



IDENTIFICAÇÃO DE IMUNOMARCADORES HEPÁTICOS EM TILÁPIAS-DO-NILO ALIMENTADAS COM PROBIÓTICO

IDENTIFICATION OF HEPATIC IMMUNOMARKERS IN NILE TILAPIA FED WITH PROBIOTIC

Pedro Henrique Sousa FERRO¹, Rafael de Souza PACHECO², Fabiana MOREIRA³, Jaqueline Inês Alves de ANDRADE⁴, Adolfo JATOBÁ³, Delano Dias SCHLEDER⁵.

1 Acadêmico do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária Bolsista PIBIC-EM/CNPq

2 Acadêmico do curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal do IFC-Campus Araquari

3 Docente do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária do IFC-Campus Araquari

4 Técnica do Laboratório de Aquicultura IFC-Campus Araquari

5 Orientador IFC-Campus Araquari

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo quantificar a intensidade de marcadores celulares no tecido hepático de tilápias-do-nylo alimentadas com e sem adição do probiótico *Lactobacillus plantarum*. Os alevinos foram cultivados em sistema de recirculação e alimentados duas vezes ao dia. Após 30 dias de alimentação, os tratamentos com adição de *L. plantarum* apresentaram maior ganho de peso, comparado ao grupo controle. A intensidade da imunomarcagem para os hormônios IGF-1 e Leptina foram significativamente menores nos tratamentos com relação ao grupo controle. Os resultados mostram que o probiótico reduziu os níveis hormonais, porém não afetou os níveis dos receptores no tecido hepático.

Palavras-chave: probiótico; metabolismo; resposta imune.

ABSTRACT

The objective of this study was to quantify the intensity of the cellular markers in the hepatic tissue of Nile tilapia fed diets with and without the addition of the probiotic *Lactobacillus plantarum*. The fingerlings were cultivated in a recirculation system and fed twice a day. After 30 days of feeding, the treatment containing *L. plantarum* inoculum showed a greater gain in weight when compared to the control group. The intensity of the immunostaining for the IGF-1 and Leptin hormones were significantly lower in the treatment than in the control group. The results show that the probiotic reduced hormone levels, but did not affect the levels of the receptors in the hepatic tissue.

Keywords: probiotic; metabolism; immune response.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil produziu 722.560 toneladas de peixes de cultivo em 2018, sendo que a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) representou 55,4% deste montante com

400.280 toneladas, mantendo o Brasil como o 4º produtor mundial de tilápia (PeixeBr 2019). Com o atual crescimento exponencial da população mundial, há um embate entre atender a demanda de alimento e lidar com os impactos ambientais gerados pela produção animal (FAO 2018). A intensificação dos sistemas de produção em busca de atender esta demanda, traz como consequência a elevação de matéria orgânica, das condições de estresse e a multiplicação de patógenos que, por sua vez, pode interferir na homeostase do organismo, ocasionando surtos de enfermidades (Bregnballe 2015). Para o tratamento dessas enfermidades é utilizado substâncias quimioterápicas, porém, fármacos como antibióticos podem acarretar resistência bacteriana, se utilizados de forma irracional e irrestrita (Tyrrell et al. 2019).

Neste sentido, a cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* apresenta elevado potencial para aplicação na tilapicultura, uma vez que tem demonstrado significativa capacidade de colonização do trato intestinal, de inibição de bactérias patogênicas, bem como na melhora da resposta inespecífica do sistema imune da tilápia-do-nylo (Jatobá et al., 2015; Dotta et al., 2011).

Diversas pesquisas têm sido direcionadas ao entendimento dos fatores que regulam o metabolismo com o sistema imune de vertebrados, bem como ao efeito dos probióticos sobre os mesmos (Dar et al., 2018). O uso de probióticos está relacionado à secreção de diversos marcadores celulares como neuropeptídeo Y (npy), leptina, insulina e hormônio do crescimento (GH), citocinas TNF- α , IL6 IL-1b, (Bagarolli et al., 2017; Procaccini et al., 2017).

No entanto, existem questões a serem elucidadas quanto a interação do eixo hormônio do crescimento (GH)/IGF-I e a leptina com a regulação do crescimento, metabolismo, reprodução, imunidade e equilíbrio osmótico de organismos vertebrados, e como a comunidade microbiana do trato digestivo, bem como a utilização de probióticos, podem influenciar nos níveis destes hormônios. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da cepa probiótica (*Lactobacillus plantarum*) sobre parâmetros microbiológicos, modulação da leptina, IGF-1 e seus receptores no tecido hepático de tilápias-do-nylo (*Oreochromis niloticus*).

METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Aquicultura do Instituto Federal Catarinense - Campus Araquari. Os alevinos de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) foram obtidos através de reprodução natural no Laboratório de Aquicultura da referida instituição e mantidos em tanques escavados, inicialmente alimentados com ração comercial com 40% de proteína bruta (GUABI®), e depois com ração extrusada com 32% de proteína bruta (GUABI®) até serem transferidos para as unidades experimentais.

O experimento foi realizado utilizando-se um sistema de recirculação da água com filtro físico, biológico, e luz ultravioleta (UV), para esterilização da água. Adicionalmente, de acordo com Strickland e Parsons (1984), foi feita uma análise de nitrato no início e no final do experimento para confirmar o processo de nitrificação no filtro biológico. Todos os parâmetros avaliados se mantiveram em níveis adequados para o cultivo de *O. niloticus*. Oxigênio dissolvido $4,35 \pm 0,23$ mg L⁻¹, temperatura $25,43 \pm 0,02$ °C, pH $7,25 \pm 0,15$, amônia $0,02 \pm < 0,01$, mg L⁻¹ N-NH₃, e nitrato inicial $0,09 \pm < 0,01$ mg L⁻¹ N-NO₃ e nitrato final $4,88 \pm < 0,01$ mg L⁻¹ N-NO₃.

Para o povoamento, primeiro foi realizada uma aclimação gradual dos animais à água dos tanques experimentais durante 50 minutos, em seguida, os alevinos de

tilápia-do-nilo foram transferidos para 6 tanques de polietileno, com capacidade de 46 L, totalizando 8 animais com 23, 16 g \pm 0, 50 (biomassa total do tanque (185, 35 g \pm 4, 03). As seis unidades experimentais foram divididas aleatoriamente em dois tratamentos, em triplicata: peixes alimentados com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* (probiótico) e alimentados com dieta sem suplementação (controle). Os peixes foram aclimatados durante 7 dias e alimentados duas vezes ao dia (8:00 e 17:00 horas) com ração comercial com 32% proteína bruta (GUABI®) durante 30 dias de experimento.

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com os protocolos estabelecidos por Jatobá *et al.* (2008) sendo que as probióticas receberam 10% (v/p inóculo/ração) de inóculo, contendo *L. plantarum* em meio de cultura na concentração de 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL⁻¹. Já as dietas controles receberam apenas o meio de cultura estéril, na mesma proporção. Após misturar homogeneamente os inóculos nas dietas, estas foram secas em estufa e a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas.

O experimento foi certificado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA/IFC - protocolo número 202/2017). Após o período de alimentação, os peixes permaneceram 12 horas de jejum para coleta do trato intestinal e fígado. Para isso, foram anestesiados com Eugenol (50 mg. L⁻¹) e sacrificados por concussão da medula espinhal.

Para análise de imuno-histoquímica, foram coletados fígados de seis animais (± 30 g) por tratamento e fixados em formol 10%. Após o preparo das lâminas com cortes histológicos de fígado (3 μ m), anticorpos policlonais primários foram instilados sobre as mesmas, anti-leptina (Ob A-20) e anti-IGF-1 (H-70) diluídos em solução de BSA 1,5%, e incubadas em câmara úmida overnight a 4 °C. Posteriormente, o anticorpo secundário foi instilado e as lâminas incubadas. Por fim, foram coradas com diamino-benzidina-peroxidase e contra coradas com Hematoxilina de Mayer filtrada, conforme protocolos seguidos por Moreira *et al.* (2013). No total foram analisados 180 ácidos hepáticos com o uso do programa Image J®, que utiliza uma escala de 0 a 255, onde 0 indica maior intensidade de marcação e 255 indica ausência de marcação.

Para análise estatística, os dados foram previamente submetidos à análise de Bartlett para verificar a homogeneidade de variância dos dados. Quando confirmada a homogeneidade foi realizado um teste T de separação de médias. Todas as análises com 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os alevinos de tilápia-do-nilo alimentados com dieta suplementada com bactérias probióticas apresentaram melhor conversão alimentar e maior peso final comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Porém, não houve diferença significativa para sobrevivência, conforme os dados observados abaixo.

De acordo com análises microbiológicas foi observado evidente colonização de *L. plantarum* no trato digestivo das tilápias alimentadas com probiótico. Os resultados da imunomarcção dos ácidos hepatopancreáticos demonstraram que a intensidade para os marcadores IGF-1 e Leptina foi significativamente menos intensa no grupo suplementado com probiótico em relação ao grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa para a imunomarcção dos seus respectivos receptores nos grupos avaliados (Tab. 1). Fato que pode ter ocorrido devido a ação do probiótico em conjunto com o efeito do período de jejum antes da coleta, o qual foi de

aproximadamente 12 horas. A diminuição dos níveis de leptina durante o estado de jejum está associada ao incremento da motivação para buscar alimento, bem como a sensação de recompensa quando o animal ingere o alimento, além de induzir neurocircuitos anoréxicos a fim de reduzir o catabolismo de açúcares e lipídios (Munzberg et al., 2015).

