



Concentração de lisozima sérica e no muco em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com cortisol exógeno

RESUMO

Gabriel Kyoshi Rodrigues
gabrielr@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Ricardo Yuji Sado
ricardoysado@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

A relação estresse/sistema imune dos peixes geralmente é baseada por indicadores sanguíneos, entretanto, a primeira linha de defesa é o muco da superfície corporal. Deste modo, o presente estudo utilizou o cortisol exógeno mimetizando uma condição controlada de estresse nos animais para padronizar e validar metodologia para determinação da concentração de lisozima no muco dos peixes. Foram utilizados 40 juvenis de pacu ($93,82 \pm 7,09$ g) distribuídos em quatro caixas de polietileno (250L), alimentados duas vezes ao dia com dieta controle e uma contendo cortisol (Sigma® 400mg/kg de ração) durante 12 dias. Após 0, 2, 4, 8 e 12 dias foram amostrados sangues e muco para a determinação da concentração de lisozima. Os dados foram submetidos à ANOVA e comparados pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Peixes alimentados por 2 dias com a dieta contendo cortisol apresentaram maior ($p<0,05$) concentração de lisozima no muco. A concentração de lisozima sérica foi maior ($p<0,05$) nos peixes alimentados com cortisol. Neste contexto, o cortisol exógeno foi eficiente na indução das respostas fisiológicas ao estresse e a metodologia para determinação de lisozima no muco pode ser utilizado como ferramenta para avaliação da resposta imune dos peixes.

PALAVRAS-CHAVE: Estresse. Sistema imune. Peixes.

INTRODUÇÃO

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* é uma espécie rústica e com carne saborosa, o que propicia sua criação em cultivo intensivo. Sistemas intensivos conferem estresse aos animais e causam distúrbios na homeostase, queda no desempenho e susceptibilidade à doenças (Oba et al., 2009). Para minimizar esses impactos, são utilizadas substâncias com propriedades imunoestimulantes, que são capazes de melhorar a respostas ao estresse e prevenir o aparecimento de doenças. A avaliação desses compostos se baseia principalmente nos indicadores sanguíneos e sobrevivência (Barros et al. 2014; Sirimanapong et al., 2015), entretanto, o muco representa a primeira linha de defesa dos peixes (Fast et al., 2002) e pouca atenção foi dada, principalmente em espécies de peixes nativos.

Dessa forma, o presente estudo propõe a aplicação de cortisol exógeno em ração comercial para mimetizar uma condição controlada de estresse, avaliar os efeitos agudos e crônicos, que o cortisol exerce nos parâmetros hematológicos e concentração de lisozima sérica e no muco, assim como chegar a resultados conclusivos da eficácia da metodologia para determinar a concentração de lisozima no muco presente na superfície corporal do peixe.

METODOLOGIA

Este estudo foi conduzido na Unidade de Ensino e Pesquisa – UNEPE Piscicultura, da UTFPR, Câmpus de Dois Vizinhos-PR. Juvenis de pacu ($93,8 \pm 7,0$ g) foram distribuídos em quatro caixas de polietileno (250 L), em sistema de recirculação de água. Houveram cinco tratamentos: controle e cortisol dietético amostrados após dois, quatro, oito e doze dias de alimentação. Ao final, todos os peixes de cada caixa ($n=10$) foram amostrados para a coleta de sangue. A dieta com cortisol foi preparada por meio da aspersão de solução contendo 400 mg de hidrocortisona (Sigma-Aldrich) e diluídas em 200 mL de etanol, para cada quilograma de dieta. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia até a aparente saciedade.

