



INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES NO PERFIL LEUCOCITÁRIO DE *COLOSSOMA MACROPOMUM* APÓS SEPSE INDUZIDA POR *AEROMONAS HYDROPHILA*

LARISSA ANDRÉIA FERREIRA SAMPAIO; GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO;
LAINE PATRÍCIA COSTA DOS SANTOS; LAYANA APARECIDA BATISTA
FERREIRA; ALINE BATISTA FERREIRA

RESUMO

Introdução: A aeromonose é uma doença que acomete frequentemente os sistemas de criação quando o manejo não é executado de forma correta. Trata-se de uma doença causada por bactérias do gênero *Aeromonas*, responsáveis por provocar septicemia hemorrágica no hospedeiro imunocomprometido. Dessa forma, os peixes infectados apresentam desregulação nas células de defesa do organismo, verificadas pela redução dos leucócitos totais e redução das plaquetas, dificultando a coagulação sanguínea. Os probióticos surgem como medidas preventivas uma vez que possuem, além de outros benefícios, a capacidade de imunoestimular o organismo, auxiliando no combate a infecções. **Objetivos:** Avaliar o perfil leucocitário em tambaquis que receberam dietas suplementadas com duas cepas de bactérias ácido-láticas em duas frequências alimentares após indução de sepsse por *Aeromonas hydrophila*. **Material e Métodos:** As dietas suplementadas (concentração de 3×10^9 UFC/mL e dose de 15mL/ração) foram preparadas para cada cepa (I10 e M14) separadamente. Os grupos foram divididos conforme frequência de alimentação M14 3x e I10 3x (dieta suplementada fornecida 3 vezes ao dia), M14 1x e I10 1x (dieta suplementada fornecida 1 vez ao dia) e o grupo controle (sem suplementação). Após 90 dias de suplementação, os peixes foram induzidos à sepsse com inóculo de 0,5mL de *A. hydrophila* ($1,78 \times 10^9$) e 24h depois o sangue total foi coletado por punção caudal. Foram realizadas extensões sanguíneas para cada grupo e a contagem dos leucócitos totais se deu por método indireto, seguida da contagem diferencial. **Resultados:** Foi observado leucopenia e trombocitopenia nos peixes do grupo controle ($p < 0,05$) em relação aos peixes que receberam dieta suplementada. Não houve diferença na contagem de linfócitos, monócitos e granulócitos. Ainda, não foi observada diferença em relação à frequência alimentar. **Conclusão:** As cepas I10 e M14 contribuíram para manutenção dos leucócitos totais e trombócitos nos tambaquis, elucidando seu potencial imunoestimulante, contribuindo sobretudo para atenuação da condição hemorrágica característica do processo séptico.

Palavras-chave: probióticos; infecção bacteriana; aeromonose; tambaqui; imunoestimulação.

1 INTRODUÇÃO

A produção de peixes em alta densidade, quando executada de forma inadequada, pode contribuir para a disseminação de doenças bacterianas nos sistemas de criação (Pridgeon e Klesius, 2012). A aeromonose, causada por bactérias do gênero *Aeromonas*,

surge como uma das doenças mais comuns que acometem os peixes. São bactérias presentes naturalmente no ambiente aquático e na própria microbiota desses animais, porém, quaisquer alterações ambientais podem levar a surtos provocados por esse microrganismo. (Marinho-Neto, 2019; Ferrarezi, 2021).

Dentre as espécies mais virulentas destaca-se a *Aeromonas hydrophila*, conhecida principalmente por provocar septicemia hemorrágica (Rincón *et al.*, 2016). Os animais infectados costumam apresentar como sinais clínicos, no geral, a ocorrência de petéquias, distensão abdominal, hemorragia interna, exoftalmia e corrosão das nadadeiras, além de comprometimento dos órgãos. (Claudio *et al.*, 2019; Marinho-Neto, 2019). É importante ressaltar ainda que bactérias gram-negativas como a *Aeromonas hydrophila* possuem lipopolissacarídeos (LPS), descritos como potentes agentes quimiotáticos de leucócitos (Candido, 2012; Tomás, 2012). Dessa forma, essas endotoxinas podem recrutar para o local da infecção uma quantidade de células de defesa além do ideal apenas para eliminação do patógeno, havendo uma liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios em níveis que podem prejudicar o próprio organismo (Rincón *et al.*, 2016).