Tabela 1. Imunomarcagem da leptina e IGF-1 e seus respectivos receptores (Rec. IGF-1 e Rec. Leptina) no citoplasma dos ácinos hepatopancreáticos de tilápias-do-nylo após 30 dias de alimentação com dietas suplementadas com *L. plantarum* e sem suplementação (controle).

Marcadores hepáticos	Tratamento		P
	Controle	Probiótico	
IGF 1	68,20 ± 11,06	82,10 ± 10,78	< 0,0001
Leptina	80,90 ± 11,54	87,10 ± 11,86	0,0155
Rec. IGF – 1	85,43 ± 18,83	80,10 ± 10,70	0,1750
Rec. Leptina	86,00 ± 6,81	89,69 ± 9,26	0,0907

¹ Dados apresentados como média ± desvio padrão.

² 255 a marcação menos intensa e 0 zero a marcação mais intensa.

³ Valor de p menos que 0,05 (p < 0,05) considerado significativo pelo teste t.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que a suplementação com *L. plantarum* reduziu os níveis de leptina e IGF-1 nos ácinos hepáticos de tilápia-do-nylo em jejum, mas não dos receptores, o que foi acompanhado pela melhora no desempenho zootécnico e pela redução de bactérias patogênicas no trato digestivo.

REFERÊNCIAS

ARGUEDAS, D.; ORTEGA, S.; MARTÍNEZ, S.; ASTROZA, A. Parasites of Nile Tilapia larvae *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) in concrete ponds in Guanacaste, Northern Costa Rica. CUADERNOS INVEST. v. 9, p. 313-319, 2017.

BAGAROLLI, R. A.; TOBAR, N.; OLIVEIRA, A. G.; ARAUJO, T. G.; CARVALHO, B. M.; ROCHA, Z. G.; VECINA, J. F.; CALISTO, K.; GUADAGNINI, D.; PRADA, P. O.; SANTOS, A.; SAAD, S. T. O.; SAAD, M. J. A. Probiotics Modulate Gut Microbiota and Improve Insulin Sensitivity in DIO Mice. JNB, v. 50, p. 16-25, 2017.

BREGNBALLE, J (2015) A guide to Recirculation Aquaculture: An introduction to the new environmentally friendly and highly productive closed fish farming systems. FAO Eurofish Rep 100. doi: 92-5-105177-1

DAR, S. A.; SRIVASTAVA, P. P.; VARGHESEA, T.; GUPTAA, S.; GIREESHBABUB, P.; KRISHNAC, G. Effects of starvation and refeeding on expression of ghrelin and leptin gene with variations in metabolic parameters in *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture, v.484, p. 219–227, 2018.

DOTTA, G.; MOURIÑO, J. L.P.; JATOBÁ, A.; MORÁN, R. E. B.; PILATI, C., MARTINS; M. L. Acute inflammatory response in nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. Acta Sci Bio Sci, v. 33, p. 239-246, 2011.

FAO (2018) The State of Fisheries and Aquaculture in the world 2018

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesqui Agropecu Bras*, v. 43, p. 1201-1207, 2008.

JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P. Efeito do *Lactobacillus plantarum* no trato intestinal de alevinos de *Oreochromis niloticus*. *Cienc. anim.bras*, v.16, p. 45-53, 2015.

KUBITZA, F. *Tecnologia e planejamento na produção comercial*. 1 ed. Jundiaí, SP., p. 23-24, 2000.

MOREIRA, F.; CORCINI, C. D.; MONDADORI, R. G.; GEVEHR-FERNANDES, C.; MENDES, F. F.; ARAUJO, E. G.; LUCIA JR., T. Leptin and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in oocytes of sows and gilts. *Anim Reprod Sci*, v. 139, p. 89-94, 2013.

MÜNZBERG, H.; MORRISON, C. D. Structure production and signaling of leptina. *Metabolism*, v. 64, p. 13-23, 2015.

PROCACCINI, C.; ROCCA, C. L.; CARBONE, F.; ROSA, V.; GALGANI, M.; MATARESE, G. Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system. *Dev Comp Immunol*, v. 66, p. 120-129, 2017.

PeixeBr (2019) Anuário PeixeBr 2019. Assoc Bras Piscic 138

STRICKLAND, J.D.; PARSONS, T.R. A practical handbook of seawater analysis (Bulletin 167), second ed. Unipub, Ottawa, 1984.

TYRRELL, C.; BURGESS, C.M.; BRENNAN, F.P.; WALSH, F. (2019) Antibiotic resistance in grass and soil. *Biochem Soc Trans* 47:477–486. doi: 10.1042/BST20180552

WALKER, P. J.; WINTON, J. R. Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Vet. Res.* 41(51), p. 24, 2010.