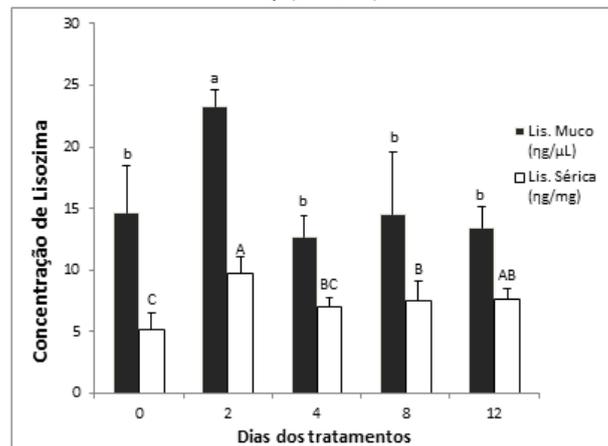
As amostras de sangue de cada peixe foram colhidas por punção do vaso caudal, com seringas plásticas descartáveis de 3 mL, previamente umedecidas com heparina. A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, a concentração de hemoglobina pelo método proposto por Blaxhall et al. (1973) o hematócrito segundo Goldenfarb et al. (1971). A concentração de lisozima sérica foi determinada de acordo Abreu et al. (2009), para o muco foi determinada de acordo com Ross et al. (2000) e burst oxidativo dos leucócitos (Biller-Takahashi et al. 2014). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UTFPR e aprovado (Protocolo n° 2015-10).

RESULTADOS

Não foi observado efeito ($p>0,05$) sobre o hematócrito e *burst* oxidativo dos leucócitos. No entanto, a concentração de lisozima no muco e no soro, assim como o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e as variáveis hematimétricas (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)) foram

influenciados ($p < 0,05$) pelos tratamentos. A concentração de lisozima no muco foi maior nos peixes alimentados com cortisol na dieta durante dois dias (Figura 1). Da mesma forma, a concentração de lisozima sérica também foi maior nos peixes alimentados por dois dias com a dieta contendo cortisol (Figura 1).

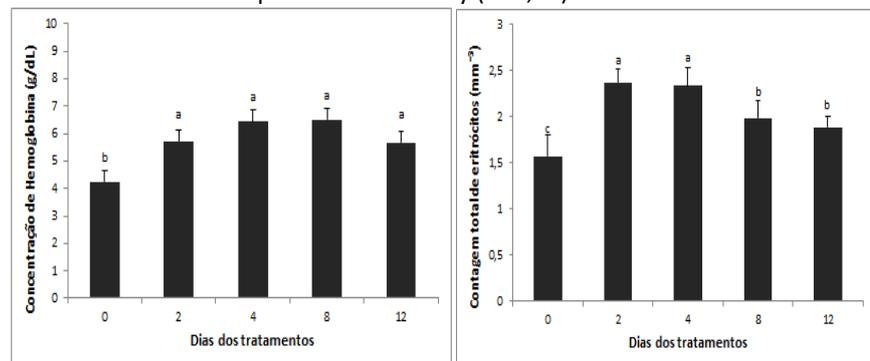
Figura 1 – Concentração de lisozima no muco e lisozima sérica de juvenis de pacu *P.mesopotamicus*, alimentados com cortisol exógeno na dieta com diferentes dias de inclusão. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).



Fonte: Autoria própria (2017).

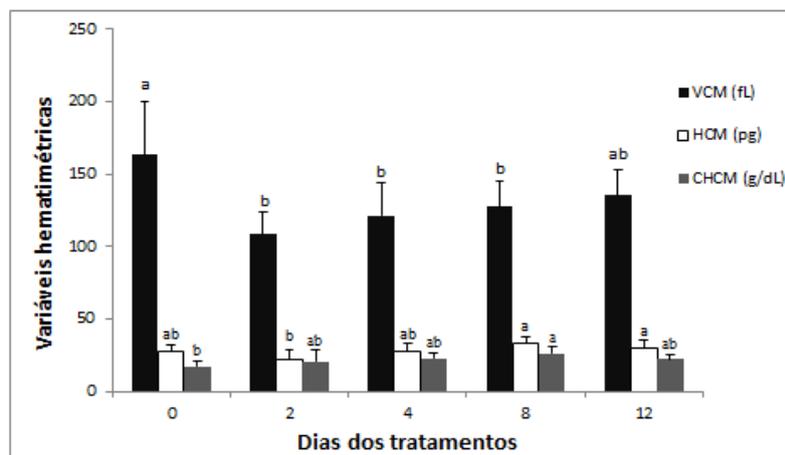
A concentração de hemoglobina aumentou após dois dias de alimentação com a dieta contendo cortisol, assim como o número de eritrócitos, o qual apresentou os maiores valores após dois e quatro dias de alimentação (Figura 2). Da mesma forma as variáveis hematimétricas como VCM e CHCM também se elevaram no decorrer do tempo nos peixes alimentados com cortisol na dieta. Porém o HCM diminuiu nos peixes alimentados por dois dias contendo cortisol (Figura 3).

