

V SEMANA DO CONHECIMENTO

**CONSTRUINDO CONHECIMENTOS
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES**

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Caracterização da atividade hemolítica do soro de Jundiás (*Rhamdia quelen*).

AUTOR PRINCIPAL: Lucas De Figueiredo Soveral.

CO-AUTORES: Fernando J. Sutili, Ana P. dos S. Voloski, Rafael Frandoloso, Bernardo Baldisserotto, Luiz C. Kreutz.

ORIENTADOR: Luiz Carlos Kreutz

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da aquicultura no Brasil está associado com a adoção de modelos intensificados de criação, os quais tem o objetivo de produzir o maior número de peixes possíveis em tanques com altas densidades de animais. O adensamento dos peixes em cultivo proporciona um ambiente favorável para disseminação de patógenos e as doenças infectocontagiosas se tornaram recorrentes nas criações. A imunidade inata dos peixes é responsável pela resposta imediata aos patógenos presentes no ambiente e o sistema do complemento é um dos principais atuantes no processo de defesa inespecífico das espécies aquáticas. Nesse sentido, avaliar a funcionalidade do sistema do complemento tornou-se fundamental para elucidar os mecanismos de defesa dessas espécies e os ensaios de atividade hemolítica do soro consistem em ferramentas valiosas para esse propósito. Sendo assim, o objetivo do estudo foi caracterizar a atividade hemolítica espontânea associada ao sistema do complemento no soro de Jundiás.

DESENVOLVIMENTO

Vinte Jundiás, pesando aproximadamente 150 g, foram anestesiados (eugenol 50 mg/L) para a coleta de sangue e separação do soro. Volumes iguais do soro de cada peixe foram misturados visando obter valores de referência para a espécie. As hemácias de várias espécies de animais foram utilizadas para padronizar o teste de

V SEMANA DO CONHECIMENTO

**CONSTRUINDO CONHECIMENTOS
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES**

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



hemólise. As células sanguíneas foram lavadas com solução salina fosfatada tamponada (PBS, pH 7,4) até que o sobrenadante obtido estivesse límpido. Logo, para a padronização da hemólise total, 100 ul das hemácias de cada espécie foram lisadas com água deionizada e a densidade óptica (D.O) foi mensurada a 540 nm. Para todos os ensaios ajustamos uma concentração de 0.5 D.O de hemácias. O percentual de hemólise em todos os ensaios foi calculado através da diferença entre os controles com hemólise total (100 % : hemácias + água deionizada) e não hemolisada (0 % : hemácias + PBS) como a seguir: % hemólise=[(A540 amostra - A540 não hemolisada)/(A540 hemolise total - A540 não hemolisada)] × 100 (Sutili et al., 2016). As hemácias de ovelha e de coelho mostraram maior sensibilidade a atividade do complemento em comparação as hemácias de carpa, vaca, cavalo e galinha (Fig. 2b). A incubação dos eritrócitos ovinos (23 °C/30 min) com 10 % do soro de Jundiá diluído em PBS resultou em 40 % de hemólise, enquanto as concentrações de soro acima de 20 % apresentaram 90 % de atividade hemolítica (Fig. 1b). Em relação ao tempo de incubação, a atividade hemolítica em eritrócitos ovinos apresentou um rápido aumento (80 %) depois de 60 minutos, chegando a 90 % em 90 a 120 minutos (Fig. 1c). A temperatura de incubação na qual foi observada a máxima atuação do complemento em hemácias de ovelhas foi de 25 °C sendo que a atividade reduz a 35 °C e é inibida a 45 °C (Fig. 1d). Eritrócitos de ovelha incubados (30 min/25 °C) com soro de Jundiá diluído a 10 % apresentaram um percentual de hemólise de 40 %, sendo essa a metodologia assumida para o restante dos testes. O tratamento térmico do soro (56 °C/30 min) e a adição de ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) a 5, 10, 20 ou 40 mM antes da incubação com as hemácias (23 °C/30 min) causaram redução significativa no percentual de hemólise. A hemólise foi completamente inibida na concentração de 40 mM de EDTA (Fig. 1a). Por outro lado, a atividade hemolítica do soro foi restaurada e aumentada após a adição de CaCl₂ (10 mM), porém, reduziu na presença excessiva de Mg²⁺ (MgCl₂ 10mM). A ativação da via clássica do complemento requer a presença de Ca²⁺ e Mg²⁺, enquanto a via alternativa requer apenas a presença de Ca²⁺ (Fig. 2a). Ligantes do complemento como: zymosan 10 µg/mL (β-1.3-glucana); Macrogard® 10 µg/mL (β-1.3/1.6 glucana); atrazina 1 µg/mL e citral 10 µg/mL misturados 1:1 com o soro reduziram a atividade hemolítica do soro em 40 % a 60 % em comparação ao grupo controle (Fig. 2c). O teste ANOVA de uma via foi aplicado para determinar diferenças significativas entre os tratamentos, seguido do teste de Tukey.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O soro de Jundiá apresentou rápida e potente atividade hemolítica e mostrou ser dependente do volume de soro, do tempo e da temperatura de incubação, assim como reportado em outras espécies de peixes. Eritrócitos ovinos e de coelhos foram indicados para a realização de ensaios de atividade hemolítica do soro de Jundiá. Nossos resultados proporcionam informações importantes para padronização de ensaios hemolíticos visando entender o sistema imunológico das espécies aquáticas.



V SEMANA DO CONHECIMENTO

**CONSTRUINDO CONHECIMENTOS
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES**

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



REFERÊNCIAS

SUTILI F.; VOLOSKI A.; FRANDOLOSO F.; BALDISSEROTO B.; KREUTZ L.; Characterization of the spontaneous hemolytic activity of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) serum.; in press, 2018.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): 012/2014

ANEXOS

V SEMANA DO CONHECIMENTO

CONSTRUINDO CONHECIMENTOS PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



FIGURA 1 (FIG 1)

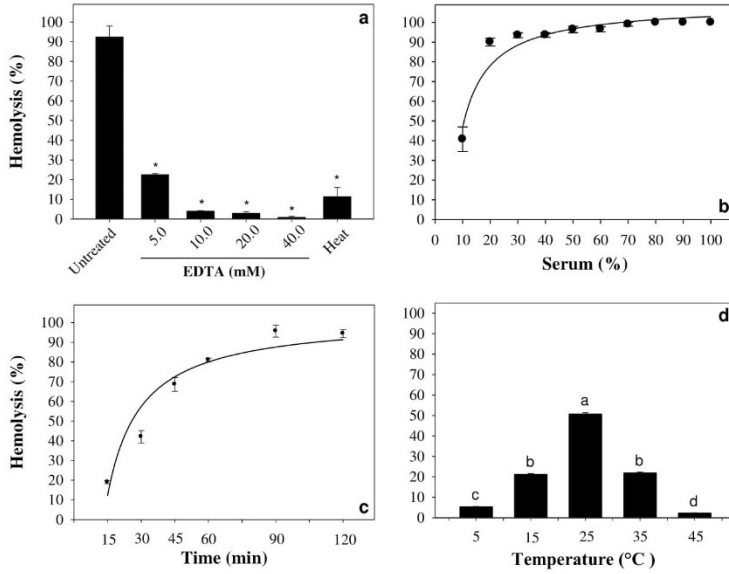


FIGURA 2 (FIG 2)

