

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

**OLIGODEOXINUCLEOTIDEOS CpGs PROTEGEM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) DO
DESAFIO POR *Aeromonas hydrophila*.**

AUTOR PRINCIPAL: Lucas de Figueiredo Soveral

CO-AUTORES: Raíssa Canova, Rafael Frandoloso, Luiz Carlos Kreutz.

ORIENTADOR: Luiz Carlos Kreutz

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

A produção da aquicultura tem sido significativa, com uma taxa média de crescimento de 9% ao ano na última década (FAO, 2013). O cultivo de espécies autóctones, como o jundiá (*Rhamdia quelen*) tem contribuído para a otimização no uso de tanques destinados ao policultivo (da Silva et al., 2008). No entanto, o aumento da densidade populacional consiste em um fator agravante na predisposição a doenças infecciosas, as quais reduzem a eficiência dos cultivos. O uso indiscriminado de antibióticos para o controle de infecções bacterianas pode selecionar bactérias resistentes e a eliminação de bactérias benéficas, limitando a competição com patógenos, o que compromete a resposta imune. Nesse contexto, é importante pesquisar moléculas imunostimulantes para uso em terapias alternativas. Nosso trabalho analisou o potencial imunomodulador dos oligodeoxinucleotídeos CPGs (ODN CPGs) frente ao desafio por *Aeromonas hydrophila*.

DESENVOLVIMENTO:

Foram utilizados Júndias jovens de ambos os sexos e peso corporal de (20+-3g) aclimatados por 7 dias e alocados em tanques com água corrente, protegidos de luz e alimentados com ração comercial. Exames clínicos e coletas sanguíneas foram efetuadas anteriormente aos experimentos atestando a ausência da bactéria no sangue desses animais. Os CpGs utilizados no experimento foram descritos anteriormente (Carrington & Secombes, 2006). O foco do experimento foi na bacteremia e mortalidade dos peixes e os CpGs utilizadas foram 1668, CpG 2102, CpG 2133 e CpG 2143 (Invivogen, França). *Aeromonas hydrophila* utilizada no desafio em todos os experimentos foi isolada de um peixe doente. Cultivada overnight em caldo LB, em shaker a 200 rpm, a 37°C e

III SEMANA DO CONHECIMENTO

27 DE OUTUBRO
2016

Identificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Nesse experimento os animais foram divididos em 5 grupos (30 peixes/grupo) e receberam 0.1 ml intraperitoneal (i.p) na dose de 0.5µg de cada uma das ODN CPGs. O grupo controle foi inoculado com o mesmo volume de PBS (pH 7,2). Após 24 horas da inoculação, os mesmos foram desafiados com 0.1 ml de *Aeromonas hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe). 24 horas depois, amostras do sangue foram coletadas de pelo menos 10 peixes por grupo, os demais foram monitorados em relação a sobrevivência por 7 dias. Os resultados mais satisfatórios vieram da CPG 1668 (Figura 1 e 2), sendo essa a escolhida para experimentos posteriores que avaliaram as diferentes doses e tempos de administração do produto. Para o experimento com diferentes doses da CPG 1668 os animais foram divididos em 5 grupos de 10 peixes e inoculados com 0.1 ml i.p nas doses de 0.004µg, 0.02µg, 0.1µg e 0.5µg por peixe, respectivamente. O grupo controle recebeu 0.1 ml de PBS (pH 7,2). 24 horas após a administração os peixes foram desafiados com 0.1 ml de *A. hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe) e depois de 24 horas foram coletadas amostras sanguíneas de todos os indivíduos para avaliação da bacteremia. As doses de 0.5µg e 0.1µg se mostraram melhores em promover proteção (Figura 3). No experimento que avaliou diferentes tempos de administração da CPG 1668 antes do desafio, os animais foram divididos em 5 grupos (10 peixes/grupo) e inoculados com 0.1 ml i.p na dose 0.5µg. Os tempos escolhidos foram: 24 horas, 48h, 96h e 7 dias antes do desafio com 0.1 ml i.p de *A. hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe). Amostras do sangue de todos os animais foram coletadas 24 horas após o desafio. Os peixes inoculados 96h antes do desafio mostraram uma menor bacteremia em relação aos outros tempos e ao controle (Figura 4). A recuperação bacteriana do sangue dos peixes em todos os experimentos foi feita conforme (Zhang, M.). Uma maior capacidade de promover redução na bacteremia dos peixes e aumentar a taxa de sobrevivência foi encontrada nos animais inoculados com a CPG 1668 na dose de 0.5µg e 96h antes do desafio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Em um estudo anterior nos demonstramos que CpGs ODNs tem potencial adjuvante quando associado à um antígeno modelo (Pavan et al., 2016). No presente estudo, nos demonstramos que a inoculação de peixes com CpGs ODNs protege os peixes do desafio com *A. hydrophila*. A eficácia do CpGs ODNs depende da sequência do CpG ODN, da dose e do tempo de administração previamente ao desafio com o patógeno. O uso de CpG ODNs representa um importante alternativa para o controle de infecções na aquicultura.

