

**Estudo da via clássica do complemento na infecção in vitro por
Streptococcus agalactiae em Tilápias-do-Nilo
(*Oreochromis niloticus*)**

*Ev Study of the classical complement pathway in in vitro infection by Streptococcus agalactiae
in Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*

Gustavo de Moraes Oliveira

<http://lattes.cnpq.br/0648265252007762>

Dayanne Carla Fernandes

<http://lattes.cnpq.br/3115484005500802>

Silas Fernandes Eto

<http://lattes.cnpq.br/6012271954874161>

Luiz Flávio José dos Santos

<http://lattes.cnpq.br/5888302973425312>

Joao Martins Pizauro Junior

<http://lattes.cnpq.br/3958124498479090>

RESUMO

Streptococcus agalactiae (*Sta*) causa grandes perdas na tilapicultura. A defesa do hospedeiro envolve o sistema complemento (SC) e células fagocíticas. A via clássica do SC, ativada pela ligação de C1q a anticorpos ligados à bactéria, promove a opsonização e fagocitose por macrófagos, que eliminam o patógeno através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da enzima fosfatase ácida (FAC). Este estudo avaliou *in vitro* a neutralização de *Sta* pela via clássica do SC e a ativação de monócitos de tilápia por proteínas de membrana (PM) da bactéria. Anticorpos produzidos contra PM inibiram significativamente o crescimento bacteriano, com efeito máximo quando combinados com o complemento (via clássica). Monócitos expostos às PM diferenciaram-se em macrófagos e aumentaram a produção de EROs e atividade da FAC. Concluiu-se que a via clássica do SC é altamente eficaz na neutralização de

Sta e que as PM bacterianas ativam robustamente monócitos, desencadeando respostas efectoras. Os resultados apoiam estratégias baseadas em imunização para controlar a estreptococcose.

Palavras chave: EROs; Fagocitose; Opsonização; Streptococcus

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae (Sta) causes significant losses in tilapia farming. Host defense involves the complement system (CS) and phagocytic cells. The classical CS pathway, activated by the binding of C1q to antibodies bound to the bacterium, promotes opsonization and phagocytosis by macrophages, which eliminate the pathogen through the production of reactive oxygen species (ROS) and the enzyme acid phosphatase (AFc). This study evaluated in vitro the neutralization of Sta by the classical CS pathway and the activation of tilapia monocytes by bacterial membrane proteins (MP). Antibodies produced against PM significantly inhibited bacterial growth, with maximal effect when combined with complement (classical pathway). Monocytes exposed to PM differentiated into macrophages and increased ROS production and FAc activity. It was concluded that the classical SC pathway is highly effective in neutralizing Sta and that bacterial PM robustly activates monocytes, triggering effector responses. These results support immunization-based strategies to control streptococcosis.

Keywords: ROS; Phagocytosis; Opsonization; Streptococcus

1 INTRODUÇÃO

A tilapicultura destaca-se como um setor de grande importância econômica no Brasil, gerando significativa contribuição para o PIB nacional e milhões de empregos diretos e indiretos (BRASIL, 2014). A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta vantagens zootécnicas como adaptabilidade a diferentes ambientes, aceitação de mercado, valor comercial e custo de produção reduzido (ZIMMERMANN; HASPER, 2003). No entanto, a intensificação da produção tem acarretado desafios sanitários, com aumento do estresse dos animais e maior susceptibilidade a doenças infecciosas (MARTINS et al., 2006).

Dentre os patógenos que mais impactam a piscicultura o *Streptococcus agalactiae* (Sta) destaca-se como agente causador de significativas perdas econômicas, além de representar um risco zoonótico por sua capacidade de infectar humanos, podendo evoluir para sepse e meningite (DOMELIER et al., 2008). No Brasil, surtos causados por Sta já foram registrados em onze estados, incluindo os maiores produtores, como Paraná e São Paulo (MIAN et al., 2009).

Um dos mecanismos de virulência do *Sta* é a produção da enzima C5a peptidase, que cliva a molécula C5a do sistema complemento, inibindo a quimiotaxia e reduzindo a fagocitose (CHENG et al., 2001). Por outro lado, a ativação da via clássica do complemento iniciada pela ligação de C1q ao complexo antígeno-anticorpo pode promover a opsonização do patógeno e potencializar sua eliminação por fagócitos (SCOTT, 2004). Estudos em *Streptococcus pneumoniae* demonstraram que a molécula C1q pode ser utilizada pelo patógeno como fator de adesão e invasão, mas em *Sta* isolado de leite bovino a ativação da via clássica resultou em deposição de C3b na superfície bacteriana, favorecendo a opsonização (RAINARD; POUTREL, 1995).

Ainda não está claro se *Streptococcus agalactiae* utiliza mecanismo similar de virulência ou se a ativação da via clássica pelo complexo C1q/Fc tem efeito sinérgico na neutralização do patógeno. Este estudo buscou preencher essa lacuna, tendo como objetivo investigar *in vitro* o papel da via clássica do complemento e de IgM na neutralização de *Sta*, bem como o potencial de ativação de monócitos de tilápia-do-Nilo por proteínas de membrana do patógeno. Os resultados poderão contribuir para o entendimento da fisiopatologia da infecção e dos mecanismos de defesa imune inata e adaptativa nessa espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Infectório de Animais de Laboratório e no Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas da FCAV/UNESP, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal (CEUA nº 17209/15).

Cultivo bacteriano e preparo de proteínas de membrana (PM)

A cepa de *Streptococcus agalactiae* foi cultivada em caldo BHI a 28°C por 48 horas. As bactérias foram centrifugadas, lavadas com PBS 0,15 M (pH 7,2) e ressuspensas na concentração de 2×10^6 bactérias/mL. A viabilidade foi verificada com azul de toluidina em câmara de Neubauer.

Produção de anticorpos anti-*Sta*

Cinco tilápias-do-Nilo (linhagem Gift, ~150 g) foram imunizadas por via celomática com 100 µg/mL de PM de *Streptococcus agalactiae* conjugada com adjuvante incompleto de Freund, com reforços foram realizados com intervalo de 15 dias, e os soros foram coletados por punção caudal, centrifugados e armazenados a -70°C.

Aglutinação direta

O título de anticorpos foi determinado por aglutinação direta (FERNANDES et al., 2015). Soros (pré-imune, 15 e 30 dias) foram inativados termicamente (47°C, 30 min), diluídos serialmente

em microplacas e incubados com suspensão bacteriana (10^4 UFC/mL). A aglutinação foi visualizada após incubação ($28^\circ\text{C}/1\text{h} + 4^\circ\text{C}/22\text{h}$) e os títulos foram expressos em $\log_2$.

Ensaio bactericida *in vitro*

A capacidade bactericida do soro foi avaliada conforme RAO et al. (2006). Bactérias (10^4 UFC/mL) foram incubadas com: PBS (controle), soro termo-inativado (47°C , 30 min), soro nativo (via alternativa), anticorpo específico (opsonização) e anticorpo + soro nativo (via clássica). Após incubação ($28^\circ\text{C}/1\text{h}$), as amostras foram plaqueadas e as colônias contadas após 48h (software ImageJ).

Isolamento e ativação de monócitos

Leucócitos mononucleares foram isolados de sangue heparinizado por centrifugação em gradiente de Percoll 34/51%. A viabilidade celular foi verificada com azul de tripan (0,2%), e a concentração ajustada para 10^4 células/mL. Os monócitos foram ativados com PM de *Sta* (10 ng/mL), LPS ou PMA (controles positivos) e incubados por 6, 24 e 48 h.

Produção de EROs e atividade da fosfatase ácida

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi quantificada pelo teste do NBT (GRAYFER et al., 2008). A atividade da fosfatase ácida foi determinada pela hidrólise de *p*-nitrofenilfosfato (YANG et al., 1996), medindo a absorbância do *p*-nitrofenolato liberado a 405 nm.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ($p < 0,05$) (SNEDECOR; COCHRAN, 1967).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estudo foi dividido em duas partes, na primeira, avaliou-se a produção de anticorpos específicos contra proteínas de membrana de *S. agalactiae* e o efeito inibitório da via clássica e alternativa do complemento no crescimento bacteriano *in vitro*, assim como o encontrado por Fernandes et al. (2015), os anticorpos foram detectados a partir do 15º dia pós-imunização, com aumento significativo dos títulos no 30º dia (Figura 1).

