FERNANDA CARDOSO

Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em Trutas Arco-Íris
(*Oncorhynchus mykiss*)

São Paulo

2014

FERNANDA CARDOSO

**Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em Trutas Arco-Íris
(*Oncorhynchus mykiss*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3014
FMVZ

Cardoso, Fernanda
Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em trutas Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*) / Fernanda Cardoso. -- 2014.
135 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

1. Leucócitos. 2. Indoleamina 2,3-Dioxigenase. 3. Órgãos hematopoiéticos. 4. Trutas Arco-íris. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em Trutas Arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*)", protocolado sob o nº 2594/2012, utilizando 50 (cinquenta) trutas, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Expression of Indoleamine-2,3-dioxygenase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", protocol number 2594/2012, utilizing 50 (fifty) trouts, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CARDOSO, Fernanda

Título: Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em Trutas Arco-Íris
(*Oncorhynchus mykiss*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Always pass on what you have learned.” (“Sempre passar o que você aprendeu.”)

MESTRE YODA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Fernando e Sonía, e irmã Isis que sempre me incentivaram, apoiaram e ajudaram a todo instante, me fizeram acreditar que tudo é possível, desde que sejamos honestos, e que sonhar e concretizar os sonhos só dependerá de nossa vontade. Obrigada por serem a minha referência de tantas maneiras e estarem sempre presentes na minha vida de uma forma indispensável. Agradeço pelo amor incondicional, pelos valores e exemplo de vida, sem eles eu não seria nada. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, pela companhia constante e tão querida, orações, palavras, abraços e aconchego, compreensão, incentivo para que eu pudesse seguir em frente. Em especial minhas avós Tereza e Ilda, tia Celina, tia Silvia, tia Claudia que sempre me protegeram através de suas orações.

À Dra. Yara Aiko Tabata e ao Dr. Marcos Guilherme Rigolino (*in memorian*), pelos conselhos, apoio, incentivo à pesquisa, por me ensinar a pesquisar com amor e dedicação. Obrigada pela paciência, orientação, amizade e por me receber em suas vidas. Exemplo da minha vida profissional.

Ao meu querido professor e orientador Dr. José Roberto Kfoury Junior, por me receber em sua equipe, pela paciência, e ensinamentos. Obrigada pela orientação.

Ao Professor Dr. Francisco Javier Hernandez Blazques e a Professora Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, grandes pesquisadores, obrigada por abrirem as portas de seus laboratórios para que eu pudesse realizar grande parte deste trabalho, Agradeço por compartilhar comigo seus conhecimentos.

A todos os meus primos em especial Flavinha, pela sua amizade, e Mariana por sempre me fazer companhia nesta nossa jornada em São Paulo. Aos tios e tias em especial meu tio Celso Cardoso (*in memorian*), que foi um exemplo de perseverança e luta para com a vida.

Ao Guilherme, por me ajudar de todas as formas, abrindo mão de algumas coisas para que eu pudesse finalizar este trabalho. Obrigada pelo apoio e por passar 9 anos ao meu lado.

À tia Keiko, e tia Silvana por me receberem em suas casas e em suas vidas com todo carinho, e pela imensa paciência. Obrigada por cuidar de mim.

Agradeço a Danielle Carvalho, pela amizade de mais de 10 anos, pela ajuda e apoio durante todo este tempo, principalmente nesta reta final, na qual eu não conseguiria superar sem você.

A Vívian Ludka Cynamon e ao Fabricio Rezende, pela longa amizade. Obrigada por existirem na minha vida. Um brinde a esta amizade tão boa.

Nem sei como agradecer aos amigos verdadeiros que fiz durante esta aventura que foi fazer mestrado. Juliana Shimara Pires Ferrão, obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, pelas palavras de conforto, pelos abraços gostosos que só você sabe dar. Amizade para sempre.

Em especial não só agradeço como dedico este trabalho aos trolhas: Cris, Dú e Bianor, por virem coletar em Acapulco, trabalhamos bastante, comemos bastante, bebemos e demos muitas risadas. Tudo isso com frio abaixo de zero, (-3 graus), água congelante, nitrogênio acabando (desespero), momentos de descontração desenhando na lousinha, cafezinho para esquentar, ponte quase caindo, polícia dando batida no carro do Bianor, enfim muitos momentos inesquecíveis ao lado de vocês.

Cristiane Cagnoni Ramos, trolhinha, uma amiga para todas as horas, para coletar, para dar risada principalmente, para virar a noite escrevendo, ouvindo Shakira, Lady Gaga, pelos Cris festivals com muita comida boa, pelos passeios na vila Madalena, minha companheira para todos os momentos. Obrigada por me apoiar, sem você este mestrado seria impossível de terminar, obrigada pela força, incentivo, por ouvir meus segredos. Amizade verdadeira é essencial e para a vida toda.

Como não poderia faltar o TROLHA CHEFE, o Nono Carlos Eduardo Malavasi Bruno, meu melhor amigo e também o mais idiota e engraçado, sem você “Campos do Jordão no lo haria el paraíso”, obrigada por ser meu amigo, por estar ao meu lado nos momentos de descontração e também nos momentos mais difíceis, os verdadeiros amigos nós conhecemos nos piores momentos. Não vou esquecer as

nossas coletas e cursos, andamos de trator, como se fosse “terra nostra” e pensamos em trabalhos mirabolantes. Agradeço a Jéssica Leite Cavalcanti Bruno sua linda e querida esposa que sempre compreendeu e aceitou que você ficasse mais tempo com a gente do que com ela. Meus queridos, amo vocês demais.

Ao querido amigo André Luiz Veiga Conrado que ganhou um apelido durante a coleta e pegou BIANOR, obrigada pela grande ajuda neste trabalho pela companhia para tomar café e para comer no leite na pista, obrigada pela ajuda com as coletas e principalmente pela ajuda com a estatística, mesmo distante você continuará sempre nosso amigo.

Ao querido amigo Diogo Nader Palermo, e Joana Mona, pela ajuda incondicional, por me abrigar em seu “bunquer” aos cafezinhos da tarde, almoços e churrascos descontraídos, por me ajudar e me ensinar toda a arte da Imuno-histoquímica. Obrigada pelas conversas intermináveis de papo cabeça a muitas risadas, nunca me esquecerei de vocês.

Queridas amigas Renata Gabriel Fontinele e Graziela Menck por serem as primeiras a falar comigo neste departamento, por serem amigas mesmo a distância. Obrigada por me ensinar alguns valores essenciais para a vida, por segurar a minha barra literalmente.

Ao “colega” Thierry Salmon, pela convivência, amizade, brincadeiras, palavras sem sentido, às saídas mais sem sentido ainda. Obrigada por ajudar com o trabalho, pela amizade regada a Heineken.

Aos amigos do Blog João Leonardo Mendonça Dias, pelos conselhos Jedi’s Juliana Catoia, apesar de torcer para um time horroroso (Corinthians) me ajudou muito, só ouvindo minhas reclamações, Simone Palmeira, pelas pérolas engraçadíssimas, e pela incrível amizade. Vocês foram essências durante esta jornada

A todos os amigos da pós-graduação, Bianca Rangel, Renan Olio, Thiago Pinheiro Arrais Aloia, Camila Ercolini Barroso, Antenor Bonfim, Gabriela Mendes,

Fernanda Menezes, Graciela Pignatari, Leandro Rui, Amilton C. Santos, Adriana, Fabiele Russo, Isabela Fernandes, Dilayla Abreu, Marcos Vinicius Mendes Silva, Lilian Oliveira, Renata Avancini Fernandes Nogueira, Silvia Lima, Rafael Senos, Rafael Magdanelo Leandro, Sonia Will, Amanda Carolina Montevechi Pampaloni obrigada a todos que conheci e que fizeram parte deste momento muito importante da minha vida.

Aos queridos estagiários e ICs, os melhores do mundo, Fernanda Bastianelo Juliana Marinho, Augusta Mello, Will Reina, Beatriz Calixto, Letícia Palmeira, vocês vão longe.

Aos queridos funcionários que fiz na UPD em Campos do Jordão, que me auxiliaram com os peixes e me ensinaram a trabalhar com alegria, *Lé, Pulga, Cidinha, e Rosana*.

Aos Funcionários do Setor de Anatomia Veterinária, Maicon Barbosa da Silva, Jaqueline Martins de Santana, Edinaldo Ribas Farias (Índio), Ronaldo Agostinho da Silva, André Luiz Rezende Franciulli pela atenção, amizade, convivência e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos queridos amigos que eu fiz no IO, Priscila Sartório, Caroline Margonato, Alex Sander Dias Machado, Dani Abras, Caroline Vignardi, Fabio Hasue, Professor Vicente, por todo apoio, amizade.

A coordenadora da pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, professora Dra. Maria Angélica Miglino, por abrir as portas do departamento para que este trabalho pudesse ser realizado

E a **todos** que ajudaram direta ou indiretamente para que esse projeto fosse realizado.

RESUMO

CARDOSO, F. **Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em Trutas Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*)**. [Expression of the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)]. 2014. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima que cataboliza o aminoácido triptofano, levando à inibição da proliferação de linfócitos T, seja pela exaustão desse aminoácido no ambiente, ou pela indução via catabólitos induzindo-os a apoptose. Em mamíferos, esta enzima atua em diversas condições do organismo como a gestação, infecções, inflamações crônicas, transplantes e tumores, sendo reconhecida como uma autêntica reguladora imunológica. Estudos recentes identificaram a presença de moléculas homólogas a IDO em espécies filogeneticamente mais antigas que os mamíferos placentados, sendo que o papel da IDO primitiva não está totalmente elucidada. Sabe-se que em fungos e bactérias a IDO limita-se ao metabolismo do triptofano para obtenção de energia e que em vertebrados inferiores sua função ainda não é bem esclarecida. Desta forma, este estudo teve por objetivo averiguar a presença da IDO em células sanguíneas e órgãos hematopoiéticos de trutas arco-íris, colaborando para o estudo filogenético do sistema imune nos vertebrados, particularmente dos peixes. A expressão de IDO foi observada em todos os órgãos hematopoiéticos estudados incluindo os leucócitos e também foi observada marcação positiva para a enzima em pequenos vasos sanguíneos do rim cefálico, baço e fígado. Os resultados obtidos, apresentando marcações positivas da IDO restritas em leucócitos e tecidos hematopoiéticos de trutas arco-íris, poderiam significar a primeira evidência de que a IDO, à semelhança do que ocorre nos mamíferos, possa estar relacionada ao sistema imunológico nesta espécie.

Palavras-chave: Indoleamina 2,3-Dioxigenase. Trutas Arco-íris. Leucócitos. Órgãos hematopoiéticos.

ABSTRACT

CARDOSO, F. **Expression of the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. [Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em Trutas Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*)]. 2014. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme that catabolizes the amino acid tryptophan, leading to inhibition of T lymphocyte proliferation by exhaustion of this amino acid in the environment, or by induction via the catabolites inducing apoptosis. In mammals, this enzyme acts on various conditions such as pregnancy, infections, chronic inflammation, transplantation and tumors, being recognized as an authentic immune regulator. Recent studies have identified the presence of homologous IDO in older phylogenetically related species molecules, the placental mammals, and the role of early IDO is not fully elucidated, it is known that in fungi and bacteria the role of IDO is limited to tryptophan metabolism for energy, and its function in lower vertebrates is still not well understood. This study aims to investigate the presence of IDO in peripheral blood cells and hematopoietic organs of rainbow trout, thereby contributing to the phylogenetic study of the immune system in vertebrates, particularly in fish. The expression of IDO was observed in the inner region of small blood vessels in the head kidney, spleen, liver and peripheral blood cells, mainly in monocytes and lymphocytes. The restricted localized expression of IDO in these tissues and cells, as occurred in mammals, may suggest a first evidence for a putative role of this enzyme in the immune system in rainbow trout.

Keywords: Indoleamine 2,3-dioxygenase. Rainbow Trout. Leucocytes. Hematopoietic organs.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

IDO	indoleamina 2,3 dioxigenase
%	porcentagem
°C	Graus Celcius
GALT	Tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal
µm	Micrômetro
MHC	Complexo de histocompatibilidade
DCs	Células dendríticas
APCs	Células apresentadoras de antígenos
NK	Natural killer
L-Trp	L-Triptofano
Kyn	Quinurenina
IFN-γ	Interferon-gama
Th-1	T helper 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TDO	Triptofano 2,3-dioxigenase
Trp	Triptofano
NAD+	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório
rpm	Rotações por minuto
pH	Potencial hidrogeniônico
®	Marca Registrada

LAMIH	Laboratório de anatomia microscópica e imuno-histoquímica
PBS	Tampão fosfato-salino
HE	Hematoxilina de Harris
PVDF	Membrana de Transferência de fluoreto de polivinilidene
μl	Microlitro
SDS	Sodium dodecyl sulfate
DTT	Dithiothreitol
#	Número
mA	Miliampere
TTBS	Tris-Buffered Saline
ECL	Enhanced chemiluminescence
kDa	Kilodalton
F	Fígado
B	Baço
C	Controle
S	Sangue
R	Rim cefálico
V	Vaso sanguíneo
NB	Novus biologicals
WB	Western blot
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (algoritmo que compara informações de sequências biológicas primárias, tais como sequências de aminoácidos de diferentes proteínas ou nucleotídeos de sequências de DNA)
DAB	Diaminobenzidina
Psp	Quantidade suficiente para

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagens da coleta de trutas arco-íris (A) Anestesia, (B) Punção sanguínea, (C) rim cefálico localizado na porção cranial, (D) baço, (E) fígado (F) fim cefálico, baço e fígado, procedimento realizado na Estação Experimental de Salmonicultura Dr. Ascânio de Farias- APTA - Campos do Jordão.....	51
Figura 2-	Western blot IDO e β -actina reveladas pelo ImageQuant 350 (GE Helthcare).....	60
Figura 3-	Western Blot IDO a mesma membrana reveladas em dois tipos de contraste, no preto (A) e no branco (B).....	60
Figura 4-	Imuno-histoquímica para o teste dos anticorpos (A,B, C, D) utilizando o EB090548, (E,F,G, H) utilizando o anticorpo LSB1746, (I, J, K, L) com o anticorpo de escolha NB1002459.....	62
Figura 5-	Controle negativo para as imuno-histoquímicas dos testes com os anticorpos, (A1, B1, C1, D1) representa o controle negativo do EB09548, (E1, F1, G1, H1) refere-se ao LSB1746 e o (I1, J1, K1, L, representando o controle negativo do anticorpo NB1002459.....	63
Figura 6-	Imuno-histoquímica do baço sem contra-coloração para mensuração.....	65
Figura 7-	Imuno-histoquímica do baço (A, B), marcação positiva, (A1, B1) controle negativo.....	66
Figura 8-	Imuno-histoquímica do baço (A) marcação positiva (a) controle negativo.....	67

Figura 9-	Imuno-histoquímica do fígado sem contra-coloração para mensuração.....	68
Figura 10-	Imuno-histoquímica do fígado (A, B), marcação positiva, (A1, B1) controle negativo.....	69
Figura 11-	Imuno-histoquímica do fígado (A) marcação positiva (a) controle negativo.....	70
Figura 12-	Imuno-histoquímica do rim cefálico sem contra-coloração para mensuração.....	71
Figura 13-	Imuno-histoquímica do rim cefálico (A, B), marcação positiva, (A1, B1) controle negativo.....	72
Figura 14-	Imuno-histoquímica do rim cefálico marcação positiva (A) controle negativo (a).....	73
Figura 15-	Controles endógenos, tumor de cadelas (A) cólon de camundongo (C) controle negativo endógeno (B, D).....	75
Figura 16-	Imuno-histoquímica do imprint de rim cranial marcação positiva (A, B) e controle negativo da amostra (A1, B1).....	76
Figura 17-	Imuno-histoquímica das extensões sanguíneas marcações positivas (A, B, C, D).....	78
Figura 18-	Imuno-histoquímica diferencial de leucócitos marcação positiva (A) e controle negativo (a).....	79
Figura 19-	Marcação positiva para IDO em células sanguíneas de trutas arco-íris (A, B, C, D) e controles negativos (A1, B1, C1 D1).....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Mensuração das marcações positivas (área/Frame por μm^2) e a área com os tecidos marcados em porcentagem (%).....	74
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variantes da IDO.....	47
----------------------------------	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVO	27
2.1	JUSTIFICATIVA	27
3	REVISÃO DE LITERATURA	29
3.1	TRUTA ARCO-IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	29
3.2	SISTEMA IMUNE DE PEIXES TELEÓSTEOS	30
3.3	ÓRGÃOS QUE COMPÕEM O SISTEMA IMUNE DOS PEIXES TELEÓSTEOS	32
3.3.1	Rim cefálico	32
3.3.2	Timo	34
3.3.3	Fígado	35
3.3.4	Baço	36
3.4	CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE DE PEIXES TELEÓSTEOS	37
3.4.1	Linfócitos	37
3.4.2	Monócitos	38
3.4.3	Neutrófilos	40
3.4.4	Eosinófilos	40
3.4.5	Basófilos	41
3.4.6	Trombócito	41
3.5	INDOLEAMINE 2,3 - DIOXIGENASE (IDO)	42
3.6	A INDOLEAMINA 2-3 DIOXIGENASE E A FILOGENIA DA IMUNIDADE	44
4	MATERIAL E MÉTODO	49
4.1	ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO	49
4.2	COLETA DE MATERIAL	50
4.3	INCLUSÃO E CORTE DE MATERIAL	52
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA	52
4.4.1	Imuno-histoquímica para extensão sanguínea e imprint	53
4.4.2	Imuno-histoquímica para rim, baço e fígado	54
4.5	WESTERN BLOT	55
5	RESULTADOS	59
5.1.	RESULTADOS DO WESTERN BLOT	59
5.2	RESULTADOS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA	61

5.2.1.	Resultados do teste com os anticorpos	61
5.3	RESULTADO DA EXPRESSÃO DA IDO NO BAÇO	64
5.4	RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO NO FÍGADO	67
5.5.	RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO NO RIM CEFÁLICO	70
5.6.	RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO NO IMPRINT DO RIM CEFÁLICO	75
5.7.	RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO EM CÉLULAS SANGUÍNEAS	77
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A	106
	APÊNDICE B	116
	APÊNDICE C	117

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A truta arco-íris é considerada um modelo experimental importante, pois é amplamente utilizada em diversos centros de pesquisa. Segundo Gall e Crandell, (1992), com exceção da carpa comum, a truta arco-íris é uma das espécies mais antigas empregadas em cultivo.

Os peixes, de modo geral, dispõem de mecanismo de defesa inato e adquirido (GARCIA-LEME, 1989), representando o primeiro grupo de vertebrados a ter desenvolvido imunidade adquirida. Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de compreender os mecanismos envolvidos, bem como compará-los aos mamíferos; no entanto, devido à falta de marcadores específicos para células imunes de peixes, esta tarefa torna-se mais difícil (LOVY et al., 2009).

Em geral, o sistema imune de peixes é semelhante ao dos vertebrados superiores, com algumas diferenças. Pesquisas relacionadas com a fisiologia, filogenia e ontogenia do sistema imunológico de peixes vêm aumentando, principalmente entre as espécies de maior comercialização, porém, esse conhecimento ainda é escasso se for comparado ao dos mamíferos (ENANE et al., 1993).

A imunidade dos peixes pode ser dividida em imunidade inata, que constitui a primeira linha de defesa, e em imunidade adquirida, que é dependente de anticorpos, ambas podem ser mediadas por células ou pela imunidade humoral (IWAMA; NAKANISHI, 1997).

A imunidade inata envolve os leucócitos, que desenvolvem várias ações como, por exemplo, a inflamação e a fagocitose. Esta é composta por várias substâncias como as lisozimas, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina, que podem ser comumente encontradas no muco, soro e ovo dos peixes e inibem o crescimento de microrganismos infecciosos (SECOMBES, 1996; YANO, 1996). A imunidade adquirida é mais específica e pode desencadear uma resposta humoral, que é mediada por anticorpos ou uma resposta mediada por células, ambas proporcionam ao indivíduo proteção e memória imunológica (SHOEMAKER; KLESIOUS; LIM, 2001). Neste estudo foi avaliado os principais órgãos hematopoiéticos que fazem parte do sistema imunológico, como o rim cefálico, baço e o fígado, e as células sanguíneas.