REFERÊNCIAS:

- 1 CARRINGTON, A. C.; SECOMBES, C. J. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 87–101, 15 ago. 2006.
- 2 FAO. **FAO Fishery and Aquaculture Statistics Yearbook**. 2012. ed. Rome, Italy: FAO, 2013.
- 3 PAVAN, T. R. *et al.* Antibody response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) immunized

III SEMANA DO CONHECIMENTO

with a model antigen associated with different adjuvants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, n. 8, p. 1–5, 2016.

3 A 7 DE OUTUBRO
DE 2016

4 SILVA, L. B. DA *et al.* Introduction of Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) increases the productivity of carp polyculture in southern Brazil. *Aquaculture Research*, v. 39, n. 5, p. 542–551, 2008.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): (CEUA protocolo 011/2012)

ANEXOS:

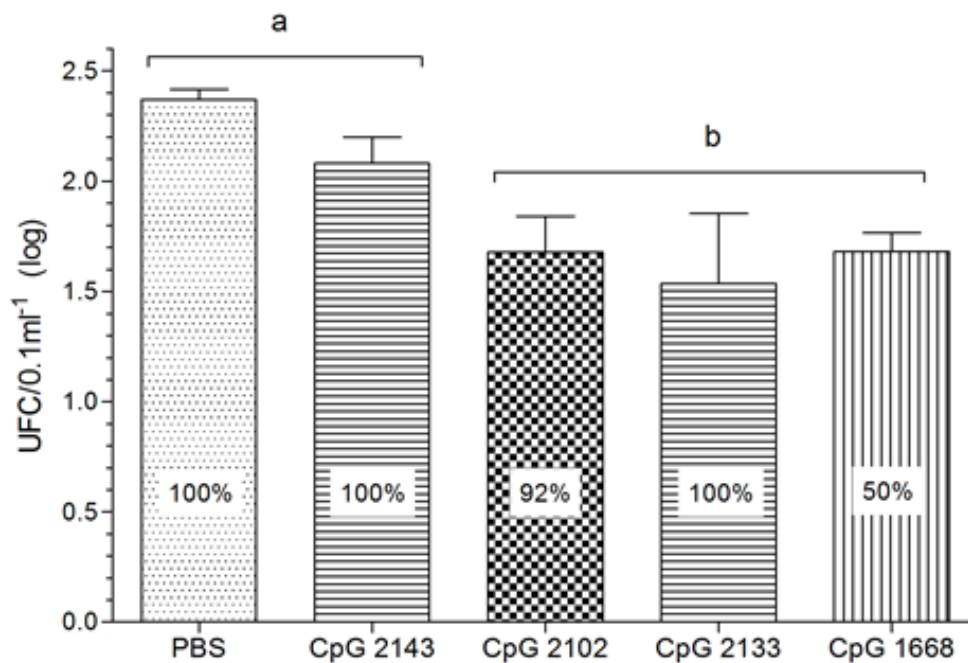


Figura 3. Bacteremia em peixes inoculados com diferentes CpGs ODN (0.5 µg/peixe), β-glucana (100µg) ou PBS e desafiados com *Aeromonas hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe). Amostras de sangue dos peixes (n = 10) foram coletadas 24 h após o desafio e semeadas em ágar BHI. Os dados indicam a média ± SEM do logaritmo natural do número de colônias isoladas (x+1) do sangue de cada peixe. As diferenças significativas entre grupos ($p < 0.05$) estão representadas por letras diferentes.