Dentro deste contexto, a sepsé se origina a partir do contato do organismo do peixe com o agente patogênico, na qual ocorre uma inflamação sistêmica podendo evoluir para o quadro de choque séptico (Shankar-Hari *et al.*, 2016). Este choque, por sua vez, está associado a altas taxas de mortalidade em pequenos animais, em virtude de ser desencadeado a partir de qualquer doença pré-existente, de natureza infecciosa ou não (Rabelo, 2012).

O sistema imunológico dos peixes é bastante similar ao de outros vertebrados, com a diferença de não possuírem medula óssea. Dessa forma, órgãos como o timo, baço, rim e os tecidos linfóides associados às mucosas são os responsáveis pela imunidade nesses animais (Biller-Takahashi *et al.*, 2014). O rim apresenta papel importante na hematopoiese, no timo ocorre o desenvolvimento e maturação dos linfócitos T, o baço é responsável pela formação das células de defesa (polpa branca) e anticorpos (polpa vermelha) e os tecidos linfóides associados à mucosa atuam na produção de muco que possuem proteínas com ação microbicida (Rodrigues *et al.*, 2020; Silva, 2021).

Os parâmetros hematológicos representam um dos principais indicadores de saúde dos peixes pois o sangue pode revelar condições internas mais precocemente (Pereira *et al.*, 2016). Quando os animais se encontram em condições de hemorragia, característica do processo séptico, há o comprometimento do perfil leucocitário observado principalmente pela redução no número de leucócitos e trombócitos (Claudio *et al.*, 2019).

Como alternativa promissora no que diz respeito ao controle de doenças nos sistemas de criação de peixes, surgem os probióticos, definidos como microrganismos vivos ou viáveis que, quando administrados em quantidade adequadas tem a capacidade de fornecer benefícios à saúde (Yamashita *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022). No caso da criação de peixes, os probióticos podem ser administrados através da própria água de criação ou ainda através da dieta (Merrifield e Ringo, 2014; Tachibana *et al.*, 2019).

Assim, esse trabalho objetivou avaliar a influência da adição de duas cepas de bactérias ácido-láticas na dieta de tambaquis, *Colossoma macropomum*, com duas diferentes frequências alimentares e elucidar o perfil leucocitário após sepsé induzida por *Aeromonas hydrophila*.

Avaliar o perfil leucocitário em tambaquis que receberam previamente dietas suplementadas com duas cepas de bactérias ácido-láticas em duas frequências alimentares após indução de sepsé por *Aeromonas hydrophila*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi executado na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), no Instituto de Biodiversidade e Florestas (IBEF) e no Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA). Foram adotados Princípios Éticos na Experimentação Animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Comissão de Ética no Uso Animal, UFOPA, nº 0620180030).

Obtenção das bactérias

As cepas autóctones foram isoladas, em estudo prévio, do intestino (I10) e de um mix de intestino e fezes (M14) de tambaquis (*Colossoma macropomum*) saudáveis oriundos do Rio Amazonas, em Santarém – Pará (2°26'35.02" S e 54°42'29.99" W). Após triagem via atividade hemolítica, os isolados passaram por testes para caracterização do potencial probiótico. Os testes incluíam: atividade antagonista frente a patógenos, formação de biofilme, resistência a pH ácido, sensibilidade a antibióticos, hidrofobicidade e patogenicidade *in vivo*. Após elucidadas com potencial probiótico, foram submetidas à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e identificadas como *Lactobacillus* sp. De modo similar, a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila* foi isolada de tambaquis que apresentavam sinais clínicos característicos de aeromonose.