A medula óssea e os linfonodos estão ausentes nos peixes. Em trutas arco íris o rim cefálico é o principal responsável pela hematopoiese (FORERO, 1995), assemelhando-se morfológicamente à medula óssea dos vertebrados superiores (MESEGUER; LOPEZ-RUIZ; GARCIA-AYALA, 1995). O rim cranial ou cefálico é considerado um órgão primário diferenciador de células, além de ser o principal tecido hematopoiético, possui função endócrina e imunológica, atuando na produção de anticorpos e catecolaminas (ZAPATA, 1981). Já o baço é considerado um órgão linfóide secundário, sendo responsável pela especialização dos leucócitos (HORTON; LACKIE, 1989). O fígado apresenta um papel semelhante no que se referem ao sistema imunológico de mamíferos, suas funções incluem a assimilação de nutrientes, produção de bile, desintoxicação e manutenção da homeostase metabólica, que inclui processamento de carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas, pois o fígado é responsável pela produção de proteína reativa, que compõe a cascata de eventos desencadeada pelo sistema complemento desempenhando um papel importante na síntese de proteínas plasmáticas (FLETCHER, 1981).

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima oxigenase que cataboliza o aminoácido triptofano, levando à inibição da proliferação de linfócitos T, seja pela exaustão desse aminoácido no ambiente ou pela indução via catabólitos a apoptose (BARKSDALE et al., 2004). A IDO em mamíferos é expressa em diversos tecidos como o cerebral, pulmonar, cardíaco, renal e intestinal (TAKIKAWA et al., 1986) e também por alguns tipos celulares, como monócitos *in vitro*, células tumorais (MUNN; SHARMA; LEE, 2002) e por células trofoblásticas (MUNN et al., 1998). A IDO é reconhecida como um autêntico regulador da imunidade em diversas condições do organismo que se utilizam de mecanismos de evasão do sistema imunológico, como por exemplo, a gestação, infecções, alergias, inflamações crônicas, transplantes e tumores (PALLOTA et al., 2011).

Estudos *in vitro* vêm demonstrando que a expressão da IDO por monócitos que derivam os macrófagos e células dendríticas podem inibir a proliferação de células T (MUNN et al., 2004).

Os conhecimentos em imunologia de peixes teleósteos ainda não estão totalmente elucidados se comparados ao dos mamíferos, portanto estudos nesta área tornam-se uma ferramenta importante que poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos do sistema imunológico da truta arco-íris. Informações sobre a

presença ou função dessa enzima em peixes são escassas e, uma vez que filogeneticamente esta classe de animais sofreu mudanças significativas na evolução do sistema imunológico, formulou-se a hipótese de que, se confirmada a presença da IDO em trutas arco-íris (*oncorhynchus mykiss*), esta poderia participar de um processo regulatório da resposta imune nesses animais.

A constatação da existência da expressão da IDO em leucócitos e nos órgãos hematopoiéticos trará contribuições efetivas para o entendimento de mecanismos de regulação nessa espécie animal. A avaliação da presença da IDO em células sanguíneas e órgãos hematopoiéticos de trutas arco-íris poderia evidenciar a existência de mecanismos reguladores da resposta imunológica, corroborando, dessa forma, para o estudo filogenético do sistema imunológico nos vertebrados, particularmente dos teleósteos.

Objetivos e Justificativa

2 OBJETIVO

Averiguar a expressão de IDO em células sanguíneas e em órgãos hematopoiéticos, baço, fígado e rim cefálico de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), adultas pela técnica de imuno-histoquímica.

2.1 JUSTIFICATIVA

Informações sobre a presença ou função dessa enzima em peixes são escassas, uma vez que filogeneticamente esta classe de animais sofreu mudanças significativas na evolução do sistema imunológico, formulou-se a hipótese de que se confirmada a presença da IDO em trutas arco-íris, estas poderiam estar envolvidas em processos regulatórios da resposta imunológica nesses animais.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TRUTA ARCO-IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

A truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* está classificada na ordem Salmoniformes, família Salmonidae. Esta espécie está difundida em todo o mundo. Primeiramente descrita como *Salmo mykiss* (Walbaum, 1792), sendo que nos dias atuais utiliza-se o nome genérico *Oncorhynchus*, que corresponde a todos os salmões e trutas oriundos das drenagens do Oceano Pacífico (SMITH; STEARLEY, 1989; LAZZAROTO; CARAMASCHI, 2009).

A distribuição geográfica originária desta espécie compreende os rios e a região costeira da América do Norte e Nordeste da Ásia. Na América do Norte, sua distribuição natural se estende do sul do Alasca até o norte do México, e pode ser encontrada em todos os continentes exceto no continente Antártico. (HERSHBERGER, 1992; LAZZAROTO; CARAMASCHI, 2009).

A truta arco-íris é considerada um modelo experimental importante, pois é amplamente utilizada em diversos centros de pesquisa. Nos Estados Unidos é uma das espécies utilizadas em diversos estudos relacionados à genética, patologia e toxicidade, nutrição e ecologia (PORTO-FORESTI et al., 2002). Segundo Gall e Crandell, (1992), com exceção da carpa comum, a truta arco-íris é uma das espécies mais antigas empregadas em cultivo. As temperaturas indicadas para o cultivo da espécie estão na faixa entre 12°C e 20°C, sendo que a desova pode ser observada em temperaturas entre 5°C a 13°C, onde é fundamental estar em um ambiente com água corrente, limpa e bem oxigenada, embora também possa ser encontrada em lagos de água fria (KAILOLA et al. 1993). A truta é uma espécie que se adaptou com facilidade às condições de produção intensiva e são mais resistentes a doenças (AMARAL, 2007; SATO et al., 2011). No que diz respeito a sua capacidade de sobrevivência e reprodução, é capaz de sobreviver tanto em ambientes naturais como também em represas, tanques, laboratórios de incubação, entre outros, além de possuir um bom grau de domesticação, pois ambos os sexos amadurecem em cativeiro e aceita alimentação comercial desde sua alevinagem, estas características

agregadas com seu alto valor comercial tornaram esta espécie uma das mais estudadas e cultivadas em todo o mundo (TABATA, 1997).

Na América do Sul, as primeiras introduções de truta arco-íris ocorreram na Argentina e no Chile, na primeira década do século XX. No Brasil foi introduzida em 1949, pelo Médico veterinário Dr. Ascânio de Faria, que importou ovos embrionados da Dinamarca, a introdução das trutas nos mananciais brasileiros foi justificada, principalmente, pela ausência de espécies de peixes nativas nestes rios (LAZZAROTO; CARAMASCHI, 2009). A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) no Brasil é cultivada em água doce e apresenta hoje uma distribuição global, Sendo que em regiões tropicais sua ocorrência limita-se apenas às áreas de altitude (WELCOME 1988; LAZZAROTO; CARAMASCHI, 2009).

3.2 SISTEMA IMUNE DE PEIXES TELEÓSTEOS

O sistema imune de peixes é fisiologicamente semelhante ao dos vertebrados superiores, porém com algumas diferenças. Em contraste os peixes são organismos de vida livre e durante os estágios embrionários iniciais de vida já dependem de seu sistema imune inato para a sobrevivência. A imunidade não específica é um mecanismo de defesa fundamental para o peixe, pois desempenha um papel importante para a resposta imunitária adquirida e homeostase através do sistema de proteínas receptoras. Estas proteínas receptoras identificam padrões moleculares típicos de microorganismos patogênicos. Dividindo-os em respostas do tipo barreiras físicas e de resposta imunológica celular e humoral (URIBE et al., 2011; BERNSTEIN; SCHLUTER; MARCHALONIS, 1998). Pesquisas relacionadas com a fisiologia, filogenia e ontogenia do sistema imunológico de peixes vêm aumentando, principalmente entre as espécies de maior comercialização, porém, esse conhecimento ainda é escasso se for comparado ao dos mamíferos (ENANE et al., 1993; FALCON, 2007).

A imunidade dos peixes pode ser dividida em dois tipos: em imunidade inata (não específico), que constitui a primeira linha de defesa, composta por barreira física como, pele e muco que consiste em impedir que agentes patogênicos tenham

acesso ao organismo hospedeiro, podendo eliminar o patógeno e bloquear sua entrada e por componentes celulares e moleculares. E em imunidade adquirida (específica), caracterizada pela especificidade e memória imunológica, induzida por substâncias denominadas imunógenas. É uma resposta dependente de anticorpos, ambos podem ser mediados por células ou pela imunidade humoral (IWAMA; NAKANISHI, 1997).

A imunidade inata envolve os leucócitos, que desenvolvem várias ações como a inflamação e a fagocitose. É composta por várias substâncias como, por exemplo, as lisozimas, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina, que podem ser comumente encontradas no muco, soro e ovo dos peixes e inibem o crescimento de microrganismos infecciosos (SECOMBES, 1996; YANO, 1996).

O sistema imune inato (não específico) possui grande versatilidade, desempenhando um papel importante na resposta imune, visto que o sistema específico responde lentamente quando comparado ao de mamíferos, principalmente em temperaturas abaixo a do conforto térmico para a espécie (BLY; CLEM, 1994).

Segundo Iwama e Nakanishi (1997), fatores celulares e humorais de ambos os sistemas, específicos e não específicos, promovem nos peixes proteção externa e interna contra agentes infecciosos. Apesar da distinção na classificação desses dois sistemas de defesa, deve-se compreender que sempre que um agente patogênico ataca o organismo, este se defende mediante a interação da maioria dos elementos que compõem o sistema imunológico, onde vários fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação.

A resposta imune específica ocorre por meio de mecanismos que envolvem uma rede complexa de células especializadas, proteínas, genes e mensagens bioquímicas que fornecem os meios necessários para que o corpo responda especificamente a antígenos, anticorpos e células efectoras com elevada especificidade e afinidade (URIBE et al., 2011).

A imunidade adquirida é mais específica e pode desencadear uma resposta humoral, que é mediada por anticorpos ou uma resposta mediadas por células, ambas as respostas proporcionam ao indivíduo proteção e memória imunológica. As respostas imunes adaptativas ou específicas dependem da atividade dos linfócitos B e T, atuam na produção de imunoglobulina específica, atividade citotóxica e imunomodulação via citocinas. Existem fatores que influenciam a resposta imune

dos peixes dentre eles podemos citar a genética, pois pode haver variação individual da resposta imune inata e específica; ambiente, pois o fotoperíodo a temperatura da água e a estação do ano influenciam na sua alimentação; estresse, depende da qualidade da água, dieta, superpopulação de peixes, concentração de microingredientes e tipo de patógeno o nível de exposição e a virulência (SHOEMAKER; KLESIUS; LIM, 2001).

3.3 ÓRGÃOS QUE COMPÕEM O SISTEMA IMUNE DOS PEIXES TELEÓSTEOS

Os órgãos do sistema linfóide são divididos em órgãos primários e secundários, sendo o rim e o timo considerados como órgãos primários e o baço, tecido linfóide associado ao intestino, conhecido como GALT (tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal) e as brânquias, fígado, muco e pele como órgãos secundários (FALCON, 2007).

Em peixes de águas continentais os órgãos linfóides são constituídos pelo rim (pró e mesonefros) e baço. O primeiro órgão a se desenvolver é o timo, o rim contém progenitores hematopoiéticos não linfóides. Nos teleósteos marinhos ocorre o contrário, onde o maior órgão linfóide é o rim, depois o baço e o timo, vale ressaltar que o baço do peixe em fase larval tem função eritropoiética (COSTA, 2007).

3.3.1 Rim cefálico

A medula óssea e os linfonodos estão ausentes nos peixes, os tecidos linfóides e mielóides estão associados ao rim cefálico em teleósteos e esturjões, e ao órgão epigono em elasmobrânquios e peixe bruxa (hagfish). Os órgãos linfóides são constituídos por linfócitos, monócitos, trombócitos, granulócitos e eritrócitos. A

hematopoiese dos órgãos linfoides é diferente entre as variadas espécies de peixes teleósteos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; COSTA, 2007).

Nos teleósteos o rim cefálico (cranial) ou proto-néfrom é considerado um órgão hematopoiético, pois desempenha o papel da medula óssea como nos vertebrados superiores. É um órgão formado por várias células e tecido epitelial, o rim dos teleósteos é fundido e se encontra localizado retroperitonealmente na região dorsal da cavidade celomática, e ventralmente à coluna vertebral, e está aderido nestas regiões (FERGUSON, 1995; COSTA, 2007). O seu formato pode variar entre as espécies, nos salmonídeos o rim apresenta-se em um único órgão, enquanto que em algumas espécies podemos observar duas porções separadas. Nos teleósteos, o rim possui a função de hematopoiese na sua porção anterior ou cefálica, e na sua porção posterior ou caudal sua função é de filtração e excreção de metabólitos, o que não ocorre em outros vertebrados (KARDONG, 2011).

Este órgão é composto por uma porção anterior e uma porção posterior, ambas possuem função hematopoiética, sendo que rim anterior o mais eficiente, onde não ocorre a função renal. Isto é, o rim possui ambos tecidos, tanto o excretor quanto o hematopoiético, sendo que o tecido hematopoiético pode ser visualizado na porção anterior do rim cefálico, e todos os tipos celulares que podem ser encontrados nesta região cefálica são originados de uma única célula tronco. O rim anterior é o primeiro órgão no qual aparece o linfócito B, sendo considerado órgão primário para a diferenciação celular (ZAPATA et al., 1996; FALCON, 2007; COSTA, 2007). Além de ser o principal tecido hematopoiético, possui função endócrina e imunológica, atuando na produção de anticorpos e catecolaminas (WEYTS et al., 1999).

A hematopoiese pode variar entre as famílias de peixes (ISHIZEKI et al., 1984). Segundo Kaatari e Irwin, (1985) o rim cefálico também é um órgão linfoide secundário, sendo análogo ao linfonodo, importante na indução e elaboração da resposta imunológica. Em trutas arco-íris o rim cranial é o principal responsável pela hematopoiese (FORERO, 1995). Sua atividade hematopoiética em teleósteos pode variar de uma espécie para outra, podendo ser considerado tanto como órgão linfopoiético ou exclusivamente eritropoiético, porém algumas espécies apresentam uma função hematopoiética exclusiva (ZAPATA, 1981).

Histologicamente o rim cefálico é recoberto por uma cápsula de tecido conjuntivo fibrinoso denso (ROCHA et al., 2001; COSTA, 2007), possuindo uma rede

reticular de células estromais, macrófagos, componentes linfoides, e células granulopoieticas, trombopoieticas e eritropoieticas (células sanguíneas indiferenciadas), sendo que a maior parte das células que constituem o rim cefálico são leucócitos e eritrócitos (células vermelhas), em diferentes estágios de maturação (MELA et al., 1997; COSTA, 2007).

Das células mais evidenciadas no rim cranial são os melano-macrófagos, que podem ser encontrados livres ou agrupados no tecido. Estas células são ricas em grânulos e hemossiderina e podem estar associadas aos lisossomos. As células são pigmentadas por componentes heterogêneos ou granulares, com coloração marrom escuro. Um aumento no número destas células no rim cefálico pode estar relacionado a um aumento na atividade fagocíticas no órgão (MELA et al., 2007; COSTA, 2007).

3.3.2 Timo

A diferenciação da estrutura do timo é altamente variável em teleósteos e em muitas espécies, não é possível observar uma clara diferenciação entre o córtex e medula que é encontrada em vertebrados superiores (URIBE et al., 2011) e nos elasmobrânquios (PRESS; DANNEVIG; LANDSVERK, 1999).

O timo nos teleósteos, assim como nos vertebrados, constitui o local de desenvolvimento e maturação dos linfócitos T. O timo pode regredir com o avanço da idade e conseqüentemente perder sua função (CHILMONCZYK, 1985; FALCON 2007).

Alguns teleósteos possuem um timo desenvolvido, onde ocorre a maturação dos linfócitos T. Um estudo realizado com trutas arco-íris detectou uma expressão gênica, ativadora da recombinase, essenciais na formação de receptores de linfócitos específicos, demonstrando, que o timo é um dos locais onde ocorre a diferenciação de linfócitos T (RAZQUIN et al., 1990; BERNSTEIN; SCHLUTER; MARCHALONIS, 1998).

3.3.3 Fígado

Na maioria dos teleósteos o fígado é um órgão compacto localizado ventralmente na cavidade celomática, possui vesícula biliar bem desenvolvida, e a tríade portal, sendo que em algumas espécies o tecido pancreático exócrino pode ser observado em volta da veia porta. A função do fígado nos teleósteos é semelhante aos dos mamíferos, pois é responsável pelo controle homeostático da glicose, participa das funções metabólicas e também é responsável pela produção de proteínas serosas e de linfócitos adjacentes durante uma infecção, atuando como sistema de defesa (COSTA, 2007).

Os hepatócitos possuem características mitóticas, sendo que a sua função é de síntese, secreção, armazenamento, biotransformação e metabolismo. As células de Kupffer são células do sistema macrofágico que revestem as regiões sinusóides hepáticas. As atividades fagocíticas do fígado e estão ligadas às funções destas células (BANKS, 1992). Já Hacking, Budd e Hodson (1977) observou que o sistema sinusoidal do fígado de truta arco-íris era morfologicamente similar a de outros vertebrados, exceto pela ausência de células de Kupffer. As células associadas com os sinusóides são células de armazenamento de gordura e células endoteliais (COSTA, 2007).

Na maioria das espécies o fígado é composto por uma região uniforme de hepatócitos, compostas por tecido conjuntivo proximal aos ductos biliares e vasos arteriais. Em poucas espécies os lóbulos hepáticos estavam demarcados por tecido conjuntivo contendo ductos biliares, veia porta e artérias, similares a tríade portal em mamíferos (COSTA, 2007).

Rocha; Monteiro; Pereira, (1994) observaram regiões vascularizadas, veias artérias e ductos biliares, espalhados dentro do parênquima do fígado de *Salmo trutta*, tendo sido descrito a presença de alguns vasos sanguíneos que não estavam associados a nenhum outro vaso e outros estavam associados a veias, arteríolas. Observou-se também Células Ito, estas células foram encontradas nas ramificações com vasos venosos de pequeno calibre e as veias centrais foram observadas dispersas no parênquima (COSTA, 2007).

O fígado nos vertebrados superiores também desempenha papel na função imunológica, sendo responsável pela produção de proteína C reativas e componentes que compõem a cascata de eventos desencadeada pelo sistema complemento. Fletcher (1981) estudou os mecanismos de defesa em peixes teleósteos, e observou que o fígado realiza papel similar ao descrito na literatura referente ao sistema imunológico dos mamíferos (FALCON, 2007).

3.3.4 Baço

O Baço é um órgão linfoide secundário, possuindo várias funções não imunológicas, incluindo a filtração sanguínea e a conversão da hemoglobina em bilirrubina. Este órgão é um emaranhado de seios fagocitários, estroma de fibras reticulares e parênquima celular, não havendo diferenciação de córtex e medula. Em mamíferos o parênquima é formado por duas polpas denominadas polpa branca e polpa vermelha e em teleósteos desempenha papel citológico similar, apresentando uma separação pronunciada muito menor na polpa vermelha, contendo uma rede de cordões e polpa branca como tecido linfático (COSTA, 2007). O baço dos osteíctes não apresenta diferenciação entre polpa branca e polpa vermelha como ocorre no baço de mamíferos. As regiões contendo eritrócitos e linfócitos estão misturados (HIBIYA, 1982).

O baço é um órgão repleto de macrófagos, que desempenham um papel no sistema de defesa, produz hidrolases lisossomais, proteínas do sistema complemento e parcialmente interferon, superóxido e radicais hidróxidos. Este órgão é rico em leucócitos como, por exemplo, os neutrófilos e eosinófilos, tornando essa glândula um grande local de fagocitose de matérias particuladas e células sanguíneas, desempenhando um papel importante na hematopoiese (FISHELSON, 2006; COSTA 2007).

Nos vertebrados o baço é um importante órgão de formação, armazenamento e destruição de células sanguíneas, atuando diretamente nas defesas imunológicas contra organismos patogênicos. Este órgão está presente na maioria dos peixes e são encontrados em todos os tetrápodos. Nos peixes pulmonados, este órgão não é

diferenciado, formando uma massa de tecido compacta. Em outros peixes bem como nos cartilaginosos e nos actinopterygeos (actinopiterygii), o baço, é formado por um tecido mais definido. A rede principal do baço é formada por invaginações de tecido conjuntivo que ficam com formato dividido. Contém uma extensa rede reticular, cujos espaços são constituídos de uma polpa branca, repleta de leucócitos e pela polpa vermelha com uma grande quantidade de eritrócitos. (ROMER; PARSONS, 1985). Nos mamíferos os tecidos hematopoiéticos assumem a condição de órgãos distintos no baço e nódulos linfáticos (KARDONG, 2011).