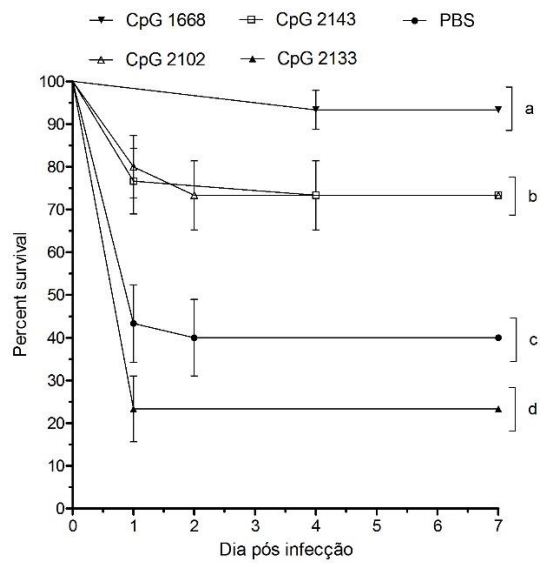


Figura 4. Taxa de sobrevivência dos peixes inoculados com diferentes CpGs ODN (0.5 µg/peixe), β-glucana (100µg) ou PBS e desafiados com *Aeromonas hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe). Em cada grupo, os peixes inoculados (n = 50) foram monitorados e o número de peixes mortos foi anotado diariamente por 7 dias. Os dados representam a taxa de sobrevivência diária ± SEM. As diferenças entre grupos estão representados por letras diferentes ($p < 0.001$).

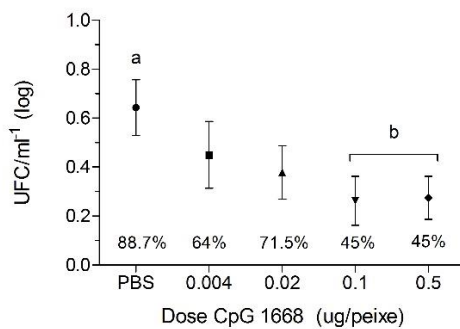


Figura 5. Efeito da dose do ODN CpG 1668 na bacteremia de peixes desafiado com *A. hydrophila*. Grupos de peixes (n = 10) foram inoculados com diferentes doses de ODN CpG 1668 e 24 h após receberam inóculo de *A. hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe).

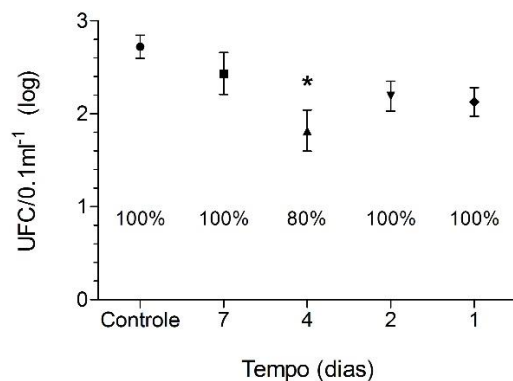


Figura 6. Taxa de bacteremia de peixes tratados com ODN CpG 1668 entre 7 e 1 dias antes do desafio com *A. hydrophila*. Os peixes (n = 10) receberam CpG 1668 (0.5 µg/peixe) nos dias indicados e desafiados com *A. hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe).