativa ao uso de microrganismos para desafios imunológicos.

REFERÊNCIAS

- ABUSELIANA, A.; HASSAN, D.; SALEHA, A.A.; SITI-KHAIRANI, B.; MILUD, A. 2010 *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 20:2640 -2646.
- EL-SAYED, A. F. M. 2006 *Tilapia culture*. CABI Publishing Series.
- HA, N.; GONÇALVES, A.F.N.; SOUSA, L.C.; BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S. 2017 Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation. *Aquaculture International*, 25: 755-776.
- MORRISON, D.C.; RYAN, J.L. 1987 Endotoxin and disease mechanism. *Annual Review of Medicine*, 38: 417-432.
- SUCHECKA, D.; HARASYM, J.P.; WILCZAK, J.; GAJEWSKA, M.; OCZKOWSKI, M.; GUDEJ, S.; BLASZCZYK, K.; KAMOLA, D.; FILIP, R.; GROMADZKA-OSTROWKA, J. 2015 Antioxidative and anti-inflammatory effects of high beta-glucan concentration purified aqueous extract oat in experimental model of LPS-induced chronic enteritis. *Journal of Funtional Foods*, 14: 244-254.