Dieta experimental

A dieta foi preparada inicialmente com a formulação de suspensão de cada cepa separadamente, ajustando a concentração bacteriana para 3×10^9 UFC/mL. A dose utilizada foi 15mL/kg de ração. Dessa forma, após ajuste da concentração, foi adicionado à cada suspensão 3% de óleo de soja para melhor fixação e aspergido sobre os pellets de ração. Os potes foram então armazenados em geladeira para serem administrado aos peixes conforme a frequência estabelecida. Assim, os tratamentos consistiram nos seguintes:

Controle – sem dieta suplementada;

M14 3x – dieta suplementada com a cepa M14 e fornecida 3 vezes ao dia (8h30min, 12h e 17h);

M14 1x - dieta suplementada com a cepa M14 e fornecida 1 vez ao dia (8h30min);

I10 3x - dieta suplementada com a cepa I10 e fornecida 3 vezes ao dia (8h30min, 12h e 17h);

I10 1x - dieta suplementada com a cepa I10 e fornecida 1 vez ao dia (8h30min).

Todos os grupos receberam 3 alimentações diárias e a dieta suplementada foi preparada a cada 3 dias. Ainda, foi realizada biometria dos peixes a cada 10 dias para ajuste da quantidade de ração a ser fornecida de acordo com a biomassa.

Determinação da DL 50% - 96h

Foram utilizados 36 tambaquis divididos em seis aquários com seis animais cada. Os grupos receberam 0,5mL de concentrações crescentes de *A. hydrophila* ($0,15 \times 10^9$; $0,6 \times 10^9$; $1,2 \times 10^9$; $2,4 \times 10^9$ e 3×10^9 UFC/mL) e o grupo controle recebeu 0,5mL de solução salina 0,65%.

Durante o período de exposição os peixes não foram alimentados e não houve sifonagem da água, mas os parâmetros de qualidade da água foram monitorados.

Os valores da DL50-96h foram calculados pelo método “*Trimmed Spearman Karber*”, obtendo a DL50 estimada em $1,78 \times 10^9$.

Indução da sepse

A sepse foi induzida pela cavidade celomática com dose de 0,5mL e concentração bacteriana patogênica obtida na etapa anterior. Após 24h, o sangue foi coletado por punção caudal para as análises.

Perfil leucocitário

Uma alíquota do sangue total foi submetida às análises hematológicas para elucidar o perfil leucocitário nos peixes suplementados com bactérias autóctones probióticas que sofreram indução de sepse por *A. hydrophila*.

Para isto, foram confeccionadas extensões sanguíneas e a contagem de leucócitos totais foi realizada a partir de método indireto (Hrube e Smith, 1998), aplicando-se a fórmula: Leucócitos totais = Leucócitos x Eritrócitos/2000.

A contagem diferencial também foi realizada para contagem dos linfócitos, monócitos, granulócitos e trombócitos, aplicando-se a fórmula: Leucócitos totais x Leucócito relativo/100.

Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 10* e os resultados estão apresentados com as médias e o desvio padrão. Para a determinação das diferenças entre as variáveis dos tratamentos foi utilizado ANOVA e o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações causadas no leucograma podem ser observadas na Tabela 1. Foi verificado leucopenia ($p < 0,05$) e trombocitopenia ($p < 0,05$) nos peixes do grupo controle em relação a todos os grupos suplementados. A redução do número de leucócitos é um fator característico da sepse, observado em diversos estudos com peixes (Claudiano *et al.*, 2019; Marinho-Neto, 2019). Em contrapartida, estudos acerca da suplementação com probióticos verificaram aumento na contagem dessas células (Sousa *et al.*, 2019; Paixão *et al.*, 2020; Dias *et al.*, 2021). No presente estudo, a redução significativa no grupo controle sugere que as cepas autóctones influenciaram na regulação dessas células no organismo dos peixes. De forma similar, a trombocitopenia verificada no grupo controle também está diretamente associada ao processo séptico uma vez que a redução das plaquetas, responsáveis pela coagulação sanguínea, favorece a intensificação de hemorragias (Boechat *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2021). Esses dados corroboram com o achado por Claudiano *et al.* (2019) no qual verificaram redução significativa de trombócitos na terceira hora pós-infecção com *A. hydrophila*. Ainda, estudos visando avaliar como os probióticos auxiliam no sistema imunológico elucidam que há um aumento na contagem de trombócitos em peixes suplementados. (Faramazi, 2011; Mouriño *et al.*, 2017). Dessa forma, sugere-se que ambas as cepas influenciaram na regulação das plaquetas, contribuindo para atenuação da condição hemorrágica.