Foi observada uma resposta imunológica em trutas onde os esplenócitos puderam ser estimulados indiretamente, sugerindo que há presença de células T e B no baço de teleósteos. (IWAMA; NAKANISHI, 1997). Tatner (1985) Observou uma migração de timócitos dentro do baço de trutas, caracterizando um maior envolvimento do baço nas respostas imunológicas secundárias.

3.4 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE DE PEIXES TELEÓSTEOS

As células sanguíneas que participam dos mecanismos de defesa imunológica dos teleósteos são os leucócitos, que são responsáveis pela defesa do organismo, no qual compreendem os linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilo, basófilos e trombócitos (FERNANDEZ et al., 2002).

3.4.1 Linfócitos

Os linfócitos estão presentes em maior quantidade na circulação dos peixes (HINES; YASHOUV, 1970). São responsáveis pela resposta imunológica adquirida, está diretamente envolvida nos mecanismos produtores de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, nos processos de memória imunológica e promovem a liberação das linfocinas que são reguladoras da função imune (YOSHINAGA et al., 1994).

Os linfócitos de peixe são células diferenciadas, possuem características e exercem funções próximas às determinadas para os mamíferos (ELLIS, 1977; CLEM; MILLER; BLY, 1991). Durante a contagem diferencial de leucócitos é comum observar em peixes que os linfócitos possuem tamanhos distintos (BURROWS; FLETCHER; MANNING, 2001). Um estudo descreveu populações celulares no sangue periférico de trutas arco-íris. Sendo estas compostas pelas mesmas células encontradas em outras espécies, exceto pela diferenciação entre linfócitos grandes e pequenos (KFOURY et al., 1999).

Em geral, os peixes possuem mecanismo fagocitário associado a células granulocíticas e células mononucleares. É a primeira espécie a apresentar tanto a imunidade inata quanto à imunidade adquirida, sendo esta mais comumente associada a mamíferos. Peixes possuem tanto linfócitos T quanto B. Os Linfócitos B se diferenciam em plasmócitos, (linfócitos B ativados) que são células de memória que participam da resposta imune humoral, enquanto que os linfócitos T apresentam-se com diferentes tipos e desempenham funções específicas, possuem capacidade para reconhecer alguns antígenos que se ligam aos marcadores de superfície de algumas células (FALCON, 2007).

3.4.2 Monócitos

Em peixes os monócitos e os macrófagos participam das reações inflamatórias e da resposta imunológica, na qual ocorre a fagocitose, esse tipo celular é descrito tanto em peixes teleósteos quanto em cartilagíneos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Kfoury et al., (1999), observaram que os monócitos de trutas arco-íris apresentavam um núcleo bilobado com formato semelhante a de um rim contendo uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, repleto de grânulos, com vesículas e vacúolos dispersos no citoplasma, sendo que estas células mediam entre 8-20µm. Os monócitos são considerados as células mais importantes na resposta imune (FALCON, 2007). No sangue circulante são essenciais para a produção de citocinas, e são consideradas as células primárias durante a apresentação do antígeno. Durante a fagocitose e a destruição dos

patógenos as células envolvidas neste processo interligam o sistema imune inato ao adquirido. Em sua superfície pode ser encontrado também receptores para anticorpos. Possuem a capacidade de expressar moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) principal de classe II, cuja função é ligá-los aos linfócitos T auxiliares, onde ocorrerá a apresentação do antígeno (MACARTHUR; FLETCHER, 1985; BLAZER, 1991; SECOMBES; FLETCHER, 1992).

Em mamíferos, além do macrófago, advindo da maturação dos monócitos, existem outras células que provém dos monócitos, como por exemplo, as células dendríticas (DCs), que são responsáveis pelo início das respostas imunológicas e estão dispostas em um grupo de células apresentadoras de antígenos (APCs) (GIACOMINI, 2009). As APCs são responsáveis por dar início e controlar as respostas imunes, além de expressarem moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade, que apresentam os antígenos capturados às células T auxiliares (GIACOMINI, 2009). Devido ao fato de serem ativadas e atraídas por elementos da resposta inespecífica, estas possibilitam a sensibilização dos linfócitos T que participam da resposta imune específica (CRUVINEI, 2010).

As DCs nos mamíferos são diferenciadas de acordo com sua localização, origem, estrutura, fenótipo e principalmente no nível de maturação. As DCs imaturas estão localizadas nos tecidos, pele e mucosas, e são muito eficientes no englobamento e processamento de quantidades pequenas de antígenos e as DCs maduras são comumente encontradas nos órgãos linfoides, com o baço e linfonodos. Sua função é atrair as células T e B através da liberação da secreção de quimiocinas, fazendo com que ocorra uma maior viabilidade de células T. As DCs maduras são mais eficientes na apresentação do antígeno do que as células B ou macrófagos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Os peixes não possuem sistema linfático com linfonodos e nichos de células dendríticas. É provável que os mecanismos se distingam daqueles em humanos e outros mamíferos. As DCs e a resposta específica são bem documentadas em mamíferos, contudo ainda não está estabelecido se essas células existem em peixes (LOVY et al., 2009).

Lovy et al., (2009) demonstrou que os anticorpos contra Langerin/CD207 e a reação cruzada entre os peixes e os seres humanos pode ser uma ferramenta para o estudo de células de Langerhans, pois este é um marcador com maior especificidade para estas células. O estudo também sugere que os peixes, por ser o

primeiro grupo de vertebrados a desenvolver a imunidade adquirida, poderiam ser também o primeiro grupo de vertebrados a apresentar células dendríticas.

3.4.3 Neutrófilos

Os neutrófilos nos peixes são células que apresentam características citoplasmáticas rica em granulações neutrofilicas com núcleo geralmente na forma de bastonete e raramente se apresentam na forma segmentada, possuem características morfológicas e histoquímicas semelhantes aos dos mamíferos (ROBERTS, 1998), podem ser isolados no sangue, tecidos linfoides e na cavidade peritoneal (SECOMBES, 1996). São células polimorfonucleares, e estão envolvidas nos processos inflamatórios em peixes (MANNING, 1994). Os neutrófilos podem se aderir às células endoteliais e migrar para o foco inflamatório, são atraídos por quimiotaxia. (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Possui grande quantidade de peroxidase, uma enzima lisossômica presente em células fagocíticas e que causam a oxidação de alguns compostos durante o processo de fagocitose (ROWLEY; RATCLIFFE, 1998). Um estudo realizado com amostras sanguíneas de trutas arco-íris demonstrou que os neutrófilos possuem funções semelhantes as das células citotóxicas não específicas, natural killer (NK) de mamíferos (SASAKI; MAITA; OKAMOTO, 2002).

3.4.4 Eosinófilos

Os eosinófilos, na maioria das vezes, estão ausentes no sangue periférico dos peixes e, quando ocorrem, apresentam frequência relativamente pequena. Em peixes as funções dos eosinófilos ainda não são compreendidas. Existem relatos que os mesmos possuem função microbicida e de fagocitose bacteriana (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

3.4.5 Basófilos

Os basófilos são células arredondadas sendo que o núcleo segue o formato da célula, apresenta uma cromatina compactada e não possui nucléolos. O citoplasma apresenta-se com granulações bem basofílicas, recobrando o núcleo geralmente são menores que os neutrófilos (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). A função dos basófilos nos teleósteos ainda não está completamente esclarecida. No sangue periférico, atua como os mastócitos teciduais, apresentando grânulos ricos em histamina, mas os mesmos podem apresentar resposta alérgica ou imunológica, porém indícios levam a considerar que estas possam estar mais ligadas aos processos alérgicos, pois possuem histamina em seus grânulos. Os basófilos geralmente não ocorrem no sangue circulante, podem ser encontrados no rim cefálico e raramente no baço. (THRALL, 2006). Os basófilos são raramente encontrados na maioria das espécies de teleósteos (RANZANI-PAIVA, 2005).

3.4.6 Trombócito

Os trombócitos são caracterizados por possuir formato irregular, que pode variar de arredondados a alongados, com citoplasma apresentando um extenso sistema de canalículos e bandas protuberantes de microtúbulos, sendo que seu tamanho pode variar de 7-20 μm de comprimento e 3-5 μm de largura (KFOURY et al., 1999). Tavares-Dias; Melo; Moraes, (2002), descreve os trombócitos como células elípticas com núcleo fusiforme bastante vacuolizado, seu formato pode variar devido ao estágio de maturação ou ao estágio de reatividade. Podem ser encontrados em grande quantidade no sangue dos peixes, porém alguns autores não incluem os trombócitos na classificação dos leucócitos (VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007; COSTA, 2007).

Ainda os trombócitos são comparados com as plaquetas dos mamíferos, sendo responsáveis pelo processo de coagulação sanguínea (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), esta função é válida tanto para peixes marinhos, quanto para

peixes de águas continentais, além de participar do processo de coagulação também participam das funções de defesa do organismo através da atividade fagocíticas. Alguns estudos citoquímicos demonstraram que os trombócitos possuem características inerentes às células fagocíticas, apresentando reação positiva para o glicogênio intracelular, demonstrando energia para efetuar o processo de defesa orgânica reduzindo a predisposição a infecções (UEDA et al., 2001).

3.5 INDOLEAMINE 2,3 - DIOXIGENASE (IDO)

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima oxigenase que catalisa a incorporação de uma molécula de oxigênio dentro do substrato, levando a uma modulação no metabolismo e a síntese de várias substâncias biológicas. Existem dois tipos de oxigenases a monooxigenase e a dioxigenase, a IDO atua como fator limitante no sistema imunológico, pois participa do catabolismo do aminoácido triptofano através da via quinurenina. O triptofano é essencial para a proliferação de células T, sendo que uma depleção de triptofano leva a um decréscimo ou interrupção do crescimento das células T, portanto a IDO atua como uma enzima imunomoduladora (MELLOR; MUNN, 2001). A supressão de células T dependente de IDO e a indução por células dendríticas sugerem que o catabolismo do L-Triptofano (L-Trp) atua na proliferação e diferenciação das células T implicando nas manipulações imuno-terapêuticas de pacientes com câncer e doenças infecciosas crônicas. Sugere-se que a atividade da IDO reduziria a concentração de triptofano, e desta forma as células do sistema imunológico ativadas não proliferariam e entrariam em apoptose devido ao estado de carência no micro ambiente placentário (MELLOR; MUNN, 2001; TAKIKAWA, 2005).

A expressão da IDO é regulada pelo interferon gama ($\text{IFN } \gamma$) e a atividade da IDO é regulada pela a depleção de triptofano resultando em vários efeitos fisiológicos tais como a inibição do crescimento patogênico prevenção da rejeição fetal e redução da proliferação das células T, redução proteica e biossíntese de serotonina (MELLOR; MUNN et al., 2001).

Alguns estudos demonstraram que dois hemes contendo oxigenases – IDO e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), catalisam o catabolismo do L-Triptofano (L-Trp) em quinurenina (Kyn). A IDO tem função oxidativa e é amplamente expressa por uma variedade de tecidos em mamíferos, como, por exemplo, os cerebrais, cardíacos, pulmonares, renais e intestinais (TAKIKAWA et al., 2005). A IDO também é expressa pelas células dendríticas, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais, fibroblastos, músculo liso, células endoteliais e em algumas neoplasias (MELLOR; MUNN, 2004). Segundo Astigiano et al., (2005) as células que infiltram o tecido tumoral como os granulócitos e os eosinófilos é que realmente expressam a IDO e não as células tumorais. Pois seria então através destas células inflamatórias que a IDO exerceria seu efeito imunossupressor.

A regulação do metabolismo do triptofano pela indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em células dendríticas (DC) atua como um modulador da imunidade altamente versátil. Na inflamação, o interferon- γ é o principal indutor da IDO para a prevenção de respostas inflamatórias, a IDO também é responsável pelos efeitos de auto-tolerância em longo prazo (PALLOTTA, 2011).

O triptofano, oriundo da dieta, é transportado para o fígado através do sistema porta hepático, onde é metabolizado, gerando compostos biologicamente ativos através de duas vias, a via serotoninérgica e a via das quinureninas (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003).

Durante o processo de catabolismo, há formação de catabólitos tóxicos, que detém o crescimento de células T e natural killer (NK) e consequentemente supressão das funções das NK (FRUMENTO et al., 2002; TERNESS et al., 2002; DELLA CHIESA et al., 2006; MUNN et al., 2007), pois a quantidade de triptofano que entra na célula é o fator limitante da atividade da IDO (KUDO; BOYD, 2004). A via de indução da IDO pode estar relacionada com o tipo antigênico que desencadeia a resposta imune, e o mecanismo pelo qual a IDO tem a sua atividade elevada ainda é pouco compreendido (OLIVEIRA, 2005).

Mellor e Munn, (2004) e Liang et al., (2006), demonstraram que o catabolismo do triptofano ocorre nos locais de inflamação, e a expressão de IDO estar ligada às respostas anti-inflamatórias por diminuir os danos nos tecidos e em seus sítios. Sugere-se que as células produtoras de IDO possuam um papel na prevenção do início de desordens autoimunes. Alguns mediadores de inflamação, incluindo o IFN γ que estimula a atividade bioquímica e funcional da IDO, induzem a expressão dos

genes que codificam esta enzima (KUDO et al., 2004), estimulando a IDO a degradar o triptofano em quinurenina (YOSHIDA et al., 1981; YASUI et al., 1986; YOSHIDA et al., 1986; KUDO et al., 2004).

A IDO possui ação anti-inflamatória comprovada, estudos realizados em pacientes com doenças inflamatórias demonstraram que o T helper 1 (Th-1), IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF- α) são fortes indutores da expressão de IDO (WOLF; WOLF; RUMPOLD, 2004) e que a expressão e suas atividades influenciam os mecanismos da ativação imune (HAENZ; OBEXER; WINKLER, 2005). A elucidação das funções de sinalização da IDO levanta várias questões. Em primeiro lugar, como a regulação das células do sistema imunitário por TGF- β é muito dependente da sua concentração local. A TGF- β está presente em quase todos os tecidos, é provável que ambos IFN γ e TGF- β estão presentes em tecidos inflamados (MURAKAMI et al., 2013).

3.6 A INDOLEAMINA 2-3 DIOXIGENASE E A FILOGENIA DA IMUNIDADE

A regulação imunológica é uma resposta biológica altamente evoluída capaz de ajustar os processos que envolvem a inflamação a imunidade inata e também atuar na modulação adaptativa da imunidade, estabelecendo uma tolerância a ela mesma. Para o catabolismo de aminoácidos é uma estratégia de sobrevivência ancestral que pode adicionalmente controlar as respostas imunes em mamíferos (PALLOTTA, 2011) Esta afirmação ressalta o experimento de Yuasa e Ball (2012), que identificou a presença de moléculas homólogas à IDO em espécies filogeneticamente mais antigas, incluindo fungos e bactérias, contudo suas funções são aparentemente restritas ao metabolismo do triptofano para obtenção de energia.

Em teleósteos, uma IDO-paróloga (Proto-IDO ou IDO2) foi encontrada na espécie *Danio rerio* popularmente conhecido como peixe paulistinha, que possui fecundação e desenvolvimento externo, no entanto sua função ainda não é bem esclarecida (YUASA et al., 2007). O sistema imunológico nos peixes sofreu uma grande evolução e diversificação, culminando no estabelecimento de mecanismos, próximos aos encontrados nos mamíferos (URIBE et al, 2011).

Do ponto de vista evolutivo, a imunidade celular, particularmente a fagocitose precederam o desenvolvimento da produção de anticorpos nos animais. Os invertebrados caracteristicamente demonstraram formas primitivas de rejeição de enxertos e fagocitose, mas em nenhuma espécie de invertebrados foram identificadas moléculas com estrutura funcional e físico-química semelhante àquelas das imunoglobulinas dos vertebrados. Por outro lado, todas as espécies de vertebrados sintetizam anticorpos, rejeitam enxertos e apresentam memória imunológica. Portanto existe um delineamento relativamente definido entre a complexidade da imunidade dos invertebrados e vertebrados (ABBAS, 2008).

A resposta imune plenamente desenvolvida se caracteriza por especificidade e memória. Estes critérios essenciais devem ser lembrados quando se distingue a verdadeira imunidade de um fenômeno primitivo ou para-imunológico na análise filogenética (ABBAS, 2008).

Os processos evolutivos concedem contínuas adaptações em função das proteínas. A estabilidade das proteínas depende da presença de eventos específicos, que fazem com que estas sejam alvos de processos degradativos ou protetores (PALLOTTA et al., 2011).

Várias enzimas metabólicas são conhecidas por possuir uma segunda função, que permite com que atendam desafios funcionais e as necessidades dentro de uma célula. Dentro deste contexto, a enzima IDO atua como fator limitante no sistema imunológico, pois esta participa do catabolismo do triptofano que é um aminoácido essencial, e atua na proliferação de células T, sendo que uma diminuição de triptofano leva a um decréscimo ou interrupção do seu crescimento (MELLOR; MUNN, 2001).

A enzima IDO pode ser descrita de três maneiras: triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) contida no fígado, IDO propriamente dita, também referida como (IDO1) e IDO-paráloga (IDO2), estas participam do mesmo mecanismo de catabolismo do (Trp) através da via das quinureninas. Contudo, sozinha a IDO é conhecida como um autêntico regulador da imunidade em várias condições fisiopatológicas, incluindo gravidez, infecções, alergias, autoimunidade, inflamações crônicas, transplantes, e mecanismos de escape em tumores (PALLOTTA et al., 2011). Contudo Yuasa et al., (2009) observou que a TDO (triptofano 2,3 dioxigenase) é distribuída em várias formas de vida sendo encontrada não somente em eucariontes mas também em bactérias o que vai contra a ideia de que a IDO tenha sido encontrada somente em

mamíferos e leveduras até hoje. Recentes estudos identificaram a IDO-homóloga em vertebrados inferiores e encontraram uma IDO-paróloga que é expressa em ratos, neste estudo foi clonado a IDO-homóloga do sapo e do peixe e a IDO-paróloga do rato caracterizando suas propriedades enzimáticas usando proteínas recombinantes. Em mamíferos a TDO tem sido isolada de invertebrados incluindo os insetos. A TDO é encontrada não somente em eucariontes, mas também em bactérias. Por exemplo, a *Pseudomonas fluorescens* e mais 50 sequências de TDO em bactérias foram reportadas. A ampla distribuição do TDO entre as diferentes formas de vida sugere que a origem desta enzima é muito antiga. (YUASA et al., 2011).

Por ser uma enzima degradante do triptofano, a IDO é conhecida com uma molécula imunossupressora dos mamíferos, nos fungos o papel básico da IDO é de fornecer nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD⁺) pela via das quinureninas, ou seja, a IDO atua como substrato (YUASA e BALL., 2012).

Na árvore filogenética as IDO de baixa atividade são denominadas proto-IDOs que formam um agrupamento (cluster) distinto do agrupamento (Cluster) dos mamíferos. Os Genes de IDO e da proto-IDO estão presentes paralelamente nos cromossomos dos mamíferos incluindo o marsupial opossum (gambá), enquanto o gene da proto-IDO foi somente observado no genoma do *Danio rerio* e da galinha. Os resultados deste estudo sugeriram que a IDO dos mamíferos surgiu das proto-IDOs pela duplicação do gene que ocorreu antes da divergência dos marsupiais e dos mamíferos euterianos (placentários) na história evolucionária dos mamíferos. A sequência de aminoácidos das proto-IDOs dos vertebrados são bem conservadas, sugerindo que as proto-IDOs possuam alguma função essencial (YUASA e BALL 2012).

Em mamíferos a TDO é principalmente expressa no fígado e primariamente supre a necessidade de NAD⁺, a TDO é amplamente distribuída desde mamíferos até bactérias, sendo que as enzimas ativas da IDO foram reportadas somente em vertebrados e fungos, em mamíferos a atividade da IDO assume um importante papel no sistema imunológico enquanto que nas espécies de fungos a IDO é uma expressão constitutiva, e fornece suplemento NAD⁺ como a TDO nos mamíferos (YUASA; USHIGOE; BALL., 2011).

A tabela 1 abaixo resume alguns pontos abordados de acordo com a espécie e a variação do tipo de IDO encontrada.

Tabela 1 – Variantes da IDO em diferentes grupos de seres vivos

Espécie	Tipo de IDO	Função	Fonte
Bactérias	TDO homóloga da IDO humana	catalítica	Yuasa et al., 2007
Leveduras	Gene para a IDO	Síntese de NAD ⁺	Yuasa e Ball., 2012
Fungos	IDO α e IDO β	Síntese de NAD ⁺ Via quinurenina	Yuasa; Ushigoe; Ball 2011
Molusco (abalone)	Proteína IDO-like	Mioglobina e transporte de O ₂	Yuasa et al., 2005
Peixe (<i>Danio rerio</i>)	Proto-IDO (IDO2 homologa da IDO	Catabolizar o triptofano em N- formilquinurenina	Yuasa e Suzuki 2007
Ave (<i>Gallus gallus</i>)	Proto-IDO	Desconhecida	Yuasa et al., 2007
Mamífero (<i>Rattus norvegicum</i>)	IDO e Proto IDO	Fator limitante no sistema imunológico	Yuasa et al., 2007
Mamífero (<i>Homo sapiens</i>)	IDO e Proto IDO	Fator limitante no sistema imunológico	Yuasa et al., 2007

Fonte: Cardoso, 2014

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da FMVZ-USP nº 2594/2012.

4.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os peixes utilizados foram fornecidos pela Estação Experimental de Salmonicultura “Dr. Ascânio Faria” da Apta Regional Vale do Paraíba da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado, localizada dentro do Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, Brasil.

Para realização deste trabalho, foi proposto inicialmente a utilização de 12 trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sendo seis machos e seis fêmeas adultas de um ano de idade e aproximadamente 1kg, contudo, devido à disponibilidade de mais animais de um mesmo lote, a quantidade foi alterada para 50 trutas arco íris, todas fêmeas de um ano de idade, com o intuito de uniformizar o lote e obter melhores dados estatísticos. As fêmeas adultas de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram divididas em dez grupos de cinco animais em cada grupo para poder estudar a ocorrência da IDO e compara-las entre si. A alteração no número de animais foi aprovada em reunião no dia 13/03/2013 pela Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os peixes foram mantidos em tanques de fibra de vidro, contendo cerca de 1500 litros de água corrente, abastecimento e escoamento independentes, sob condições naturais de fotoperíodo. A renovação do volume total da água dos tanques é realizada duas vezes por hora, de modo a suprir a demanda de oxigênio dissolvido. Durante o estudo, os animais receberam ração comercial extrusada administrada três vezes ao dia *ad libitum*.

4.2 COLETA DE MATERIAL

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para punção sanguínea e 1:500 no momento da eutanásia para a retirada dos órgãos. Inicialmente, a benzocaína foi dissolvida previamente em álcool etílico (qsp) e, em seguida, diluída na água (WEDEMEYER, 1970; MATUSHIMA, 1988). A manipulação dos peixes só foi iniciada após os mesmos apresentarem diminuição dos movimentos operculares e perda de equilíbrio (COYLE et al. 2004). As trutas foram retiradas da água e pesadas em uma balança (Sartorius BP 8100). Após estes procedimentos, o sangue foi coletado pela punção da veia caudal utilizando-se seringas heparinizadas. Uma alíquota foi utilizada para a confecção das extensões sanguíneas em lâminas silanizadas (Starfrost) e o restante foi submetido à centrifugação 1600 rpm por dez minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o tampão leucocitário foi utilizado para a confecção das extensões sanguíneas. Para a análise morfológica das células sanguíneas foi utilizada a coloração de May-Grünwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Após a retirada do rim cefálico foi realizado um imprint em lâminas de vidro para averiguar a presença de células sanguíneas. Tanto as extensões sanguíneas quanto os imprints foram fixados em metanol por cinco minutos.

Após a coleta de sangue e eutanásia das trutas, amostras de rim cefálico, baço e fígado, foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4%, pH 7.2.

Figura 1- Imagens da coleta de trutas arco-íris (A) Anestesia, (B) Punção sanguínea, (C) rim cefálico localizado na porção cranial, (D) baço, (E) fígado (F) fim cefálico, baço e fígado, procedimento realizado na Estação Experimental de Salmonicultura Dr. Ascânio de Farias-APTA - Campos do Jordão.

Foto: CARDOSO, (2013)

Fonte: APTA, 2013 - C. Jordão/SP

Legenda: Em (A), anestesia das trutas arco-íris. (B), coleta de sangue através da punção da veia caudal. Em (C), seta mostrando o rim cefálico na porção cranial. (D), baço extraído na região dos cecos pilóricos. (E) fígado e (F), B, representando o baço; F, o fígado ; e R, o rim cefálico já retirados das trutas arco-íris.

4.3 INCLUSÃO E CORTE DE MATERIAL

Para inclusão do material, as amostras foram desidratadas em álcool com concentrações crescentes, com posterior diafanização pelo xilol e incluído em paraplast (parafina histológica – Easy Path). O processamento dos blocos de parafina incluiu corte em micrótomo (Leica® RM 2065) com espessura de 4µm e adesão dos fragmentos obtidos em lâminas de vidro Silanizadas (Starfrost, Kinnitel Glaser) e mantidos em estufa a 60 °C por 24 horas e lavagem em água corrente seguida por lavagem em tampão fosfato PBS pH 7,4. (Phosphate buffer saline).

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

O protocolo para imuno-histoquímica foi ajustado conforme a necessidade do material. Uma das mudanças foi no sistema de detecção, optou-se por utilizar o Envision (HRP-Link, DAKO) (BOENISCH, 1999).

O processamento do material foi realizado no Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica (LAMIH) no Setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Para a realização da imuno-histoquímica foram utilizados cinco anticorpos para testar quais destes iriam expressar os receptores da IDO positivamente. Os anticorpos primários utilizados foram:

- ✓ Anti-IDO policlonal (NB 100-2459 Novus biologicals), (Novus).
- ✓ EB09548 policlonal anti-Indol (Everest Biotech), (Everest).
- ✓ Anti-IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase) Antibody, clone 10.1 (Millipore), (10.1).
- ✓ Anti-IDO, clone 1F8.2 (Millipore). (F8.2).
- ✓ Anti-IDO Antibody LS-B1746 (Lifespan Bioscience, inc), (Lifespan).

4.4.1 Imuno-histoquímica para extensão sanguínea e imprint

As lâminas silanizadas contendo as extensões sanguíneas (esfregaço) e o imprint do rim cranial, foram submetidas ao bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol, e o bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com leite em pó a 5%, e então incubadas em câmara úmida “*overnight*” com os anticorpos primários na concentração de 1:100. Foi realizado um controle positivo e um negativo para cada um dos cinco anticorpos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram novamente incubadas com anticorpo secundário *HRP*-Link (Dako Envision System HRP, K1390) e revelados em solução cromógena de diaminobenzidina (DAB, 3.3'-diaminobenzidine, Sigma) por 5 minutos. Por fim, os cortes foram contra-corados com May-Grünwald-Giemsa-Wright (Millipore) (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), lavados abundantemente em água corrente e desidratados em etanol, cujas soluções estavam em concentração crescente. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount® (Fischer scientific).

As células contendo as extensões sanguíneas foram contadas (x 5000 células) em campos escolhidos aleatoriamente com o auxílio de um microscópio óptico Olympus BX60 (Japão) com câmera fotográfica AxioCam HRc Zeiss® (EUA). As células com marcação positiva para a imuno-histoquímica foram contadas com o auxílio de um contador manual e os resultados foram registrados como células positivas, num aumento de 100X (20 µm).

As análises estatísticas para as extensões sanguíneas foram realizadas com o auxílio do teste t-Student, para avaliação dos valores médios de cada grupo com todos os restantes, seguido pelo teste de Qui-quadrado para avaliação das diferenças das proporções encontrada em cada extensão (SNEDECOR; COCHRAN., 1974). Foi utilizado o software InStat (La Jolla CA, EUA).

4.4.2 Imuno-histoquímica para rim, baço e fígado

Após a passagem pelos álcoois e hidratação em água destilada, a recuperação antigênica foi realizada com uso de forno micro-ondas em potência máxima durante 15 minutos com as lâminas incubadas em solução tampão citrato de sódio a 10M, pH 6,0. A solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol foi utilizada para bloquear a ação da peroxidase endógena, e para o bloqueio das reações inespecíficas foi utilizado leite em pó a 5%. Por fim, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários na concentração 1:100 em câmara úmida “*overnight*” em geladeira. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário HRP-Link (DAKO) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 7,4. A reação imune foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB, 3,3'- diaminobenzidine, Sigma) por cinco minutos. Os cortes foram lavados em água corrente por dez minutos, contracolorados com Hematoxilina de Harris (HE), lavados em água corrente e desidratados em etanol. A montagem das lâminas também foi realizada com resina Permount[®].

As reações obtidas durante a imuno-histoquímica tiveram controles positivo G (+) tumor de mama canino (controle da amostra) e cólon de camundongo (para o controle do anticorpo) e negativo G (-) para confirmar a reação das mesmas. Para o controle negativo a incubação foi realizada em PBS com eliminação do anticorpo primário.

O cólon foi cedido pela aluna de mestrado da Faculdade de Medicina De São Paulo (FM-USP) Amanda Carolina Montevechi Pampaloni e está aprovado pelo comitê de ética, projeto de pesquisa número: 266/12.

Após a imuno-histoquímica observou-se as lâminas com auxílio do microscópio óptico Axioscópico Zeiss[®] e os resultados foram analisados em um microcomputador com programa de mensuração específico KS-400 Zeiss[®] num aumento de 40x (50 µm). Para a realização da mensuração, durante o protocolo final da imuno-histoquímica, não foi utilizado nenhum tipo de contra-coloração (hematoxilina), evidenciando assim somente os tecidos com marcação positiva para receptores de IDO. O método de mensuração detecta as marcações positivas em

marrom dando a área/Frame por μm^2 e a área marcada em porcentagem (%). Em seguida procedeu-se a análise e discussão dos resultados.

4.5 WESTERN BLOT

Para confirmar se a marcação da imuno-histoquímica foi específica para a IDO, utilizamos a técnica de Western Blot, que é um método utilizado para detectar uma dada proteína em uma amostra, usando anticorpo específico para aquela proteína. Esta técnica também fornece o peso molecular destas proteínas, que são corridas em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e transferido para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF (SANCHES, 2008). Para a realização do mesmo, as proteínas foram extraídas e quantificadas a partir das partes de tecidos do rim cefálico, baço, fígado e do tampão leucocitário, que foram previamente pesados e colocados em eppendorfs de 1,5ml contendo 400 μl de 2X Sample Buffer 400 μl de 1X Working Solution e 40 μl de cocktail de inibidor de protease (P2714 Sigma-Aldrich). Em seguida esses tecidos foram processados utilizando um sonificador (QSonica, Q125) a 4°C. Após este procedimento, as amostras de tecido foram centrifugadas por 15 minutos, a 4°C e 1300 rpm; o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e armazenado em gelo, para a realização da quantificação das proteínas.

A quantificação das proteínas foi estimada utilizando o reagente BioRad Protein Assay pelo método de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules CA, USA), sendo que 10 μl das amostras foram diluídos em 90 μl de solução de 1X Working Solution, sendo que 10 μl desta solução foram adicionados a 990 μl do reagente de Bradford, diluído em água destilada (1:5). A curva padrão foi feita com soro albumina bovina adicionada ao reagente de Bradford em diferentes concentrações. As amostras foram incubadas por 5 minutos e quantificadas em um Biofotômetro (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Germany). Foram calculadas as concentrações das proteínas totais de cada amostra.

Após a preparação do gel inferior (Resolving Gel) e do gel superior (Stacking gel), as amostras adquiridas após a extração e quantificação, foram diluídas em

Sample Buffer (Azul de bromofenol, glicerol, Tris-HCL, β Mercaptoetanol, SDS e DTT) e submetidas à desnaturação proteica. As amostras diluídas foram colocadas em eppendorfs de 0,2ml no banho seco durante 10 minutos à 95°C (Termociclador Mastercycler próS Eppendorf Germany). Em seguida, foi adicionado 15 μ L da amostra em cada poço, sendo que o primeiro poço foi preenchido com 10 μ L com o marcador molecular (Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Standards #1610324, Bio-Rad), e as amostras foram corridas em uma cuba de eletroforese (Bio-Rad), começando com 45V, no gel superior e posteriormente a 110V no gel inferior.

Após o término da corrida foram preparadas três cubas: A primeira contendo metanol, na qual a membrana de PVDF (Immun-Blot PVDF Membrane #162-0177 Bio-Rad) ficou mergulhada por 5 minutos, para estabilizá-la; a segunda cuba com água destilada e a terceira cuba com tampão de transferência (buffer solução de uso), sendo que nesta mergulhou-se a membrana e os papéis de filtro. A montagem da placa de transferência seguiu a seguinte sequência:

- 1) Esponja
- 2) 3 papéis filtro
- 3) Membrana PVDF
- 4) Gel
- 5) Papel Filtro
- 5) Esponja

A transferência ocorreu com 120 mA por 120 minutos. Após a transferência da membrana, foi realizado o bloqueio das reações inespecíficas com leite em pó a 5% (Skin Milk, Difco BD), por duas horas, em seguida a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos cada com TTBS 1X, e incubada com os anticorpos primários: Anti-IDO policlonal (NB 100-2459 Novus biologicals) e o EB09548 policlonal anti-Indol (Everest Biotech) overnight na concentração 1:200. Foi utilizada uma membrana para cada anticorpo. No dia seguinte, após as lavagens com TTBS 1X, a membrana foi incubada com anticorpo secundário 1:2000 (Bovine anti goat IgG HRP, Santa Cruz), por duas horas em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi preparada para a revelação quimioluminescente ECL (ECL Plus Western Blotting Analysis System-RPN 2132, Amersham, GE Healthcare). O gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue à 0,25% (Bio-Rad), e descorado com solução de Destain Solution (metanol e ácido

acético) até as bandas aparecerem. A revelação foi realizada no aparelho ImageQuant 350 (GE Helthcare).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DO WESTERN BLOT

Após a realização dos testes iniciais (pilotos) para imuno-histoquímica, foi necessário realizar um teste de Western Blot com os anticorpos, com o intuito de averiguar se as marcações positivas eram específicas para IDO, já que os anticorpos são policlonais e não são específicos para IDO em truta. De acordo com as especificações dos mesmos, apenas dois anticorpos eram indicados para Western Blot: Anti-IDO policlonal (NB100-2459 Novus biologicals) e o EB09548 policlonal anti-Indol (Everest Biotech). Após o teste, somente um anticorpo correspondeu positivamente: Anti-IDO policlonal, (Novus biologicals).

Para ter um controle endógeno da reação (Figura 2, C1, C3 e figura 3, C1 e C2) utilizou-se tumor de mama de cadela cedido pelo Doutorando Rafael Magdanelo Leandro, o qual marca positivamente para IDO com este mesmo anticorpo. (CEUA FMVZ-USP) número 2530/2012.

As bandas que detectaram presença da enzima IDO nas amostras: C1, C2, C3 (controle endógeno tumor de mama em cadelas) (figuras: 2 e 3), marcaram o peso molecular descrito nas especificações da bula do anticorpo em 45,3 kDa.

Foi realizado o controle endógeno com a β -actina, porém seu resultado não foi satisfatório devido ao peso da β -actina ser aproximado ao do anticorpo, encobrindo assim os resultados (figura 2). Para sanar este problema foram utilizados o controle endógeno C1 e C3. Onde foi possível observar visíveis marcações de IDO no R4 (rim cefálico), B (baço), S2 (sangue) (figura 2).

Nas amostras S1 (sangue), R1, R2, R3 (rim cefálico) a expressão da enzima IDO obteve marcação bem próxima ao peso molecular dos controles endógenos (C1, C2) que pesam aproximadamente 45,3 kDa, exceto pela segunda banda que ficou com aproximadamente 25 kDa. Houve a degradação das Amostras: F (fígado), e B (baço). Ao realizar o Western Blot com o fígado, não foi possível identificar nenhuma reação positiva, e o baço apresentou uma fraca reação. A mesma banda foi revelada de duas formas para melhor visualização (figura 3).

Figura 2- Western blot IDO e β -actina reveladas pelo ImageQuant 350 (GE Helthcare).

Foto: CARDOSO, (2013).

Fonte: Departamento de Patologia, FMVZ/USP (2013).

Legenda: Detecção da enzima IDO pela técnica de western blot utilizando o anticorpo NB100-2459 (Novus Biologicals). Gel de poliacrilamida 13% (SDS-PAGE). Em C1 e C3, (controle endógeno da reação tumor de mama em cadelas, peso molecular com aproximadamente 45,3 Kda e banda dupla). Em R4 (rim cefálico), B (baço), S2 (sangue) com visível marcação da IDO. β -actina como controle endógeno da marcação. Revelação com ECL plus (Amershan).

Figura 3 - Western Blot IDO a mesma membrana reveladas em dois tipos de contraste, no preto (A) e no branco (B).

Foto: CARDOSO, (2013).

Fonte: Departamento de Patologia- FMVZ/USP (2013)

Legenda: Detecção da enzima IDO por western blot utilizando o anticorpo NB100-2459 (Novus Biologicals). Dois tipos de revelação da mesma membrana, uma escura e outra clara, para melhor visualização das bandas. Gel de poliacrilamida 13% (SDS-PAGE). Em C1, C2, (controle endógeno da reação tumor de mama em cadelas, peso molecular com aproximadamente 45,3 Kda e banda dupla), S1 (sangue) com visível marcação e bandas duplas, R1, R2, (rim cefálico) com discreta marcação da expressão da enzima IDO, e R3 com uma marcação satisfatória. Degradação das Amostras: F (fígado), e B (baço). Revelação com ECL plus (Amershan).

5.2 RESULTADOS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

5.2.1. Resultados do teste com os anticorpos

A avaliação pela imuno-histoquímica dos anticorpos anti-IDO testados apresentou reação positiva para três deles:

1. Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) com reatividade prevista para cão, humano, camundongo e rato (Novus).
2. EB09548 policlonal anti-Indol (Everest Biotech), reatividade prevista em humano, vaca e cão (Everest).
3. Anti-IDO Antibody LS-B1746 (Lifespan Bioscience, inc), reatividade em cão, camundongo e rato (Lifespan).

Dos tecidos analisados, observou-se que no rim cefálico houve marcação, de células sanguíneas dentro de vários vasos sanguíneos, nos três anticorpos testados (Figura 4. A, E, I). No baço, observaram-se marcações aleatórias para todos os anticorpos, e todas as células marcadas estavam em áreas dentro de pequenos vasos sanguíneos (Figura 4. E, F, J). No fígado quase não se observou marcação, exceto algumas células dentro de pequenos vasos sanguíneos nos testes realizados com os três anticorpos (Figura 4. C, G, K). Houve marcação dos três anticorpos em células sanguíneas (Figura 4. D, H, L) Porém os resultados com as marcações dos anticorpos Everest e Lifespan não puderam ser validados, dado ao fato de não obtermos resultados com o teste de Western Blot, sendo eleito assim o anticorpo Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) para a realização deste trabalho, devido aos resultados positivos frente ao teste com western blot.

Os resultados dos testes realizados com os anticorpos Anti-IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase) clone 10.1 (Millipore) e Anti-IDO, clone 1F8.2 (Millipore), não demonstraram reações positivas.

Figura 4 – Imuno-histoquímica para o teste dos anticorpos (A,B, C, D) utilizando o EB090548, (E,F,G, H) utilizando o anticorpo LSB1746, (I, J, K, L) com o anticorpo de escolha NB1002459.

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia, FMVZ/USP (2013)

Legenda: Técnica de imuno-histoquímica. Marcação positiva para IDO em tecidos de truta arco-íris. Em (A) rim cefálico; (B) baço; (C) fígado, seta indicando células sanguíneas dentro do vaso; (D) células sanguíneas marcação positiva utilizando o anticorpo EB09548 policlonal anti-Indol (Everest Biotech). Em (E) rim cefálico, seta indicando a marcação de células sanguíneas dentro do vaso; (F) baço; (G) fígado; (H) células sanguíneas, marcação positiva com o anticorpo LSB1746 (Lifespan Bioscience, inc). E em (I) rim cefálico; (J) baço, com marcação dentro do vaso sanguíneo; (K) fígado e (L) células sanguíneas a seta indicando marcação positiva para IDO em um monócito utilizando o anticorpo Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals). Coloração: Hematoxilina para os tecidos e Giemsa para as extensões sanguíneas.

Figura 5- Controle negativo para as imuno-histoquímicas dos testes com os anticorpos, (A1, B1, C1, D1) representa o controle negativo do EB09548, (E1, F1, G1, H1) refere-se ao LSB1746 e o (I1, J1, K1, L, representando o controle negativo do anticorpo NB1002459.

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia, FMVZ/USP (2013)

Legenda: Técnica de imuno-histoquímica em tecidos de truta arco-íris. Controle negativo dos respectivos anticorpos para IDO em trutas arco-íris. Em (A1), (E1), (I1), rim cefálico, seta indicando a região de um vaso sanguíneo sem marcação positiva. Em (B1), (F1), (J1), baço. Em (C1), seta indica a região de um vaso sanguíneo sem marcação, (G1), (K1), controle negativo dos fígados. Em (D1), (H1), (L1), controle negativo das células sanguíneas. Coloração: Hematoxilina de Harris para os tecidos e Giemsa para as extensões sanguíneas.

5.3 RESULTADO DA EXPRESSÃO DA IDO NO BAÇO

Os resultados da imuno-histoquímica, utilizando o Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) (concentração 1:100), demonstraram que houve marcação citoplasmática positiva para os receptores de IDO no baço de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sendo possível observar a marcação positiva em algumas células imaturas e linfócitos (figura 7. B e figura 8). Foi possível visualizar a presença de melano-macrófagos (figura 7. A e B), porém não foi possível detectar se houve marcação desta célula, devido a sua coloração escura, o que pode mascarar a marcação positiva. Foi possível visualizar eritrócitos e trombócitos dispersos, porém estas células não foram marcadas positivamente, observou-se marcações positivas em linfócitos de vários tamanhos e diferentes estágios de maturação (figura 8. A), assim como foi possível observar os controles negativos, por meio da omissão do anticorpo primário (figura 7, A1, B1 e figura 8, a).

Ao avaliar as características de marcação positiva para receptores de IDO no baço pela metodologia da mensuração (figura 6), observou-se valores médios de 17,31% ($17,31 \pm 6,04$) de área marcada no baço, numa área/frame de 149774,61 μm^2 (Gráfico 1).

Figura 6 - Imuno-histoquímica do baço sem contra-coloração para mensuração

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: (1) Marcação positiva para a IDO em baço de trutas arco-íris, utilizando somente o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, para a mensuração (concentração 1:100).

Figura 7- Imuno-histoquímica do baço (A, B), marcação positiva, (A1, B1) controle negativo.

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: Expressão Imuno-histoquímica da IDO (concentração 1:100) no baço de trutas arco-íris. Em (A e B), seta vermelha indicando os centros de melano-macrófagos dispersos no tecido esplênico. Em (B), estrela, cordões esplênicos células e fibras reticulares, círculo preto evidenciando uma região rica em leucócitos. (A1, B1) controle negativo da amostra sem a incubação do anticorpo primário. Contra- coloração: Hematoxina de Harris.

Figura 8 - imuno-histoquímica do baço (A) marcação positiva (a) controle negativo

Foto: (CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: Expressão Imuno-histoquímica da IDO (concentração 1:100) no baço de trutas arco-íris, (A) círculo vermelho indicando marcação negativa de um eritrócito, o círculo pontilhado indica um trombócito não marcado pela IDO. As setas indicam a marcação de leucócitos de vários tamanhos e em diferentes estágios de maturação. Controle negativo (a) sem a incubação do anticorpo primário. Contra- coloração: Hematoxina de Harris.

5.4 RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO NO FÍGADO

Os resultados observados no estudo imuno-histoquímico, utilizando o Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) (concentração 1:100) no fígado de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) demonstrou que a marcação ocorreu apenas

em algumas células sanguíneas presentes dentro de alguns vasos sanguíneos (figura 10. A, B (v)), dentre as células marcadas pode-se visualizar linfócitos (figura 10. A, B e figura 11 A) e células polimorfonucleares (figura 11. A), seguido dos controles negativos sem incubação do anticorpo primário (figura: 10 A1, B1 e 11. a).

A mensuração do fígado (figura 9) demonstrou resultados com valores médios de 5,31% ($5,31 \pm 2,79$) de área marcada no fígado, numa área/frame de 149774,61 μm^2 (Gráfico 1).

Figura 9 – Imuno-histoquímica do fígado sem contra-coloração para mensuração

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: (2) Marcação positiva para os receptores de IDO no fígado de trutas arco-íris, utilizando somente o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, para a mensuração (concentração 1:100).

Figura 10- Imuno-histoquímica do fígado (A, B), marcação positiva, (A1, B1) controle negativo.

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: Expressão Imuno-histoquímica da IDO (concentração 1:100) em fígado de trutas arco-íris: Em (A) seta preta indica e células imaturas marcadas dentro do vaso (V), seta vermelha indicando a marcação de camadas da musculatura lisa em (B) círculo mostrando linfócitos marcados positivamente dentro do vaso sanguíneo (V), Setas vermelhas indicam os eritrócitos não marcado pela IDO. Em (A1, B1) controles negativos sem a incubação com o anticorpo primário. Contra-coloração: Hematoxina de Harris.

Figura 11- Imuno-histoquímica do fígado (A) marcação positiva (a) controle negativo

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: Expressão Imuno-histoquímica da IDO (concentração 1:100) no fígado de trutas arco-íris. (A) Circulo indicando eritrócitos dentro do vaso sanguíneo (v) não marcados pela IDO; setas vermelhas indicando a marcação de células polimorfonucleares; seta amarela indicando a marcação de linfócitos de vários tamanhos. (a) controle negativo da amostra sem a incubação com o anticorpo primário. Contra- coloração: Hematoxina de Harris.

5.5. RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO NO RIM CEFÁLICO

Na imuno-histoquímica do rim cefálico de trutas arco-íris (*oncorhynchus mykiss*), utilizando o anticorpo primário: Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals), foi possível identificar marcações positivas para os receptores de IDO, no tecido linfóide (Figura 13. A e B estrela, leucócitos dispersos no tecido hematopoiético e dentro dos vasos sanguíneos em diversos estágios de maturação,

(figura 13: A, B). Marcação positiva de células do tecido interrenal e células cromafins, marcação de linfócitos dentro de um vaso sanguíneo (v) e a não marcação das células vermelhas, (figura 14. C). Observamos a presença frequente de melano-macrófagos, (Figura 13. B), porém não foi possível identificar se estas células foram marcadas positivamente devido a sua coloração escura. O controle negativo sem a incubação do anticorpo primário pode ser visualizado nas figuras 13 (A1, B1), e figura 14 (a).

A mensuração do rim cefálico (figura 12) demonstra marcações positivas para receptores de IDO com valores médios de 11,68% ($11,68 \pm 6,45$) de área marcada no rim cefálico, numa área/frame de $149774,61 \mu\text{m}^2$ (gráfico 1).

Figura 12 - Imuno-histoquímica do rim cefálico sem contra-coloração para a mensuração

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: Marcação positiva para os receptores de IDO no rim cefálico de trutas arco-íris (3), utilizando somente o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, para a mensuração (concentração 1:100).

Figura 13 – Imuno-histoquímica do rim cefálico (A, B), marcação positiva, (A1, B1) controle negativo

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: Expressão da IDO no rim cranial de trutas arco-íris pela técnica de imuno-histoquímica (Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biological). Concentração 1:100. Em (A e B) seta pretas indicando a marcação de linfócitos de vários tamanhos e diferentes estágios de maturação dentro de um vaso sanguíneo (v), estrela, tecido linfoide (repleto de leucócitos, seta brancas indicando os melano-macrófagos (B), círculos mostrando a marcação positiva de glândulas interrenais. Controle negativo da amostra sem a incubação do anticorpo primário (A1 e A2). Contra- coloração: Hematoxina de Harris.

Figura 14 – Imuno-histoquímica do rim cefálico marcação positiva (A) controle negativo (a)

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: Expressão da IDO no rim cranial de trutas arco-íris pela técnica de imuno-histoquímica (Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biological). Concentração 1:100. Em (A) forte marcação de células do tecido interrenal indicada pela seta vermelha, quadrado pontilhado mostrando uma possível célula cromafim, setas pretas indicando linfócitos dentro do vaso sanguíneo (v), círculo vermelho indicando um eritrócito não marcado. Controle negativo da amostra sem a incubação do anticorpo primário (a). Contra-coloração: Hematoxina de Harris.

Gráfico 1 – Mensuração das marcações positivas (área/Frame por μm^2) e a área com os tecidos marcados em porcentagem (%)

Fonte: (CARDOSO, 2014)

Para todos os resultados obtidos pela imuno-histoquímica foi utilizada, como controle endógeno da reação, o tumor de cadelas, este utilizado como controle das amostras e o cólon de camundongo que foi utilizado como controle endógeno do anticorpo.

Figura 15 – Controles endógenos, tumor de cadelas (A) cólon de camundongo (C) controle negativo endógeno (B, D).

Foto: CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ-USP (2014)

Legenda: Marcação positiva para a IDO, utilizando o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, (concentração 1:100). Em (A) controle endógeno tumor de cadela, Em (C) controle endógeno do anticorpo cólon de camundongo. Controle negativo da amostra (B, D) Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

5.6. RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO NO IMPRINT DO RIM CEFÁLICO

A imuno-histoquímica do imprint do rim cefálico, com o anticorpo Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) demonstrou marcação positiva de alguns leucócitos como os monócitos e linfócitos, e células indiferenciadas (figura 15 A, B), seguidos de controle negativo sem incubação do anticorpo primário (figura 15 A1, B1).

Figura 16 – Imuno-histoquímica do imprint de rim cranial marcação positiva (A, B) e controle negativo da amostra (A1, B1)

Foto: CARDOSO, (2013)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2013)

Legenda: Expressão da IDO no imprint do rim cranial de trutas arco-íris pela técnica de imuno-histoquímica (Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biological). Concentração 1:100.

Seta vermelha (A) marcação positiva de um monócito. Em (A e B) setas pretas indicam a marcação de linfócitos de vários tamanhos e diferentes estágios de maturação, e círculos pretos indicando células indiferenciadas (A1 e B1) Controle negativo da amostra sem a incubação do anticorpo primário. Contra- coloração: Giemsa.

5.7. RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO EM CÉLULAS SANGUÍNEAS

Pela imuno-histoquímica, foi possível verificar a expressão de IDO em extensões sanguíneas de trutas arco-íris (*oncorhynchus mykiss*), onde algumas células que compreendem o sistema imunológico como os linfócitos, monócitos e neutrófilos demonstraram afinidade com o anticorpo Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) concentração 1:100 (figura 17 e 18). Seguido pelo controle negativo sem a utilização do anticorpo primário.

A contagem diferencial de leucócitos nas extensões sanguíneas (x5000) num aumento de 100x ($20 \mu\text{m}^2$) demonstrou que em um total de 50,000 células, 6021 eram linfócitos e 378 eram monócitos detectados pela expressão da IDO. Estas células apresentaram-se com valores médios de $111,24 \pm 46,50$ células positivas num total de $4712,72 \pm 881,17$ para células negativas, as quais corresponderam aos eritrócitos e trombócitos. Pela avaliação das diferenças dos valores de células positivas dos diferentes grupos com o teste do Qui-quadrado (9 graus de liberdade e nível de significância de 5% foram encontrados o valor de 21,982 para Qui-quadrado e dependência entre a população de linfócito e monócito ($p < 0,01$). Na avaliação das células positivas dos grupos pelo teste t-Student, foram encontrados valores médios de $602,1 \pm 202,2$ para os linfócitos positivos ($p < 0,01$) e $37,8 \pm 20,1$ monócitos positivos ($p = 0,25$) detectados pela imuno-histoquímica.

As células polimorfonucleares (neutrófilos), obtiveram valores muito próximos a zero e não foi considerado pelos testes de Qui-quadrado e t-Student, sendo possível calcular somente a sua média e desvio padrão, que foi de $1,38 \pm 1,78$.

Figura 17 – Imuno-histoquímica das extensões sanguíneas marcações positivas (A, B, C, D).

Foto: (CARDOSO, (2013)

Fonte: Departamento de cirurgia FMVZ/USP (2013)

Legenda: Marcação positiva para IDO, utilizando o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, (concentração 1:100). Em (A) seta, indicando a marcação positiva de um monócito; Em (B) seta, indica um possível monócito atípico sem marcação positiva já a seta L- indica marcação de um linfócito. Em (C) seta, pode-se observar um possível linfócito não marcado e a seta M indicando marcação positiva de um monócito. E em (D), observa-se dois linfócitos um com marcação positiva (seta L) e outro sem marcação (seta). Contracoloração: Giemsa.

Figura 18 – Imuno-histoquímica diferencial de leucócitos marcação positiva (A) e controle negativo (a)

Foto: CARDOSO, (2013)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2013)

Legenda: Marcação positiva para os receptores de IDO, utilizando o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, (concentração 1:100). Seta, indicando a marcação de um neutrófilo, observa-se também a grande quantidade grânulos citoplasmáticos e núcleo segmentado. Contra-coloração: Giemsa Controle negativo da amostra canto superior à direita sem a incubação do anticorpo primário. Contra- coloração: Giemsa.

Figura 19 - Marcação positiva para IDO em células sanguíneas de trutas arco-íris (A, B, C D), e controle negativo (A1, B1, C1, D1)

Foto: (CARDOSO, (2014)

Fonte: Departamento de Cirurgia FMVZ/USP (2014)

Legenda: Marcação positiva para os receptores de IDO, utilizando o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, (concentração 1:100). Em (A, B, C, D) as setas pretas indicam a marcação de linfócitos, em (A), círculo, célula indiferenciada. Em (B), cabeça seta vermelha marcação de um neutrófilo. Em (C) círculo, célula indiferenciada. Em (D), seta vermelha indica um monócito, e seta branca indicando um polimorfonuclear. Controle negativo da amostra (A1, B1, C1, D1) sem a incubação do anticorpo primário. Contracoloração: Giemsa.

Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível evidenciar a expressão de Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO1) em algumas células sanguíneas como linfócitos, monócitos e neutrófilos, bem como a marcação em alguns tecidos hematopoiéticos como o baço, fígado e o rim, pela técnica da imuno-histoquímica e Western Blot (WB), este último auxiliando na determinação do anticorpo de escolha para a realização deste trabalho científico.

Os resultados com as marcações dos anticorpos Everest e Lifespan não puderam ser validados, dado ao fato de não obtermos resultados com o teste de Western Blot. A não reação dos testes realizados com os anticorpos Anti-IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase) clone 10.1 (Millipore) e Anti-IDO, clone 1F8.2 (Millipore), pode ser explicada pelo fato dos anticorpos serem reativos, respectivamente, para as espécies humana e murina, e somente humana (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003), não havendo reação cruzada com a IDO de truta arco-íris.

O fato dos resultados obtidos com o anticorpo IDO1 (Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) terem sido positivos, pode estar relacionado com o fato da IDO (também referida como IDO1) e a IDO-paráloga (IDO2) catalisarem o mesmo passo da taxa limitante do catabolismo do triptofano (Trp) ao longo da via das quinureninas (PALLOTTA et al., 2011).

As bandas que detectam presença da enzima IDO nas amostras: C1, C2, (controle endógeno tumor de mama em cadelas), marcaram próximos ao peso molecular descrito nas especificações do anticorpo em 45,3 kDa, e as amostras (Figura 3) A10 (sangue), A7 (rim cefálico) também marcaram muito próximas de 45,3 kDa, corroborando em parte com a hipótese de Thomas; Stocker (1999), que afirma que a IDO é uma oxigenase monomérica com peso molecular que varia entre 40 a 43 kDa. Os resultados do teste de Western Blot, com o anticorpo de escolha nas amostras de células sanguíneas e rim cefálico as bandas duplas não permaneceram paralelas umas às outras como ocorre nas amostras controles, pois a segunda banda se separou mais, deixando-as distantes, as bandas duplas que apareceram tanto nos controles quanto nas amostras, marcaram o peso molecular descrito nas especificações da bula do anticorpo em 45,3 kDa, porém a própria especificação

mostra que o cálculo do peso molecular está de acordo com NP_002155.1, e que ambas as bandas detectadas foram bloqueadas por incubação com sucesso com o peptídeo imunizante (e os resultados do BLAST com a sequência de peptídeo imunizante não identificou qualquer outra proteína para explicar as bandas adicionais).

Este fato pode estar relacionado com o anticorpo ser policlonal e apresentar maior reatividade ou reação cruzada com outras espécies, como a truta arco-íris que, está bem distante das espécies reativas para o anticorpo. A banda dupla também foi obtida no experimento de Yuasa et al., (2007), onde a estrutura dos genes da IDO1 e da IDO2 são bem conservados e em mamíferos e são apresentados em um arranjo paralelo no mesmo cromossomo.

A IDO2 (proto- IDO) existe não somente em mamíferos, mas também em vertebrados inferiores, mas nenhum gene correspondente a IDO1 dos mamíferos foi encontrada nos genomas da galinha e no *Danio rerio* (zebra-fish), o que não ocorreu em neste experimento, no qual foi possível observar a expressão da IDO1 em células sanguíneas e rim cranial de trutas arco-íris. Em humanos a expressão da IDO2 não é tão onipresente como a da IDO1, no entanto a IDO2-mRNA pode ainda ser detectada no fígado, intestino, baço, placenta, timo, pulmão, cérebro, rim e cólon. A IDO1 e a IDO2 de mamíferos (rato) e IDO2 de sapos e peixes também foram expressas em células de mamíferos intactas. Em outro experimento YUASA; USHIGOE; BALL, (2011) sugere também que a IDO de mamífero é derivada de uma proto-IDO, e que o surgimento ocorreu antes da divergência dos marsupiais e dos mamíferos placentários. O gene que provavelmente originou a IDO pode ser encontrado em bactérias e em fungos, onde foram descobertos três tipos de IDO (YUASA; BALL, 2012), sendo que sua função está relacionada à obtenção de NAD⁺ (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) via quinurenina e exerce mesma função da IDO (triptofano 2,3-dioxigenase) em mamíferos, este fato pode sugerir que a IDO1 em trutas arco-íris é expressa em células e órgão ligados a regulação da imunidade assim como o dos vertebrados superiores.

Em 2007 foram descobertos parálogos da IDO, a IDO2, e a IDO específica de mamíferos atualmente chamadas de IDO1. A IDO2 foi relatada tanto em mamíferos quanto em vertebrados mais basais (YUASA; BALL, 2012). Em diversos outros grupos de vertebrados mais basais encontrou-se moléculas muito próximas em formato e função às IDOs dos mamíferos, sendo estas as consideradas proto-IDOs.

A proto-IDO foi relatada em algumas espécies de peixes e aves. Desde as camadas mais basais da escala evolutiva, a sequência de aminoácidos da proto-IDO de vertebrados foi conservada sugerindo que ela poderia exercer uma função essencial até hoje nas espécies.

Segundo Yuasa et al., (2009) as proto-IDs formaram um agrupamento (cluster) que são distintos do agrupamento (Cluster) de mamíferos. Os Genes de IDO e proto-IDO, estão presentes paralelamente nos cromossomos dos mamíferos incluindo o marsupial Opossum (gambá) enquanto que o gene proto-IDO foi somente observado no genoma de peixe e de galinha. As análises feitas pelo WB dos lisados celulares empregaram o anticorpo direcionado contra o marcador de N-terminal-Histidina de ambas as proteínas. Todas as enzimas foram expressas a níveis comparáveis exceto a IDO1 do gambá. A quantidade da expressão de IDO1 do gambá foi estimada em 12 a 20% da IDO1 do rato. Sendo que a atividade degradante de L-triptofano da IDO1 do gambá é muito forte. Levando a crer que pode ser levemente toxica para as células.

A fraca expressão de IDO2 do peixe pode ser causada pela grande distância filogenética entre o peixe (fonte de enzima) e humano (célula hospedeira) (YUASA et al., 2009). Esta evidência sugere que a IDO1 e a IDO2 surgiram via da duplicação do gene que ocorreu em um ancestral mamífero depois da divergência da linhagem mamífera. Em contraste esta árvore filogenética e as árvores previamente reportadas sugerem que a duplicação do gene ocorreu antes da divergência dos vertebrados. Alguns projetos de sequência de genoma de mais de 10 espécies de peixes estão em andamento e a IDO1 do peixe pode ser encontrada entre nestes projetos (YUASA et al., 2009). A árvore filogenética da IDO apresenta: proteínas relacionadas a IDO em moluscos, a IDO1 sendo encontrada em monotremados, marsupiais e mamíferos superiores (camundongos e humanos) e a IDO2 (proto-IDO), em anfíbios, peixes, aves, monotremados, marsupiais e mamíferos superiores. Todas as enzimas obtiveram uma expressão parecida exceto a IDO1 do marsupial e IDO2 do peixe, no qual a expressão foi menor. (YUASA et al., 2012).

A dificuldade para detectar a expressão da IDO em trutas pode estar relacionada com a baixa expressão da IDO devida a maior distância filogenética em relação aos vertebrados superiores. A fraca marcação do baço e do fígado podem estar relacionadas a este fato, e a não marcação da banda de IDO do fígado pode ser explicada pelos achados de YUASA; USHIGOE; BALL, (2011), que sugeriu que

a IDO1 não é expressada no fígado, mas foi possível amplificar o cDNAs da IDO1 de amostras de fígado, contudo o resultado da quantidade da amostra do PCR da IDO1 foi muito menor do que da IDO2 sugerindo que as amostras amplificadas podem derivar dos leucócitos residuais das amostras do fígado. No fígado a marcação da expressão da IDO ficou limitada a algumas células dentro de pequenos vasos sanguíneos, sendo que este fato pode estar ligado a não marcação da IDO1 pelo teste de western blot contendo amostras do fígado, porém podemos visualizar a marcação de linfócitos dentro dos vasos sanguíneos pelo método da imuno-histoquímica, sugerindo que a marcação dos linfócitos na truta arco-íris possa estar correlacionada somente aos leucócitos e não com a estrutura hepática.

Por não possuírem medula óssea, os linfócitos dos peixes migram para o baço, e os achados encontrados no tecido esplênico pela técnica da imuno-histoquímica, demonstram que as marcações das expressões da IDO são aleatórias, porém algumas células imaturas, dentre elas os leucócitos marcados estavam dentro de pequenos vasos sanguíneos ou disperso no tecido esplênico. Por ser um órgão linfóide e possuir em sua estrutura tanto os linfócitos T quanto B, sugere-se que a marcação só ocorra nos leucócitos e que a estrutura esplênica não é marcada pela IDO como podemos visualizar neste experimento, onde as áreas de cordões esplênicos não estão marcados positivamente. Este achado corrobora com a afirmação de que as células IDO-positivas estão amplamente distribuídas primariamente e secundariamente em órgãos linfóides (MUNN et al., 1999). Foi relatado no experimento de Dai e Zhu (2010), que poucas células do baço de ratos controle expressavam a IDO, onde foi notada a presença de aglomerados de pequenas células mononucleares dispersos na polpa vermelha do baço (Mellor et al., 2003; Dai e Zhu., 2010). Os resultados deste estudo mostraram que as células IDO-positivas foram marcadas principalmente em regiões espalhadas na polpa vermelha, em particular na zona marginal localizada entre a polpa branca e a polpa vermelha circundante, contendo macrófagos e células reticulares (com funções de apresentação de antígeno), características estas que também foram observadas no baço de trutas.

No rim cefálico foi possível observar uma expressão positiva da IDO nas células presentes dentro dos vasos sanguíneos, sendo que este parâmetro também foi encontrado em um estudo realizado com camundongos machos e fêmeas onde foi identificada a expressão da IDO em camadas da musculatura lisa de pequenos

vasos sanguíneos localizados nos rins, ao passo que em células endoteliais vasculares não foi encontrada marcação específica (DAI e ZHU, 2010). Houve marcação positiva para a IDO no tecido hematopoiético, pois o rim cefálico é considerado um órgão primário diferenciador de células (ZAPATA, 1981), além de ser o principal tecido hematopoiético, possui função endócrina e imunológica, atuando na produção de anticorpos e catecolaminas (WEYTS et al., 1999), este fato pode explicar os achados encontrados como a marcação positiva da IDO em glândulas interrenais e células cromafins. Nos teleósteos as células cromafins formam pequenas ilhas nas paredes das veias e, em algumas espécies, encontram-se dispersas nos rins cefálicos. Estas células desempenham funções equivalentes às das medulas adrenais em mamíferos. A biossíntese das catecolaminas ocorre através das células cromafins dos teleósteos e a inativação dessas moléculas ocorre pela via hepática e pelos rins antes de serem excretadas pela urina. (SENS, 2009). Rocha et al., (2001) observou que a glândula interrenal e as células cromafim estão interligadas e distribuídas no rim cefálico, o que pode ser observado neste estudo.

Geralmente, a glândula interrenal consiste de grupos, cordões ou faixas de células, enquanto as células cromafins formam pequenos grupos, ambos inseridos muito próximos aos vasos sanguíneos o que pode ser observado neste estudo. A excreção de corticosteroides, (cortisol) nas células interrenais e catecolaminas nas células cromafins, assim como a adrenalina e a noradrenalina, são consideradas as respostas primárias do estresse (TAVARES-DIAS et al., 2001). Estudos realizados por Farias, et al., (1989), demonstraram que a morfologia do tecido interrenal e das células cromafins frequentemente variava, mesmo quando se examinavam espécies de peixes filogeneticamente próximas.

O fato das células interrenais e cromafins terem marcado positivamente, pode estar relacionado à ação anti-inflamatória comprovada da IDO, sendo que um estudo realizado com pacientes com doenças inflamatórias demonstrou que o T helper 1 (Th-1), IFN γ e o fator de necrose tumoral (TNF- α) são fortes indutores da expressão de IDO (WOLF; WOLF; RUMPOLD, 2004) e que a expressão e suas atividades influenciam os mecanismos da ativação imune (HAENZ; OBEXER; WINKLER, 2005).

Ao realizar os imprints com o rim cefálico foi possível observar a marcação de monócitos e de muitos linfócitos que se encontravam em diversos tamanhos este fato pode estar relacionado com os achados de Kfoury et al., 1999 que identificou duas populações de linfócitos morfologicamente distintas em trutas arco-íris, as

quais diferem-se em seus tamanhos e presença de grânulos. A marcação positiva da IDO em órgãos hematopoiéticos de trutas arco íris pode ser um indicativo de que a atividade da IDO presente em células da linhagem dos monócitos e macrófagos possa estar relacionada aos mecanismos de defesa, e deste modo ajudar a acabar com infecções. A IDO atua com mecanismos parecidos, pois recentes estudos têm dirigido os efeitos imunomodulatórios da IDO em muitos aspectos, incluindo alergia, imunologia de tumores, autoimunidade e infecção por HIV em humanos (FUCHS; FORSMAN; HAGBERG, 1990; MELLOR et al., 2003; VON BUBNOFF; KOCH; BIEBER, 2003; MURRAY, 2003; MULLER et al., 2005).

No contexto geral, a IDO pode contribuir para limitar os mecanismos imunes efetores e prevenir a atividade imune exagerada ou gerar uma imunossupressão. Desta forma a atividade da IDO é considerada como tendo um potencial ambivalente podendo atuar em benefício ou detrimento do hospedeiro. A atividade imunológica da IDO pode ser vista como um mecanismo de feedback que contra regula a ativação imune (MUNN, 2006). Podemos supor que estes mecanismos possam existir em vertebrados inferiores como, por exemplo, nas trutas arco-íris, dado aos achados obtidos neste trabalho.

Nas extensões sanguíneas, observou-se marcação seletiva de alguns leucócitos, dentre eles monócitos e linfócitos. Segundo Tavares Dias; Moraes (2004), os monócitos geralmente são caracterizados morfológicamente como células grandes e arredondadas, com núcleo em formato de “grão de feijão”, citoplasma basofílico e vacuolizado, podemos observar tais características nos monócitos marcados pela IDO. A marcação positiva de monócitos nos leva a supor que as células que expressam a IDO possam estar em um estágio de maturação celular específico, ou que somente algumas células possuam receptores para IDO. Acreditamos que esta assertiva é verdadeira pelo fato de que em mamíferos nem todos os tipos de leucócitos expressam o mesmo nível de IDO (WANG et al., 2013). Alguns monócitos são estimulados pelo fator- estimulador- de macrófagos (M-CSF) tornando-se macrófagos que suprimem a proliferação de células T *in vitro* (MUNN et al., 1999), este fato pode estar associado a um estágio específico de maturação. As células marcadas positivamente para a IDO fazem parte do sistema imunológico dos teleósteos. Munn et al., (1999) observou em seu estudo que o monócito diferenciado sob a influência do fator estimulante da colônia de macrófagos adquiriram a habilidade de suprimir a proliferação de células T *in vitro* via rápida e seletiva

degradação do triptofano pela IDO. Nos salmonídeos a grande quantidade de melano-macrófagos no rim cefálico é comum (PRESS; DANNEVIG; LANDSVERK, 1994), e são consideradas uma das células mais evidenciadas, que podem ser encontradas livres ou agrupadas no tecido (COSTA, 2007), porém não foi possível evidenciar se os macrófagos também foram marcados pela IDO devido sua coloração mascarar a reação do DAB na imuno-histoquímica.

Os dados estatísticos demonstraram que de um total de células marcadas positivamente para IDO a maioria era de linfócitos onde seus valores médios foram de $602,1 \pm 202,2$ ($p < 0,01$), ressaltando a hipótese de que a porcentagem de linfócitos circulantes em trutas-arco íris é grande. (HOUSTON; DOBRIC; KAHURANANGA, 1996). Outra evidência que comprova a marcação de linfócitos são suas características morfológicas onde as células apresentam-se predominantemente arredondadas de tamanhos variados, com projeções citoplasmáticas, sem granulações visíveis, núcleo com cromatina densa ocupando quase todo o citoplasma (KFOURY et al., 1999; TAVARES DIAS; MORAES, 2004), sendo possível observar estas características neste estudo.

Na análise de microscopia de luz, foi possível observar a marcação positiva de alguns neutrófilos que nos teleósteos são caracterizados pelo formato arredondado, núcleo geralmente na forma de bastonete raramente apresentam-se na forma segmentada, com cromatina nuclear pouco compactada e sem nucléolo visível. Seu citoplasma é repleto de granulações acidofílicas. (TAVARES DIAS; MORAES, 2004).

Os neutrófilos possuem grande quantidade de peroxidase, uma enzima lisossômica presente em células fagocíticas, que promove a oxidação de certos compostos pelo peróxido de hidrogênio no processo de fagocitose, podendo aderir às células endoteliais e migrar para o foco inflamatório, atraídos por quimiotaxia (IWAMA; NAKANISHI, 1997). A sua marcação positiva pode ser devida à reatividade cruzada entre a peroxidase endógena dos neutrófilos e o DAB, podendo desta forma considerar estas células como falso positivas (LI; ZIESMER; LAZCANO-VILLAREAL 1987).

Este fato corrobora com o fato de que os neutrófilos possuem peroxidase em seus grânulos citoplasmáticos. Quando realizada a imuno-histoquímica, é feito um primeiro bloqueio com peróxido (peróxido de hidrogênio e metanol), esta faz com que consequentemente ocorra a inibição da peroxidase endógena, fazendo com que

o DAB se ligue à biotina, marcando os grânulos de neutrófilos, promovendo um resultado falso positivo da célula, no entanto não podemos afirmar se estas células são falso positivas, ou se a marcação da IDO é verdadeira nesta célula. Wang et al. (2013), realizaram um estudo com macaco rhesus (*Macaca mulatta*) e observaram que nem todos os tipos de leucócitos expressam o mesmo nível de IDO, sendo que os mais elevados níveis da enzima foram encontrados em células do tipo CD14+, CD16+, CD56+ e em células dendríticas (DCs), tendo destaque a célula CD14+ e os granulócitos que demonstraram uma maior porcentagem dessa expressão. Este fato talvez possa justificar a marcação positiva da IDO em alguns neutrófilos, bem como em outras células como os linfócitos ou monócitos, e células imaturas.

Diante dos resultados obtidos até o presente momento podemos sugerir que algumas proteínas se mantiveram conservadas durante a evolução e possam estar relacionadas aos mecanismos reguladores da resposta imunológica nesta espécie, assim como nos mamíferos. Os resultados deste trabalho poderão contribuir para experimentos posteriores no intuito de trazer mais informações relevantes do ponto de vista filogenético.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Baseado nas observações durante a elaboração deste trabalho sugere-se que houve marcação positiva da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO1), nos órgãos hematopoiéticos (rim cefálico, baço, fígado), leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos) e glândula interrenal de trutas arco-íris.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2008.

AMARAL, G. F. **Análise do segmento de trutas: Abordagens de cadeia produtiva e turismo rural**. 2007. 105p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ASTIGIANO, S.; MORANDI, B.; COSTA, R.; MASTRACCI, L. D'AGOSTINO. A.; RATTI, G. B.; MELIOLI, G.; FRUMENTO, G. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. **Neoplasia**, v. 7, n. 4, p. 390-396, 2005.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-252, 1998.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2 ed. Barueri: Manole, 1992. 629 p.

BARKSDALE, A. R.; BERNARD, A. C.; MALEY, M. E.; GELLIN, G. L.; KEARNEY, P. A.; BOULANGER, B. R.; TSUEI, B. J.; OCHOA, J. B. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. **Surgery**, v. 135, n. 5, p. 527-535, 2004.

BLAZER, V. S. Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 3, p. 77-86, 1991.

BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. Immunity. In: EVANS, D. H. **The physiology of fishes**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, p. 215-242, 1998.

BOENISCH, T. Diluent buffer ions and pH: Their Influence on the performance of monoclonal antibodies in immunohistochemistry. **Application Immunohistochemistry Molecular Morphology**. v. 7, p. 300-6, 1999.

BURROWS, A. S.; FLETCHER, T. C.; MANNING, M. J. Hematology of turbot, *Psetta maxima* L: ultrastructural cytochemical and morphological properties of peripheral blood leukocytes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, p. 77-84, 2001.

BLY, J. E., CLEM, L. W. Temperature adaptation of lymphocyte function in fish. IN COSSINS, A. R. (ED). **Temperature adaptation of biological membranes**, London Portland Press, p.169-184, 1994.

CLEM, L. W.; MILLER, N. W.; BLY, J. E. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. In: WARR, G.W.; COHEN, N. (Ed.). **Phylogenesis of immune Functions**, Boca Raton: CRC Press, 1991, p.191-213.

COSTA, G. M. **Estudo histomorfológico e análise dos perfis celulares do rim cefálico, fígado, baço e timo do *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887, Teleósteo, characidae), pacu**. 2007. 134 p. Dissertação de mestrado (mestrado em ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. W.; TIDWELL, H. J. Anaesthetics in aquaculture. **SRAC Publication**, n. 3900, 2004.

CHILMONCZYK, S. Evolution of the thymus in rainbow trout. In: MANNING, M. J.; TATNER, M. F. **Fish Immunology**, London: Academic Press, 1985, p.285-292.

CRUVINEL, W. M *et al*. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p.434-447, 2010.

DAI, X.; ZHU, B. T. Indoleamine 2,3-Dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological Functions. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 58 n. 1, 2010, p. 854–860.

DELLA CHIESA, M.; CARLOMAGNO, S.; FRUMENTO, G.; BALSAMO, M.; CANTONI, C.; CONTE, R. The tryptophan catabolite Lkynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. **Blood**, v.108, n. 13, p. 4118-4125, 2006.

ELLIS, A. E. The leucocytes of fish: a review. **Journal. Fish Biology**., v. 11, p. 453-491, 1977.

ENANE, N. A.; FRENKEL, K.; O'CONNOR, J. M.; SQUIBB, K. S.; ZELIKOFF, J. T. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. **Immunology**, v. 80, n. 1, p. 68-72, 1993.

FALCON, D.R. **β -glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração**. 2007. 158p. Tese Doutorado, em Aqüicultura, Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticalbal, 2007.

FARIAS, E. C.; ALEXANDRINO, A. C.; PINHEIRO, E. F. G.; BORELLA, M. I. Histologia do tecido inter-renal e das células cromafins de curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, pisces cypriniformes durante o ciclo reprodutivo. **Revista da**

Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo, v. 26 n. 1, p. 7-13, 1989.

FERGUSON, H. W. The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centres in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 86, p. 377-380, 1976.

FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): células y órganos. **Revista Electrónica de Acuicultura**, n. 16, 2002.

FLETCHER, T. C. Non-antibody molecules and the defense mechanisms of fish. In: Pickering, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. New York: Academic Press, p.171-183, 1981.

FISHELSON, L. Cytological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. **Journal of Morphology**, v. 229, p. 57-69, 2006.

FORERO, A. R. Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae), en Cundinamarca, Colombia. **Revista de Biología tropical**, v. 43, n. 1-3, 1995, p. 283-288.

FOREST, F. P.; OLIVEIRA, C.; TABATA, T. Y.; RIGOLINO, M. G.; FORESTI, F. NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Hereditas**, v. 136, n. 3, p. 227-230, 2002.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G.; BENATTI, U.; FERRARA, G. B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3- dioxygenase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 459–468, 2002.

FUCHS, D.; FORSMAN, A.; HAGBERG, L. Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. **Journal of Interferon γ Research**, v.10, p. 599, 1990.

GALL, G. A. E.; CRANDELL, P. A. The rainbow trout. **Aquaculture**, v. 100, p.1-10, 1992.

GARCIA-LEME, J. Hormones and inflammation. Boca Raton: **CRC Press**, 1989, p. 238.

GIACOMINI, G. **Técnicas e perspectivas de tratamento imunoterapico em câncer**. 2009. 72 p. Trabalho de Conclusão de Curso Instituto de Biociências UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2009.

HACKING, M. A.; BUDD, J.; HODSON, K. The ultrastructure of the liver of rainbow trout: normal structure and modifications after chronic administration of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 477-491, 1977.

HAINZ, U.; OBEXER, P.; WINKLER, C. Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood**, v. 105, p. 4127, 2005.

HERSHBERGER, W.K. Genetic variability in rainbow trout populations. **Aquaculture**, v. 100, n. 1-3, p. 51-71, 1992.

HIBIYA, T. Digestive system - liver. In: ATLAS of fish histology: normal and pathological features. Tokyo: Kodansha, 1982, p. 82-90.

HINES, R. S.; YASHOUV, A. Differential leukocyte counts and total leukocyte and erythrocyte counts for same normal Israeli mirror carp. Israeli. **Journal Aquaculture**, v. 22, p. 106-113, 1970.

HORTON, J.; LACKIE, A. **Immunology**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 1989, p. 15.1-15.16.

HOUSTON, A. H.; N. DOBRIC; KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 15 n. 4 p. 339-347, 1996.

ISHIZEKI, K.; NAWA, T.; TACHIBANA, T.; SAKAKURA, Y.; LIDA, S. Hematopoietic sites and development of eosinophil granulocytes in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Cell and Tissue Research**, v. 235, n. 2, p. 419-426, 1984.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T.; HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed) **The fish immune system: organism, pathogen and environment**. Waltham Academic Press, 1997. (Fish physiology, v. 15).

KAATTARI, S. L.; IRWIN, M. J. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 9, n. 3, p. 433-444, 1985.

KAILOLA, P. J., WILLIAMS, M. J., STEWART, P. C., REICHELT, R. E., MCNEE, A., GRIEVE, C. **Australian Fisheries Resources**. Bureau of Resource Sciences and Fisheries Research Development Corporation. Canberra: 1993, p. 422.

KARDONG, K, V. **Vertebrados: Anatomia comparada, função e evolução**. 5 ed. Editora Roca, 2011, p. 913.

KFOURY JR, J. R.; KURODA, A.; NAKAYASU, C.; FUKUDA, H.; OKAMOTO, N. Analysis of rainbow trout peripheral blood leucocytes separated by flow cytometry cell sorting. **Fish Pathology**, v. 34 n. 1, p. 1-6, 1999.

KFOURY JR, J. R.; NAKAYASU, C, J. C.R.; OKAMOTO, N. Characterization of a monoclonal antibody specific to rainbow trout thrombocytes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, p. 309-3016, 1999.

KUDO, Y.; BOYD C. A. R.; SPYROPOULOU, I.; REDMAN, C. W. G.; TAKIKAWA, O.; KATSUKI, T.; HARA, T.; OHAMA, K.; SARGENT, I. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 61, p. 87-98, 2004.

LAZZAROTTO, H; CARAMASCHI, E. P. 2007. Introdução da truta no Brasil e na bacia do Rio Macaé, Estado do Rio de Janeiro: histórico, legislação e perspectivas. **Oecologia Brasiliensis**, v.13, n. 4, p. 649-659, 2009.

LI, C. Y.; ZIESMER, S. C.; LAZCANO-VILLAREAL, O. Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method. **Journal of histochemistry & cytochemistry**. V. 35 n.12, p. 1457-1460, 1987.

LIANG, J.; SUN, L.; WANG, Q.; HOU, Y. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. **International Immunopharmacology**, n. 6, p. 830–838, 2006.

LOVY, J. A. N.; SAVIDANT, G. P.; SPEARE, D. J.; WRIGHT, G. M. Langerin/CD207 positive dendritic-like cells in the haemopoietic tissues of salmonids. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 365-368, 2009.

MACARTHUR, J. I.; FLETCHER, T. C. Phagocytosis in fish. In: MANNING, M., TATNER, M.F. Fish Immunology, London: **Academic Press**, 1985, p. 29-46.

MANNING, M. J. Fishes. In: TURNER, R. J. (Ed.). **Immunology**. Chichester: John Wiley and Sons, p.69-100. 1994.

MATUSHIMA, E. R. **Cinética da reação inflamatória induzida pela carragenina na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo)**. 1988. 58 p. Dissertação de Mestrado Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1988.

MELA, M.; RANDI, M. A. F.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. E. V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA, R. C. A.. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 3, p. 426-435, 2007.

MELLOR, A. L., MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 762– 769, 2004.

MELLOR, A. L.; BABAN, B.; CHANDLER, P.; MARSHALL, B.; JHAVER, K.;HANSEN, A.; KONI, P. A.; IWASHIMA, M.; MUNN, D. H. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 1652- 1655, 2003.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal antifetal immune responses. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 5-13, 2001.

MESEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; GARCIA-AYALA, A. Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost seabream (*Sparus aurata* L): an ultrastructural and cytochemical study. **Anatomical Record**, n. 241 p. 303-309, 1995.

MOFFETTI, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. Tryptophan and the immune response. **Immunology and Cell Biology**. v. 81, n. 4, p.247-65, 2003.

MULLER, A. J., DUHADAWAY, J. B., DONOVER, P. S., SUTANTO-WARD, E., PRENDERGAST, G. C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. **Nature Medicine**, v. 11, p. 312–318, 2005.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1147-1154, 2007.

MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. **Current Opinion Immunology**, v.18, p. 220, 2006.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; HOU, D.; BABAN, B.; LEE, J. R.; ANTONIA, S. J.; MESSINA, J. L.; CHANDLER, P.; KONI, P. A.; MELLOR, A. L. Expression of IDO by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 280–290, 2004.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; LEE, J. R. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, v. 297, p. 1867–1870, 2002.

MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, I. B.; PASHINE, A.; MELLOR, A. L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 9, p. 1363–1372, 1999.

MUNN D. H., ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S. J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism, **Science**, v. 281, n. 5380, p.1191-1193, 1998.

MURAMAKI, Y.; HOSHI, M.; IMAMURA, Y.; ARIOKA, Y.; YAMAMOTO, Y.; SAITO, K. Remarkable role of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolites in infectious diseases: Potential Role in Macrophage-Mediated Inflammatory Diseases, **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

MURRAY, M. F. Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis. **Lancet Infectious Disease**, v. 3, p. 644, 2003.

OLIVEIRA, L. J. Degradação de Triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidencia da atividade da Indoleamina 2,3-dioxigenase? 2005, p. 91. Dissertação de mestrado (mestrado em ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PALLOTTA, M. T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; VACCA, C.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; SERVILLO, G.; BRUNACCI, C.; CALVITTI, M.; BICCIATO, S.; MAZZA, E. M. C.; BOON, L.; GRASSI, F.; FIORETTI, M. C.; FALLARINO, F.; PUCCHETTI, P.; GROHMANN, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells, **Nature Immunology**, v. 12, n. 9, p. 870-878, 2011.

PRESS, C. M. L.; DANNEVIG, B. H.; LANDSVERK, T. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells the spleen and head

kidney of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Fish Shellfish Biology**, v. 4, p. 79-93, 1994.

PORTO-FORESTI, F., OLIVEIRA, C., TABATA, Y.A., RIGOLINO, M. G., FORESTI, F. NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Hereditas**, v.136, p.227-230, 2002.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; LUQUE, J. L. Parasitological and hematological analysis in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757, from Guarapiranga Reservoir São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum**, v.27, n.3, p. 231-237, 2005.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004, p. 89-120.

RAZQUIN, B. E.; CASTILLO, A.; LÓPEZ-FIERRO, P.; ÁLVAREZ, F.; ZAPATA, A.; VILLENA, A. J. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno and enzyme-histochemical study. **Journal of Fish Biology**, v. 36, n. 2, p. 159-173, 1990.

ROBERTS, R. J. The immunology of Teleost. In: **Fish pathology**. London: Bailliere Tindall, 1998, p.135-150.

ROCHA, R. M.; SANTOS, L. H. S.; VICENTINI, C. A.; CRUZ, C. Structural and ultrastructural characteristics of interrenal gland and chromaffin cell of matrinxã, *Brycon cephalus* gunther (teleostei-characidae). **Anatomy Histology Embryology**, v.30, 2001, p. 351-355.

ROCHA, E.; MONTEIRO, R. A. F.; PEREIRA, C. The liver of the trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. **Journal of Anatomy**, v. 185, 1994, p. 241-249.

ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985, p. 15-28.

ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. **Vertebrate blood cells**. New York: Cambridge University Press, 1998.

SANCHES, D. S. **Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo "GAP", as conexinas em tecidos ósseo normal e neoplásico de cães,**

2007, p. 73. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SASAKI, Y.; MAITA, M.; OKAMOTO, N. Rainbow trout neutrophils are responsible for non-specific cytotoxicity. **Fish Shellfish Immunology**. v. 12, p. 243-252, 2002.

SATO, G. S.; TAKAHASHI, N. S.; TABATA, Y. A. Truta de Campos do Jordão, valorização do produto local através da indicação geográfica do turismo e da gastronomia. **Informações Econômicas**, v.41, n.3, 2011, p. 68-77.

SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: celular defensas. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. **The fish immune system**. London: Academic Press, 199, p. 63-105.

SECOMBES, C. J.; FLECHER, T.C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. **Annual. Review of Fish Diseases**., v. 2, p. 53-71, 1992.

SENS, D. R **Efeitos do triclorfom no crescimento e parâmetros hematológicos de tambaquis (*Colossoma macropomum*)**. 2009. p. 60, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2009.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H.; LIM, C. Immunity and disease resistance in fish. In: LIM, C., WEBSTER, C. D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Food Products Press, p.149-162, 2001.

SMITH, G. R.; STEARLEY, R. F. The classification and scientific names of rainbow trout and cutthroat trouts. **Fisheries**, v.14, p.4-10, 1989.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. **Statistical Methods**. AMES Iowa State University Press, 1974.

TABATA, Y. A. Truticultura: situação mundial e no Brasil. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE AQUICULTURA, 1., 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Infopesca, 1997.

THRALL, M. A. Classificação e diagnóstico de anemia. In: THARALL, M. A **Hematologia e bioquímica veterinária clínica veterinária**, São Paulo. Roca, 2006, p. 78-82.

TAKIKAWA, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. **Biochemical Biophysical Research Community**, v. 338, n. 1, p. 12-19, 2005.

TAKIKAWA, O.; YOSHIDA, R.; KIDO, R.; HAYAISHI, O. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 8, p. 3648-3653, 1986.

TATNER, M. F. The migration of labeled thymocytes to the peripheral lymphoid organs in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 9, p. 85-91, 1985.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Vilimpress, p.144, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. Variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.32, n. 4, p. 693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P. C. F. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. **Instituto de Pesca**, v. 27 p. 43-48, 2001.

TERNESS, P.; BAUER, T. M.; ROSE, L.; DUFTER, C.; WATZLIK, A.; SIMON, H.; OPELZ, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 447–457, 2002.

THOMAS, R. S.; STOCKER, R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. **Redox Report**, v. 4, n. 5, p. 199-220, 1999.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Cytological aspects of peripheral blood cells of *Oreochromis* (Tilapia) *niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). **Brazilian Journal Veterinary Research. Animal Science**, v. 38 n.6, pt. 2, p. 273-277, 2001.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review, **Veterinarni Medicina**, v. 56, p. 486-503, 2011.

WANG, N. L.; ZHANG, W. J.; DUAN, J. Z.; YANG, G. B. Indoleamine 2,3-dioxygenase is differentially expressed by different white blood cell populations of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, v. 42, n. 4, p. 192-203, 2013.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal Fisheries Research**, v. 22, n. 5, 1970, p. 909-914.

WELCOME, R. L. (Comp) International introductions of inland aquatic species. ROMA: FAO, 1988 (FAO Fisheries Technical Paper, n.294, 318 p.)

WEYTS, F. A. A.; COHEN, N.; FLINK, G.; VERBURG, B. M. L. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 1-20, 1999.

WOLF, A. M.; WOLF, D.; RUMPOLD, H. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. **Clinical of Immunology**, v. 113, p. 47-55, 2004.

YANO, T. The nonspecific immune system: humoral defense. In: IWANA, G.; NAKANISHI, T. **The fish Immune system**, San Diego, Academic Press, 1996, p. 207-243.

YASUI, H.; TAKAI, K.; YOSHIDA, R.; HAYAISHI, O. Interferon γ enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: it's possible occurrence in cancer patients. **Procedures Natl Acadical Science U S A.**, v. 83, p. 622-626, 1986.

YOSHIDA, R.; OKU, T.; IMANISHI, J.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Interferon γ : a mediator of indoleamine 2,3-dioxygenase induction by lipopolysaccharide, poly(I) X poly(C), and pokeweed mitogen in mouse lung. **Archives of Biochemical and Biophysic**, v. 249, p. 596-604, 1986.

YOSHIDA, R.; IMANISHI, J.; OKU, T.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by Interferon γ . **Procedures Natl Academical Science U S A.**, v. 78, p. 129-132, 1981.

YOSHINAGA, K.; OKAMOTO, N.; KURATA, O.; IKEDA, Y. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. **Fish Pathology.**, v. 29, p. 1-4, 1994.

YUASA, H. J.; BALL, H. J. The evolution of three types of indoleamine 2,3-dioxygenases in fungi with distinct molecular and biochemical characteristics. **Gene**, v. 504, n. 1, p. 64-74, 2012.

YUASA, H. J.; USHIGOE, A.; BALL, H. J. Molecular evolution of bacterial indoleamine 2,3-dioxygenase. **Gene**. V. 485, p. 22-31, 2011.

YUASA, H. J.; BALL, H. J.; HO, Y. F.; AUSTIN, C. J. D.; WHITTINGTON, K. B.; MAGHZAL, G. J.; JERMIIN, L. S.; HUNT, N. H. Characterization and evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases IDOs from monotremes and marsupials. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **Biochemistry & Molecular Biology**, v. 153, n. 2, p. 137-144, 2009.

YUASA, H. J.; TABUCO, M.; TAKAHASHI, A.; HASEGAWA, T.; NOMA, H.; SUZUKI, T. Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases. **Journal Molecular Evolution**, v. 65, p. 705-714, 2007.

YUASA, H. J.; SUZUKI, Y. Do molluscs possess indoleamine 2,3-dioxygenase? v.140, n. 3, p. 445-54, 2005.

VÁZQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and Cell**, v.39, p. 151-160, 2007.

VON BUBNOFF, D.; KOCH, S.; BIEBER, T. New jobs for an old enzyme: the revival of IDO. **Trends of Immunology**, v. 24, p. 296, 2003.

ZAPATA, A. G. Lymphoid organs of teleost fish. II. ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 5, n. 4, pt. 2, p. 685-690, 1981.

ZAPATA, A.G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996, p.1-62.

APÊNDICE A

Quadro 1 – Media e desvio padrão da contagem diferencial de leucócitos marcados pela indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) nas extensões sanguíneas (x5000) num aumento de 100x (20 μm^2).

Grupo/Animal	Linfócitos	Neutrófilo	Monócitos	células negativas	N total celulas positivas
G1/1	145	0	0	4855	145
G1/2	85	0	0	4915	85
G1/3	45	0	0	4955	45
G1/4	155	0	10	4835	165
G1/5	190	0	10	4800	200
Media	124	0	4	4872	128
D padrao	58,14	0,00	5,48	62,41	62,41
G2/1	170	0	0	4830	170
G2/2	45	0	0	4955	45
G2/3	275	0	20	4705	295
G2/4	215	0	10	4775	225
G2/5	60	0	0	4940	60
Media	153	0	6	4841	159
D Padrão	99,16	0,00	8,94	106,97	106,97
G3/1	15	0	0	4985	15
G3/2	35	0	0	4965	35
G3/3	25	0	0	4975	25
G3/4	170	0	10	4820	180
G3/5	50	0	0	4950	50
Media	59	0	2	4939	61
D. Padrão	63,38	0,00	4,47	67,77	67,77
G4/1	0	0	0	5000	0
G4/2	10	0	0	4990	10
G4/3	20	0	0	4980	20
G4/4	15	0	0	4985	15
G4/5	220	5	20	4755	250
Media	53	1	4	4942	59
D. Padrão	93,65	2,24	8,94	104,80	107,03
G5/1	10	0	0	4990	10
G5/2	10	0	0	4990	10
G5/3	85	0	5	4910	90
G5/4	45	0	0	4955	45
G5/5	105	0	10	4885	115
Media	51	0	3	4946	54
D. Padrao	43,21	0,00	4,47	47,36	47,36

G6/1	85	0	5	4910	90
G6/2	45	0	0	4995	45
G6/3	130	0	15	4855	145
G6/4	40	0	0	4960	40
G6/5	215	0	20	4765	235
Media	103	0	8	4897	111
D. Padrao	72,34	0,00	9,08	90,73	81,19
G7/1	105	0	0	4895	105
G7/2	255	0	30	4715	285
G7/3	341	5	34	4620	380
G7/4	300	0	10	4690	310
G7/5	55	0	0	4945	55
Media	211,2	1	14,8	4773	227
D. Padrao	124,83	2,24	16,28	139,76	139,76
G8/1	175	0	5	4820	180
G8/2	275	0	20	4705	295
G8/3	210	0	10	4780	220
G8/4	150	0		4850	150
G8/5	120	0	15	4865	135
Media	186	0	12,5	4804	196
D. Padrao	59,73	0,00	6,45	64,17	64,17
G9/1	210	0	5	4785	215
G9/2	125	0	0	4875	125
G9/3	245	5	20	4730	270
G9/4	85	0	25	4890	110
G9/5	125	0	15	4860	140
Media	158	1	13	4828	172
D. Padrão	66,67	2,24	10,37	68,06	68,06
G10/1	100	0	10	4890	110
G10/2	70	0	0	4930	70
G10/3	25	0	0	4975	25
G10/4	145	0	10	4845	155
G10/5	190	0	15	4795	205
Media	106	0	7	4887	113
D. Padrao	64,17	0,00	6,71	70,41	70,41

Quadro 2 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 10, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

Quadro 4 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 8, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test						sexta-feira, junho 28, 2013, 15:11:36
Data source: Data 2 in Notebook1						
Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.564)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
ido8	5	0	185.000	42.644	19.071	
Hypothesized population mean 0.000						
t = 9.701 with 4 degrees of freedom. (P = <0.001)						
95 percent confidence interval for the population mean: 132.051 to 237.949						
There is a statistically significant difference between the mean of the sampled population and the hypothesized population mean (P = <0.001).						
Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000						

Quadro 5 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 7, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test						sexta-feira, junho 28, 2013, 15:11:27
Data source: Data 2 in Notebook1						
Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.057)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
ido7	5	0	182.200	134.661	60.222	
Hypothesized population mean 0.000						
t = 3.025 with 4 degrees of freedom. (P = 0.039)						
95 percent confidence interval for the population mean: 14.996 to 349.404						
There is a statistically significant difference between the mean of the sampled population and the hypothesized population mean (P = 0.039).						
Power of performed test with alpha = 0.050: 0.626						

Quadro 6 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 6, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test						sexta-feira, junho 28, 2013, 15:11:16
Data source: Data 2 in Notebook1						
Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.517)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
ido6	5	0	54.800	42.558	19.033	
Hypothesized population mean 0.000						
t = 2.879 with 4 degrees of freedom. (P = 0.045)						
95 percent confidence interval for the population mean: 1.957 to 107.643						
There is a statistically significant difference between the mean of the sampled population and the hypothesized population mean (P = 0.045).						
Power of performed test with alpha = 0.050: 0.586						

Quadro 7 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 5, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test						sexta-feira, junho 28, 2013, 15:11:03
Data source: Data 2 in Notebook1						
Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.419)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
ido5	5	0	30.400	28.245	12.632	
Hypothesized population mean 0.000						
t = 2.407 with 4 degrees of freedom. (P = 0.074)						
95 percent confidence interval for the population mean: -4.671 to 65.471						
The difference between the mean of the sampled population and the hypothesized population mean is not great enough to reject the hypothesis that the difference is only due to random sample variability. There is not a significant difference between the two means (P = 0.074).						
Power of performed test with alpha = 0.050: 0.450						
The power of the performed test (0.450) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.						

Quadro 8 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 4, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test

sexta-feira, junho 28, 2013, 15:10:52

Data source: Data 2 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ido4	5	0	43.000	64.140	28.684

Hypothesized population mean 0.000

t = 1.499 with 4 degrees of freedom. (P = 0.208)

95 percent confidence interval for the population mean: -36.641 to 122.641

The difference between the mean of the sampled population and the hypothesized population mean is not great enough to reject the hypothesis that the difference is only due to random sample variability. There is not a significant difference between the two means (P = 0.208).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.213

The power of the performed test (0.213) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Quadro 9 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 4, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test

sexta-feira, junho 28, 2013, 15:10:38

Data source: Data 2 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, One-Sample Signed Rank Test begun

One-Sample Signed Rank Test

sexta-feira, junho 28, 2013, 15:10:38

Data source: Data 2 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
ido4	5.000	0.000	14.000	2.500	98.000

Hypothesized population median 0.000

W= 10.000 T+ = 10.000 T-= 0.000

Z-Statistic (based on positive ranks) = 1.826

P(est.)= 0.100 P(exact)= 0.125

Yates correction for continuity was used in calculating this test.

95 percent confidence interval for the population median: 0.000 to 154.000

The difference between the median of the group and the hypothesized population median is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a significant difference between the two medians (P = 0.125).

Quadro 10 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 3, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test

sexta-feira, junho 28, 2013, 15:10:15

Data source: Data 2 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.690)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ido3	5	0	48.800	40.301	18.023

Hypothesized population mean 0.000

t = 2.708 with 4 degrees of freedom. (P = 0.054)

95 percent confidence interval for the population mean: -1.241 to 98.841

The difference between the mean of the sampled population and the hypothesized population mean is not great enough to reject the hypothesis that the difference is only due to random sample variability. There is not a significant difference between the two means (P = 0.054).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.537

The power of the performed test (0.537) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Quadro 11 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 2, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test

sexta-feira, junho 28, 2013, 15:10:03

Data source: Data 2 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.419)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ido2	5	0	50.800	44.150	19.744

Hypothesized population mean 0.000

t = 2.573 with 4 degrees of freedom. (P = 0.062)

95 percent confidence interval for the population mean: -4.019 to 105.619

The difference between the mean of the sampled population and the hypothesized population mean is not great enough to reject the hypothesis that the difference is only due to random sample variability. There is not a significant difference between the two means (P = 0.062).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.498

The power of the performed test (0.498) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Quadro 12 – Valores de “p” para a expressão da Indoleamina 2-3, dioxigenase em células sanguíneas de trutas arco íris, grupo 1, utilizando o software InStat (La Jolla CA, EUA).

One-Sample t-test

sexta-feira, junho 28, 2013, 15:09:50

Data source: Data 2 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.760)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ido1	5	0	34.000	16.985	7.596

Hypothesized population mean 0.000

t = 4.476 with 4 degrees of freedom. (P = 0.011)

95 percent confidence interval for the population mean: 12.910 to 55.090

There is a statistically significant difference between the mean of the sampled population and the hypothesized population mean (P = 0.011).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.909

APÊNDICE B

Tabela 2 - Mensuração do de trutas arco-íris utilizando microscópio óptico Axioscópico Zeiss® analisados em um microcomputador com programa de mensuração específico KS-400 Zeiss® num aumento de 40x (50 μm) área/Frame por μm^2 .

área/Frame por μm^2 149774,61	Área/percent IDO-baço	Área/percent IDO- fígado	Área/percent IDO- Rim cefálico
MEDIA	17,31	5,31	11,68
D. PADRÃO	6,04	2,79	6,45

APÊNDICE C

Expressão da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)

Fernanda Cardoso ^{a*}, Carlos Eduardo Bruno Malavasi^a, Cristiane Cagnoni Ramos ^a, Andre Luiz Veiga Conrado ^a, Yara A. Tabata ^b, Joana M. Pinto ^c, Francisco Javier Hernandez Blazques ^a José Roberto Kfoury Junior ^a.

a Departamento de Cirurgia setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

b APTA- C. Jordão/SP Médica Veterinária -Especialidade: Reprodução, Manipulação cromossômica.

c Instituto de Ciências Biolômédicas, departamento de biologia tecidual e celular

Abstract

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima que cataboliza o aminoácido triptofano, levando à inibição da proliferação de linfócitos T, seja pela exaustão desse aminoácido no ambiente, ou pela indução via catabólitos induzindo-os a apoptose. Em mamíferos, esta enzima atua em diversas condições do organismo como a gestação, infecções, inflamações crônicas, transplantes e tumores, sendo reconhecida como uma autêntica reguladora imunológica. Este estudo teve por objetivo averiguar a presença da IDO em células sanguíneas e órgãos hematopoiéticos de trutas arco-íris, colaborando para o estudo filogenético do sistema imune nos vertebrados, particularmente dos peixes onde a expressão de IDO foi observada em todos os órgãos hematopoiéticos estudados incluindo os leucócitos e também foi observada marcação positiva para a enzima em pequenos vasos sanguíneos do rim cefálico, baço e fígado. Os resultados obtidos, apresentando marcações positivas da IDO restritas em leucócitos e tecidos hematopoiéticos de trutas arco-íris, poderiam significar a primeira evidência de que a IDO, à semelhança do que ocorre nos mamíferos, possa estar relacionada ao sistema imunológico nesta espécie.