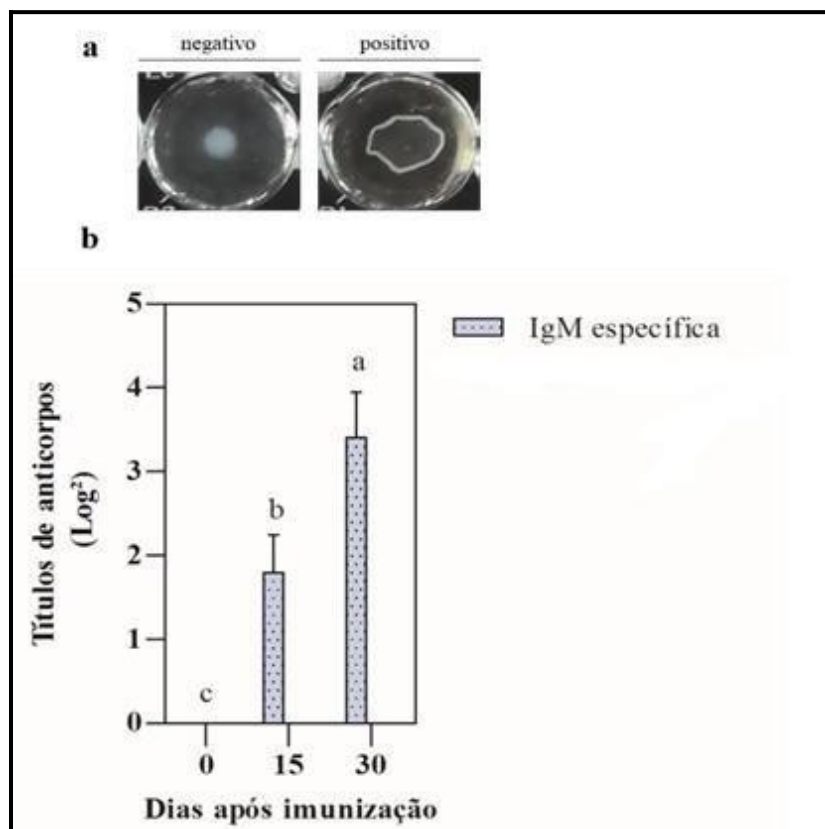


Figura 1. Em (a), padrão negativo e positivo de aglutinação direta. Em (b), cinética da produção de anticorpos em tilápias-do-nilo, imunizadas com proteínas de membrana de *Streptococcus agalactiae*, colunas com letras em comum não diferem entre si pelo método de Tukey (5%).

Fonte: Próprio autor

No ensaio bactericida, a via clássica (anticorpo + soro nativo) apresentou o maior efeito inibitório, reduzindo significativamente o crescimento bacteriano em comparação com a via alternativa, opsonização isolada e controles (PBS e soro termo-inativado) (Figura 2). Estes resultados confirmam a importância da sinergia entre anticorpos específicos e o sistema complemento na neutralização de *S. agalactiae*, apesar dos mecanismos de evasão imunológica do patógeno, como a cápsula polissacarídica e enzimas inativadoras do complemento (JARVA et al., 2003; URBACZEK et al., 1981).

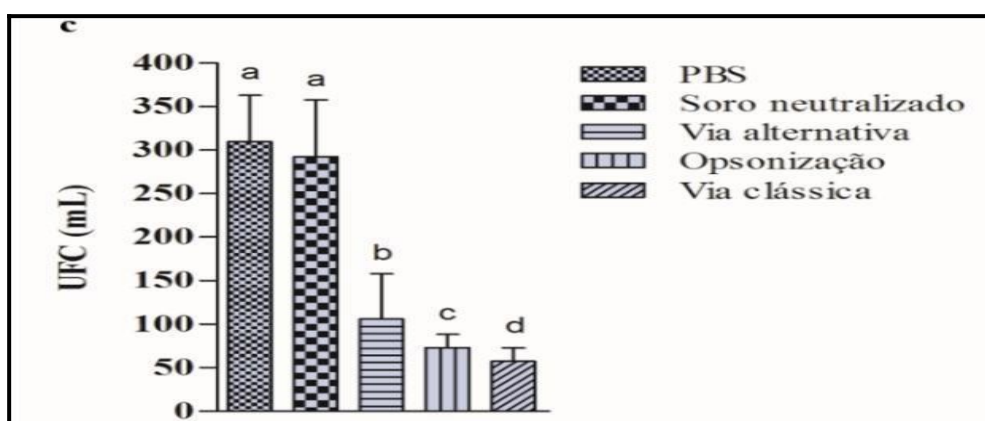


Figura 2. Efeito inibitório do crescimento bacteriano das diferentes vias do complemento no soro de tilápias-do-nilo, médias em triplicata, colunas com letras em comum não diferem entre si pelo método de Tukey (5%).