Não houve diferença estatística na contagem de linfócitos, monócitos e granulócitos em relação aos peixes do grupo controle ($p > 0,05$). Na contagem de granulócitos, os peixes do M14 1x apresentaram granulocitose em relação aos suplementados com M14 3x, sem diferir do controle ($p > 0,05$). Ainda, não foi observada diferença em relação à frequência alimentar.

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão do perfil leucocitário em *Colossoma macropomum* suplementados com cepas de bactérias probióticas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. Médias com letras em comum entre colunas não diferiram pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Variáveis	Grupos				
	Controle	M14 3x	M14 1x	I10 3x	I10 1x
LT ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	90,9 $\pm$ 1,1 D	90,4 $\pm$ 1,2 A	74,0 $\pm$ 1,2 A	98,0 $\pm$ 1,4 A	106,1 $\pm$ 1,2 A
Linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	11,1 $\pm$ 2,8 A	8,8 $\pm$ 1,8 A	4,7 $\pm$ 2,2 A	5,7 $\pm$ 2,6 A	7,7 $\pm$ 2,6 A
Monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	3,6 $\pm$ 0,0 A	1,4 $\pm$ 2,1 A	0,8 $\pm$ 2,2 A	2,9 $\pm$ 2,9 A	1,1 $\pm$ 2,0 A
Granulócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	2,9 $\pm$ 2,2 AB	4,2 $\pm$ 1,6 A	1,3 $\pm$ 1,0 B	2,4 $\pm$ 2,0 AB	3,0 $\pm$ 2,2 AB
Trombócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	41,6 $\pm$ 1,2 C	68,0 $\pm$ 1,2 AB	66,1 $\pm$ 1,2 B	68,1 $\pm$ 1,4 AB	84,4 $\pm$ 1,2 A

LT – leucócitos totais. M – grupos suplementados com cepas do mix de intestino e fezes, I – grupos suplementados com cepas apenas do intestino. 3x e 1x correspondem à freqüência de alimentação.

4 CONCLUSÃO

As cepas I10 e M14 contribuíram para regulação dos leucócitos totais e trombócitos nos tambaquis, elucidando seu potencial imunoestimulante, contribuindo sobretudo para atenuação da condição hemorrágica característica do processo séptico.

REFERÊNCIAS

- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. Disease of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β -glucan. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n.3, p.698-703, 2014.
- BOECHAT, T. O.; SILVEIRA, M. F. B. B.; FAVIERE, W.; MACEDO, G. L. Thrombocytopenia in sepsis: an important prognosis fator. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2012000100006>
- CANDIDO, T. D.; NETO, F. J.; MARUCIO, R. L.; FRAZÍLIO, F. O. Medvep – **Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 10, n. 32, p. 128-132, 2012.
- CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARINHO-NETO, F. A.; MIRANDA, R. L.; MARTINS, I. M.; OTANI, F. S.; MUNDIM, A.V.; MARZOCCHIMACHADO C. M.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 259- 265, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.044>.
- DIAS, J. A. R.; ALVES, L. L.; COUTO, M. V. S.; BARROS, F. A. L.; CORDEIRO, C. A. M.; PAIXAO, P. E. G.; FUJIMOTO, R. Y. Inflammatory response in swim bladder caused by *Aeromonas hydrophila* in tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816) supplemented with an autochthonous probiotic (*Bacillus cereus*). **Aquaculture Research**, v.1, p. 1-7, 2021. DOI: 10.1111/are.15490.
- FERRAREZI, J. V. Efeitos da suplementação dietária com *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na microbiota e saúde intestinal da tilápia-do-nilo. 2021. 44 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2021.

GOMES, L. G. O.; FODRA, J. D.; MASSABNI, A. C. Hematologia dos vertebrados: a série vermelha do sangue. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, n.3, 2021.

HRUBE, T. C.; SMITH, S. A. 1998. Hematology of fish, p. 1120-1125. in: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (ed.). *Schalm's Veterinary Hematology*. 5^o ed. Blackburg: Wiley- Blackwell.

MARINHO-NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVAQUIROZ, V. A.; KOBASHIGAWA, K. K.; CRUZ, N. R.; MORAES, J. R. Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. *PloS one*, v. 14, n. 9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222626>.

MERRIFIELD, D.; RINGO, E. (Edit) Gut health, probiotics and prebiotics. **Aquaculture Nutrition**, Wiley-Blackwell, p. 128-168, 2014.

MOURIÑO, J. L. P., VIEIRA, F. N., JATOBÁ, A., SILVA, B. C., PEREIRA, G. V., JESUS, G. F. A., USHIZIMA, T. T., SEIFFERT, W. Q., MARTINS, M. L. Symbiotic supplementation on the hematoimmunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Aquac. Nutr.** 23, 276–284, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12390>

PAIXÃO, P. E. G.; COUTO, M. V. S.; SOUSA, N. C. *et al.* Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquaculture**, v. 526, 2020. ISSN 0044- 8486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735395>.

PEREIRA, D. S. P.; GUERRA-SANTOS, B.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; AYRES, M. C. C. Parâmetros hematológicos e histológicos de tilápia do nilo em resposta ao desafio de diferentes níveis de salinidade. **Bol. Inst. Pesca**, v. 42, n. 3, p. 635-647, 2016 DOI: 10.20950/1678-2305.2016v42n3p635.

PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. **CAB Reviews**, v. 7, p. 1-16, 2012.

RABELO, R. C. Emergências de pequenos animais: condutas clínicas e cirúrgicas no paciente grave. 1^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RINCÓN V. G.; FUENMAYOR B. A.; CASTELLANO G. M.; BARRIOS U. R.; COLINA C. M.; NUÑEZ F. G. Factores de Virulencia en Cepas de *Aeromonas* spp. **Kasmera**, v. 44, n. 2, 121-133, 2016.

RODRIGUES, F. S.; CHAGAS, S. R.; ROCHA, M. C. V.; NASCENTE, E. de P.; PAULA, F. G.; PASCOAL, L. M. Innate immune system and the use of garlic as an immunostimulant: literature review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. e152943014, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i4.3014>.

SHANKAR-HARI, M.; PHILLIPS, G. S.; LEVY, M. L.; SEYMOUR, W.; LIU, V. X.; DEUTSCHMAN, C. S.; ANGUS, D. C.; RUBENFELD, G. D.; SINGER, M. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third

International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016.

SILVA, T. D. Duração do efeito imunoestimulante da glucana pós administração em pacu. 2021. 50 F. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP/CAUNESP, Jaboticabal, 2021.

SOUSA, N. C.; COUTO, M. V. S.; ABE, H. A.; PAIXÃO, P. E. G.; CORDEIRO, C. A. M.; MONTEIRO-LOPES, E.; READY, J. R.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N.; FUJIMOTO, R. Y. Effects of an *Enterococcus faecium* based probiotic on growth performance and health of Pirarucu, *Arapaima gigas*. **Aquaculture Research**, v. 50, p. 3720-3728, 2019.

TACHIBANA L.; NATORI, M. M.; DIAS, D. C.; HAMED, S. B.; ISHIKAWA, C. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; GONÇALVES, G. S. Recentes avanços dos estudos e utilizações de probióticos na piscicultura. In: RANZANI-PAIVA, Maria José Tavares *et al* (Org.). **Biotechnologia e sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Associação de Patologistas de Organismos Aquáticos (ABRAPOA), cap. 2. p. 41-80, 2019.

TOMÁS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 01- 22, 2012.

YAMASHITA, M. M.; PEREIRA, S. A.; CARDOSO, L.; ARAUJO, A. P.; ODA, C. E.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J.L. Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. **Aquaculture Nutrition**, v. 3, n. 7, p. 1235-1243, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12498>.

ZHANG, Y.; LIANG, X-F.; HE, S.; FENG, H.; LI, L. Dietary supplementation of exogenous probiotics affects growth performance and gut health by regulating gut microbiota in Chinese Perch (*Siniperca chuatsi*). **Reviews in Aquaculture**, 2022.