Figura 2 – Concentração de hemoglobina e contagem total de eritrócitos de juvenis de pacu *P.mesopotamicus*, alimentados com cortisol exógeno na dieta com diferentes dias de inclusão. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).



Fonte: Autoria própria (2017).

Figura 3 – Variáveis hematimétricas de juvenis de pacu *P.mesopotamicus*, alimentados com cortisol exógeno na dieta com diferentes dias de inclusão. Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).



Fonte: Autoria própria (2017).

CONCLUSÕES

O cortisol exógeno foi eficiente na indução das respostas fisiológicas ao estresse e a metodologia para determinação de lisozima no muco pode ser utilizado como ferramenta para avaliação da resposta imune de peixes.

Serum and mucus lysozyme concentrations of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed exogenous cortisol

ABSTRACT

OBJECTIVE: The stress/fish immune system relation almost focuses on blood indicators; however, the first defense line in fish is the body surface mucus. Thus, this study used exogenous cortisol to mimic a controlled stressful condition in fishes to validate and standardize the methodology to determine lysozyme concentrations on fish mucus. Forty juvenile pacu (93.82 ± 7.09 g) were distributed into four polyethylene tanks (250 L) and fed twice a day with control diet and dietary cortisol (Sigma® 400 mg/kg feed) during 12 days. After 0, 2, 4, 8 and 12 days, blood and mucus samples were collected to determine lysozyme concentrations. Results were subjected to one-way ANOVA and Tukey's test ($\alpha=0.05$). Fish fed for 2 days with dietary cortisol showed higher ($p<0.05$) mucus lysozyme concentration. Serum lysozyme were higher ($p<0.05$) in fish fed cortisol. In this context, exogenous cortisol were efficient to induce physiological stress response in fishes and the mucus lysozyme concentration method can be used as a tool for fish immune response evaluation.

KEYWORDS: Stress. Immune system. Fish

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudo e UTFPR Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. S.; TAKAHASHI, L.S.; HOSHIBA, M. A.; URBINATI, E.C. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 415-421, 2009b.

BARROS, M.M; FALCON, D. R.; ORSI, R.O.; PEZZATO, L.E.; FERNANDES JUNIOR, A.C.; GUIMARÃES, I.G.; FERNANDES JR, A; PADOVANI, C.R.; SARTORI, M.M.P. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to estress and bacterial challenge. **Fish and Shelfish Immunology**, v. 39, p. 188-195, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; MONTASSIER, H.J.; TAKAHASHI, L.S.; URBINATTI, E.C. Proposed method for agglutinating antibody titer analysis and its use as indicator of acquired immunity in pacu , *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74(1), p. 238-242, 2014.

BLAXHALL, P.C.; DAISLEY, K.W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**. v. 5, p. 771-781, 1973.

ELLIS, A. E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J. S., FLETCHER, T. C., ANDERSON, D. P., ROBERSON, B. S., MUISWINKEL, W. B. (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications, p. 101-103, 1990.

FAST, M.D.; SIMS, D.E.; BURKA, J.F.; MUSTAFA, A.; ROSS, N.W. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and *Atlantic salmon*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, p.645-667, 2002.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

OBA, Eliane T., Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. **Embrapa Amapá**. Macapá, cap.8, 2009.

PETRERE JR., M. River fisheries in Brazil: a review. **Regulated Rivers Research & Management**, v.4, p.1-16, 1989.

ROSS, N. W., FIRTH, K. J. , WANG, A., BURKA, J. F., JOHNSON, S. C. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation . **Dis Aquat Organ**, 41 : 43 – 51, 2000.

SIRIMANAPONG, W.; ADAMS, A.; OOI, E.L.; GREEN, D.M.; NGUYE, D.K; BROWDY, G.L; COLLET, B.; THOMPSON, K.D. The effects of feeding immunoestimulant β -glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. **Fish and Shelfish Immunology**. V.45, p. 357-366, 2015.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

RODRIGUES, G. K.; SADO, R. Y. Concentração de lisozima sérica e no muco em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com cortisol exógeno. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Gabriel Kyoshi Rodrigues
Estrada para Boa Esperança, Km 04, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.