Fonte: Próprio autor

No segundo estudo, avaliou-se a ativação de monócitos de tilápia por PM de *S. agalactiae*. As proteínas de membrana (10 ng/mL) induziram diferenciação morfológica em macrófagos após 48 h, com eficácia similar aos controles positivos (LPS e PMA) (Figura 3).

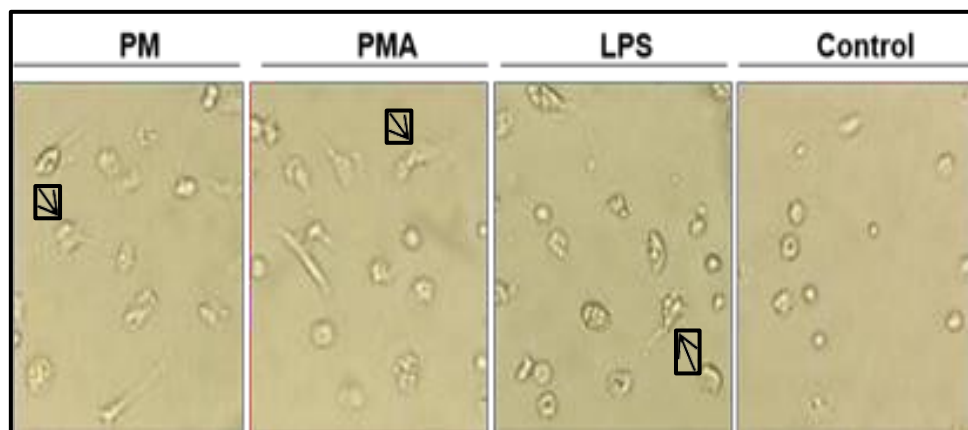


Figura 3. Contraste de fase mostrando a diferenciação morfológica de monócitos em macrófagos após 48 horas de ativação para cada tratamento. Setas apontam para macrófagos.

Fonte: Próprio autor

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a atividade da fosfatase ácida (FAC) foram significativamente elevadas nas células tratadas com PM, especialmente em 48 h, indicando ativação fagolisossômica robusta (Figura 4a-b), similar ao encontrado por Fagundes et al. (2013).

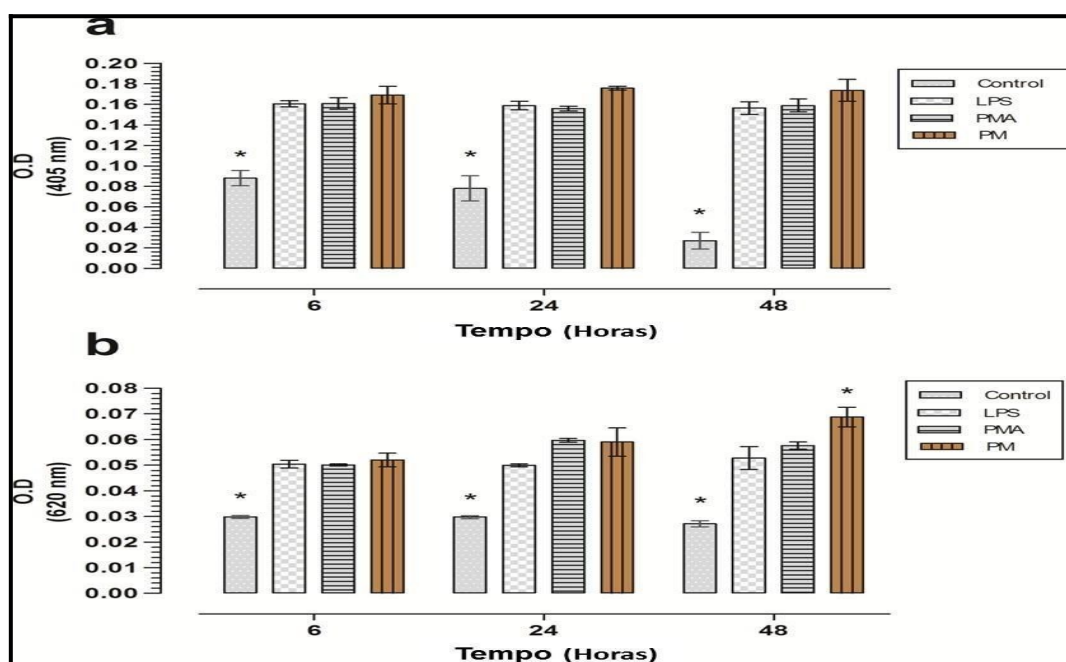


Figura 4. Atividade fagolisossômica de monócitos sanguíneos ativados com PM de Sta. (a) Atividade da FAC. (b) Produção de EROs. Médias em triplicata, (*) diferem ($P < 0,05$) pelo método de Tukey (5%).

Esses resultados sugerem que as PM ativam múltiplos receptores de reconhecimento padrão em monócitos, desencadeando respostas imunes inatas efetivas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que a via clássica do complemento, ativada por anticorpos específicos, é altamente eficaz na neutralização *in vitro* de *S. agalactiae*, superando a ação isolada de anticorpos ou da via alternativa. Além disso, as PM bacterianas ativam monócitos de tilápia, induzindo diferenciação em macrófagos e estimulando a produção de EROs e atividade enzimática lisossômica, componentes-chave da resposta imune inata. Esses achados sustentam o potencial de estratégias baseadas em imunização ou terapia com anticorpos para o controle da estreptococcose em tilápias, embora mais estudos sejam necessários para elucidar interações específicas com fatores de virulência bacterianos.

AGRADECIMENTOS

A Unesp Câmpus Jaboticabal pela infraestrutura cedida.

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura**. Brasília: MPA, 2014.

CHENG, Q. I. et al. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. **Infection and immunity**, v. 69, n. 4, p. 2302-2308, 2001.

DOMELIER, Anne-Sophie et al. Molecular characterization of erythromycinresistant *Streptococcus agalactiae* strains. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1227-1233, 2008.

FAGUNDES, L.C.; ETO, S.F.; MARCUSSO, P.F.; FERNANDES, D.C.; MARINHO- NETO, F.A.; CLAUDIANO, G.S.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; LOYOLA, W.; FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSSO, P. F.; VIEIRA, F.; SHIMADA, M. T.; SILVA, T. F.; SOUZA, E. C.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. FIGUEIREDO, H.C.P. In silico prediction of conserved vaccine targets in *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, cattle, and human samples. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 2902-2912, 2013. Fisheries Circular nº 886, Ver. 1, Roma,

FERNANDES, Dayanne Carla. *Imunodiagnóstico de Aeromonas hydrophila em pacus (Piaractus mesopotamicus, Holmberg, 1887) infectados experimentalmente*. 2015. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, Câmpus de Jaboticabal, 2015. 45 f.

GRAYFER, L.; WALSH, J.G.; BELOSEVIC, M. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor alpha. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, p. 532-543, 2008.

JARVA, H.; JOKIRANTA, T.S.; WURZNER, R.; MERI, S. Complement resistance of Streptococci. **Molecular immunology**, v.40, p.95-107, 2003

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthues: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.32, p.31 - 39, 2006.

MIAN, G. F. ET AL. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, London, v. 136, n. 1/2, p. 180-183, Apr. 2009.

RAINARD, P.; POUTREL, B. Deposition of Complement Components on *Streptococcus agalactiae* in Bovine Milk in the Absence of Inflammation. **Infection and Immunity**. Nouzilly, v. 69, n. 9, p. 3422-3427, 1995.

RAO, W.V.; DAS, B.K.; JYOTYRMAYEE, P.; CHAKRABARTI, R. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*, **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p.263-273, 2006.

SCOTT, T. R. Our Current Understanding of Humoral of Poultry. **Poultry Science**, v. 83, p. 574-579, 2004.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University Press, 1974.

SNEDECOR, George W.; COCHRAN, William G. **Statistical Methods**. Ames. 1967.

Streptococcus agalactiae and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal Wildlife Diseases**, v. 42, p. 561-9, 2006.

URBACZEK, A.N.; TOLLER-KAWAHISA, J.E.; FONSECA, L.M.; COSTA, P.I., FARIA, C.M.Q.G.; AZZOLINI, A.E.C.S.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; MARZOCCHIWINKELESTEIN, J.A. The role of complement in the host's defense against *Streptococcus pneumoniae*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 3, p. 289-98, 1981.

YANG, TE-TUAN, PARISA SINAI, AND STEVEN R. KAIN. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. **Analytical biochemistry**, p. 103-108, 1996.

ZIMMERMANN, S.; T.O.B. HASPER. 2003. Piscicultura no Brasil: o processo de intensificação da tilapicultura. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 40., 2003, Santa Maria. Anais. Santa Maria: SBZ. CD.