Palavra-chave: Indoleamina 2,3-Dioxigenase, Trutas Arco-íris, Leucócitos, Órgãos hematopoiéticos.

1. Introdução

A truta arco-íris é considerada um modelo experimental importante, pois é amplamente utilizada em diversos centros de pesquisa. Segundo Gall; Crandell, (1992), com exceção da carpa comum, a truta arco-íris é uma das espécies mais antigas empregadas em cultivo.

Peixes, de modo geral, dispõem de mecanismo de defesa inato e adquirido (GARCIA-LEME, 1989), representando o primeiro grupo de vertebrados a ter desenvolvido imunidade adquirida. Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de compreender os mecanismos envolvidos, bem como compará-los aos mamíferos; no entanto, devido à falta de marcadores específicos para células imunes de peixes, esta tarefa torna-se mais difícil (LOVY, 2009). A imunidade dos peixes pode ser dividida em imunidade inata, que constitui a primeira linha de defesa, e em imunidade adquirida, que é dependente de anticorpos, ambas podem ser mediadas por células ou pela imunidade humoral (IWAMA; NAKANISHI. 1996).

A imunidade inata envolvem os leucócitos, que desenvolvem várias ações como, por exemplo, a inflamação e a fagocitose. Esta é composta por várias substâncias como as lisozimas, interferon, proteína C

reativa, transferrina e lectina, que podem ser comumente encontradas no muco, soro e ovo dos peixes e inibem o crescimento de microrganismos infecciosos (SECOMBES, 1996; YANO, 1996). A imunidade adquirida é mais específica e pode desencadear uma resposta humoral, que é mediada por anticorpos ou uma resposta mediada por células, ambas proporcionam ao indivíduo proteção e memória imunológica (SHOEMAKER et al., 2001). Neste presente estudo avaliamos alguns dos principais órgãos hematopoiéticos que fazem parte do sistema imunológico, como o rim cefálico, baço e o fígado, e as células sanguíneas.

A medula óssea e os linfonodos estão ausentes nos peixes. Em trutas arco íris o rim cefálico é o principal responsável pela hematopoiese (FORERO, 1995), assemelhando-se morfológicamente à medula óssea dos vertebrados superiores (MESEGUER et al., 1995). O rim cranial ou cefálico é considerado um órgão primário diferenciador de células, além de ser o principal tecido hematopoiético, possui função endócrina e imunológica, atuando na produção de anticorpos e catecolaminas (ZAPATA, 1981). Já o baço é considerado um órgão linfóide secundário, sendo responsável pela especialização dos leucócitos (HORTON; LACKIE, 1989). O fígado apresenta um papel semelhante no que se referem ao sistema imunológico de mamíferos, suas funções incluem a assimilação de nutrientes, produção de bile, desintoxicação e manutenção da homeostase metabólica, que inclui processamento de carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas, pois o fígado é responsável pela produção de proteína reativa, que compõe a cascata de eventos desencadeada pelo sistema complemento desempenhando um papel importante na síntese de proteínas plasmáticas (FLETCHER, 1981).

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima oxigenase que cataboliza o aminoácido triptofano, levando à inibição da proliferação de linfócitos T, seja pela exaustão desse aminoácido no ambiente ou pela indução via catabólitos a apoptose (BARKSDALE et al., 2004). A IDO em mamíferos é expressa em diversos tecidos como o cerebral, pulmonar, cardíaco, renal e intestinal (TAKIKAWA et al., 1986) e também por alguns tipos celulares, como monócitos *in vitro*, células tumorais (MUNN; SHARMA, 2002) e por células trofoblásticas (MUNN et al., 1998). A IDO é reconhecida como um autêntico regulador da imunidade em diversas condições do organismo que se utilizam de mecanismos de evasão do sistema imunológico, como por exemplo, a gestação, infecções, alergias, inflamações crônicas, transplantes e tumores (PALLOTA et al., 2011).

Estudos *in vitro* vêm demonstrando que a expressão da IDO por monócitos que derivam os macrófagos e células dendríticas podem inibir a proliferação de células T (MUNN et al., 2004).

Os conhecimentos em imunologia de peixes teleósteos ainda não estão totalmente elucidados se comparados ao dos mamíferos, portanto estudos nesta área tornam-se uma ferramenta importante que poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos do sistema imunológico da truta arco-íris. Informações sobre a presença ou função dessa enzima em peixes são escassas e, uma vez que filogeneticamente esta classe de animais sofreu mudanças significativas na evolução do sistema imunológico, formulou-se a hipótese de que, se confirmada a presença da IDO em trutas arco-íris (*oncorhynchus mykiss*), esta poderia participar de um processo regulatório da resposta imune nesses animais. A constatação da existência da expressão da IDO em leucócitos e nos órgãos hematopoiéticos trará contribuições efetivas para o entendimento de mecanismos de regulação nessa espécie animal. A avaliação da presença da IDO em células sanguíneas e órgãos hematopoiéticos de trutas arco-íris poderia evidenciar a existência de mecanismos reguladores da resposta imunológica, corroborando, dessa forma, para o estudo filogenético do sistema imunológico nos vertebrados, particularmente dos teleósteos.

1. Material e Método

1.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os peixes utilizados foram fornecidos pela Estação Experimental de Salmonicultura “Dr. Ascânio Faria” da Apta Regional Vale do Paraíba da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado, localizada dentro do Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, Brasil.

Para realização deste trabalho, foram utilizadas 50 trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), fêmeas adultas de um ano de idade e aproximadamente 1kg, que foram divididas em dez grupos de cinco animais em cada grupo para poder estudar a ocorrência da IDO e compara-las entre si.

Os peixes foram mantidos em tanques de fibra de vidro, contendo cerca de 1500 litros de água corrente, abastecimento e escoamento independentes, sob condições naturais de fotoperíodo. A renovação do volume total da água dos tanques é realizada duas vezes por hora, de modo a suprir a demanda de oxigênio dissolvido. Durante o estudo, os animais receberam ração comercial extrusada administrada três vezes ao dia *ad libitum*.

2.2. COLETA DE MATERIAL

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para punção sanguínea e 1:500 no momento da eutanásia para a retirada dos órgãos. Inicialmente, a benzocaína foi dissolvida previamente em álcool etílico (qsp) e, em seguida, diluída na água (WEDEMEYER, 1970; MATUSHIMA, 1988). A manipulação dos peixes só foi iniciada após os mesmos apresentarem diminuição dos movimentos operculares e perda de equilíbrio (COYLE et al. 2004). As trutas foram retiradas da água e pesadas em uma balança (Sartorius BP 8100). Após estes procedimentos, o sangue foi coletado pela punção da veia caudal utilizando-se seringas heparinizadas. Uma alíquota foi utilizada para a confecção das extensões sanguíneas em lâminas silanizadas (Starfrost) e o restante foi submetido à centrifugação 1600 rpm por dez minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o tampão leucocitário foi utilizado para a confecção das extensões sanguíneas. Para a análise morfológica das células sanguíneas foi utilizada a coloração de May-Grünwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Após a retirada do rim cefálico foi realizado um imprint em lâminas de vidro para averiguar a presença de células sanguíneas. Tanto as extensões sanguíneas quanto os imprints foram fixados em metanol por cinco minutos.

Após a coleta de sangue e eutanásia das trutas, amostras de rim cefálico, baço e fígado, foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4%, pH 7.2.

2.3. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a realização da imunohistoquímica foi utilizado o anticorpo Anti-IDO policlonal NB 100-2459 Novus biologicals, (Novus)

As lâminas silanizadas contendo as extensões sanguíneas (esfregaço) e o imprint do rim cranial, foram submetidas ao bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol, e o bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com leite em pó a 5%, e então incubadas em câmara úmida *overnight* com os anticorpos primários na concentração de 1:100. Foi realizado um controle positivo e um negativo para cada um dos cinco anticorpos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram novamente incubadas com anticorpo secundário HRP-Link (Dako Envision System HRP, K1390) e revelados

em solução cromógena de diaminobenzidina (DAB, 3,3'- diaminobenzidine, Sigma) por 5 minutos. Por fim, os cortes foram contra-corados com May-Grünwald-Giemsa-Wright (Millipore) (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), lavados abundantemente em água corrente e desidratados em etanol, cujas soluções estavam em concentração crescente. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount® (Fischer scientific).

As células contendo as extensões sanguíneas foram contadas (x 5000 células) em campos escolhidos aleatoriamente com o auxílio de um microscópio óptico Olympus BX60 (Japão) com câmera fotográfica AxioCam HRc Zeiss® (EUA). As células com marcação positiva para a imuno-histoquímica foram contadas com o auxílio de um contador manual e os resultados foram registrados como células positivas, num aumento de 100X (20 µm).

As análises estatísticas para as extensões sanguíneas foram realizadas com o auxílio do teste t-student, para avaliação dos valores médios de cada grupo com todos os restantes, seguido pelo teste de Qui-quadrado para avaliação das diferenças das proporções encontrada em cada extensão (SNEDECOR; COCHRAN., 1974). Foi utilizado o software InStat (La Jolla CA, EUA).

2.3.1. Imuno-histoquímica para rim, baço e fígado.

Após a passagem pelos álcoois e hidratação em água destilada, a recuperação antigênica foi realizada com uso de forno micro-ondas em potência máxima durante 15 minutos com as lâminas incubadas em solução tampão citrato de sódio a 10M, pH 6,0. A solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol foi utilizada para bloquear a ação da peroxidase endógena, e para o bloqueio das reações inespecíficas foi utilizado leite em pó a 5%. Por fim, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários na concentração 1:100 em câmara úmida *overnight* em geladeira. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário HRP-Link (DAKO) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 7,4. A reação imune foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB, 3,3'- diaminobenzidine, Sigma) por cinco minutos. Os cortes foram lavados em água corrente por dez minutos, contracolorados com Hematoxilina de Harris (HE), lavados em água corrente e desidratados em etanol. A montagem das lâminas também foi realizada com resina Permount®.

As reações obtidas durante a imuno-histoquímica tiveram controles positivo G (+) tumor de mama canino (controle da amostra) e cólon de camundongo (para o controle do anticorpo) e negativo G(-) para confirmar a reação das mesmas. Para o controle negativo a incubação foi realizada em PBS com eliminação do anticorpo primário.

Após a imuno-histoquímica observou-se as lâminas com auxílio do microscópio óptico Axioscópico Zeiss® e os resultados foram analisados em um microcomputador com programa de mensuração específico KS-400 Zeiss® num aumento de 40x (50 µm). Para a realização da mensuração, durante o protocolo final da imuno-histoquímica, não foi utilizado nenhum tipo de contra-coloração (hematoxilina), evidenciando assim somente os tecidos com marcação positiva para receptores de IDO. O método de mensuração detecta as marcações positivas em marrom dando a área/Frame por µm² e a área marcada em porcentagem (%). Em seguida procedeu-se a análise e discussão dos resultados.

2. WESTERN BLOT

Para confirmar se a marcação da imuno-histoquímica foi específica para a IDO, utilizamos a técnica de Western Blot, que é um método utilizado para detectar uma dada proteína em uma amostra, usando anticorpo específico para aquela proteína. Esta técnica também fornece o peso molecular destas proteínas, que são corridas em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e transferido para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF (SANCHES, 2008). Para a realização do mesmo, as proteínas foram extraídas e quantificadas a partir das partes de tecidos do rim cefálico, baço, fígado e do tampão leucocitário, que foram previamente pesados e colocados em eppendorfs de 1,5ml contendo 400 µl de 2X Sample Buffer 400 µl de 1X Working Solution e 40 µl de cocktail de inibidor de protease (P2714 Sigma-Aldrich). Em seguida esses tecidos foram processados utilizando um sonicador (QSonica, Q125) a 4°C. Após este procedimento, as amostras de tecido foram centrifugadas por 15 minutos, a 4°C e 1300 rpm; o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e armazenado em gelo.

A quantificação das proteínas foi estimada utilizando o reagente BioRad Protein Assay pelo método de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules CA, USA), sendo que 10 µl das amostras foram diluídos em 90 µl de solução de 1X Working Solution, sendo que 10 µl desta solução foram adicionados a 990 µl do reagente de Bradford, diluído em água destilada (1:5). A curva padrão foi feita com soro albumina bovina adicionada ao reagente de Bradford em diferentes concentrações. As amostras foram incubadas por 5 minutos e quantificadas em um Biofotômetro (BioPhothometer Plus, Eppendorf, Germany). Foram calculadas as concentrações das proteínas totais de cada amostra.

Após a preparação do gel inferior (Resolving Gel) e do gel superior (Stacking gel), as amostras adquiridas após a extração e quantificação, foram diluídas em Sample Buffer (Azul de bromofenol, glicerol, Tris-HCL, β Mercaptoetanol, SDS e DTT) e submetidas à desnaturação proteica. As amostras diluídas foram colocadas em eppendorfs de 0,2ml no banho seco durante 10 minutos à 95°C (Termociclador Mastercycler próS Eppendorf Germany). Em seguida, foi adicionado 15µL da amostra em cada poço, sendo que o primeiro poço foi preenchido com 10µL com o marcador molecular (Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Standards #1610324, Bio-Rad), e as amostras foram corridas em uma cuba de eletroforese (Bio-Rad), começando com 45V, no gel superior e posteriormente a 110V no gel inferior. Este procedimento levou cerca de duas horas e meia. Após o término da corrida foram preparadas três cubas: A primeira contendo metanol, na qual a membrana de PVDF (Immun-Blot PVDF Membrane #162-0177 Bio-Rad) ficou mergulhada por 5 minutos, para estabilizá-la; a segunda cuba com água destilada e a terceira cuba com tampão de transferência (buffer solução de uso), sendo que nesta mergulhou-se a membrana e os papéis de filtro.

A transferência ocorreu com 120 mA por 120 minutos. Após a transferência da membrana, foi realizado o bloqueio das reações inespecíficas com leite em pó a 5% (Skin Milk, Difco BD), por duas horas, em seguida a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos cada com TTBS 1X, e incubada com os anticorpos primários: Anti-IDO policlonal (NB 100-2459 Novus biologicals) e o EB09548 policlonal anti-Indol (Everest Biotech) overnight na concentração 1:200. Foi utilizada uma membrana para cada anticorpo. No dia seguinte, após as lavagens com TTBS 1X, a membrana foi incubada com anticorpo secundário 1:2000 (Bovine anti goat IgG HRP, Santa Cruz), por duas horas em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi preparada para a revelação quimioluminescente ECL (ECL Plus Western Blotting Analysis System-RPN 2132, Amersham, GE Healthcare). O gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue à 0,25% (Bio-Rad), e descorado com solução de Destrain Solution (metanol e ácido acético) até as bandas aparecerem. A revelação foi realizada no aparelho ImageQuant 350 (GE Healthcare).

3. Resultados

4.1. RESULTADOS DO WESTERN BLOT

Após a realização da imunohistoquímica, foi necessário realizar um teste de Western afim de averiguar se as marcações positivas eram específicas para IDO, já que o anticorpo é policlonal e não são específicos para IDO em truta.

Para ter um o controle endógeno da reação (Fig. 1.A, C1, C3 e B, C1 e C2) utilizou-se tumor de mama de cadela cedido pelo Doutorando Rafael Magdanelo Leandro, o qual marca positivamente para IDO com este mesmo anticorpo. (CEUA FMVZ-USP) número 2530/2012. As bandas que detectaram presença da enzima IDO nas amostras: C1, C2, C3 (controle endógeno tumor de mama em cadelas) (Fig. 1 A e B), marcaram o peso molecular descrito nas especificações da bula do anticorpo em 45,3 kDa.

Foi realizado o controle endógeno com a β -actina, porém seu resultado não foi satisfatório devido ao peso da β -actina ser aproximado ao do anticorpo, encobrindo assim os resultados. Para sanar este problema utilizamos o controle endógeno C1 e C3. Podemos observar visíveis marcações de IDO no R4 (rim cefálico), B (baço), S2 (sangue) (Fig.1 A).

Nas amostras S1 (sangue), R1, R2, R3 (rim cefálico) a expressão da enzima IDO obteve marcação bem próxima ao peso molecular dos controles endógenos (C1, C2) que pesam aproximadamente 45,3 kDa, exceto pela segunda banda que ficou com aproximadamente 25kDa. Houve a degradação das Amostras: F (fígado), e B (baço). Ao realizar o Western Blot com o fígado, não foi possível identificar nenhuma reação positiva, e o baço apresentou uma fraca reação. A mesma banda foi revelada de duas formas para melhor visualização das bandas (Fig. 1 B).

Fig. 1. Detecção da enzima IDO pela técnica de western blot utilizando o anticorpo NB100-2459 (Novus Biologicals). Gel de poliacrilamida 13% (SDS-PAGE). Em A. C1 e C3, (controle endógeno da reação tumor de mama em cadelas, peso molecular com aproximadamente 45,3Kda e banda dupla). Em R4 (rim cefálico), B (baço), S2 (sangue) com visível marcação da IDO. β -actina como controle endógeno da marcação. B representando dois tipos de revelação da mesma membrana, uma escura e outra clara, para melhor visualização das bandas C1, C2, (controle endógeno da reação tumor de mama em cadelas, peso molecular com aproximadamente 45,3Kda e banda dupla), S1 (sangue) com visível marcação e bandas duplas, R1, R2, (rim cefálico) com discreta marcação da expressão da enzima IDO, e R3 com uma marcação satisfatória. Degradação das Amostras: F (fígado), e B (baço). Revelação com ECL plus (Amershan).

4.2 RESULTADO DA MENSURAÇÃO DA EXPRESSÃO DA INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE

Ao avaliar as características de marcação positiva para receptores de IDO no baço, fígado e rim cefálico pela metodologia da mensuração (Fig.2), observou-se valores médios de 17,31% ($17,31 \pm 6,04$) de área marcada no baço, 5,31% ($5,31 \pm 2,79$) para o fígado e a mensuração do rim cefálico demonstrou marcações positivas para receptores de IDO com valores médios de 11,68% ($11,68 \pm 6,45$) de área marcada, todos os tecidos estão compreendidos numa área/frame de $149774,61 \mu\text{m}^2$ (Fig.3).

Fig. 2. Marcação positiva para a IDO em baço (A), fígado (B) e rim cefálico (C) de trutas arco-íris, utilizando somente o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, para a mensuração (concentração 1:100).

Fig.3. Mensuração das marcações positivas (área/Frame por μm^2) e a área com os tecidos marcados em porcentagem (%).

4.3. RESULTADO DA EXPRESSÃO DA IDO NO BAÇO, FÍGADO, RIM CEFÁLICO E IMPRINT

Os resultados da imuno-histoquímica, utilizando o Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) (concentração 1:100), demonstraram que houve marcação citoplasmática positiva para os receptores de IDO no baço de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sendo possível observar a marcação positiva em algumas células imaturas e linfócitos em vários estágios de maturação. Foi possível visualizar eritrócitos e trombócitos dispersos, porém estas células não foram marcadas positivamente, (Fig. 4A),

No fígado de trutas arco-íris demonstrou que a marcação ocorreu apenas em algumas células sanguíneas presentes dentro de alguns vasos sanguíneos, dentre as células marcadas podemos visualizar linfócitos e células polimorfonucleares (Fig. 4B)

No rim cefálico identificamos marcações positivas para os receptores de IDO, no tecido linfóide, leucócitos dispersos no tecido hematopoiético e dentro dos vasos sanguíneos em diversos estágios de maturação, marcação positiva de células do tecido interrenal e células cromafins, marcação de linfócitos dentro de um vaso sanguíneo (v) e a não marcação das células vermelhas, Observamos a presença de melano-macrofagos, porém não podemos visualizar se estas células foram marcadas positivamente devido a sua coloração escura (Fig. 4C).

A imuno-histoquímica do Imprint do rim cefálico, demonstrou marcação positiva de alguns leucócitos como os monócitos e linfócitos, e células indiferenciadas (Fig. 4).

Fig. 4. Expressão da IDO em tecidos hematopoiéticos de trutas arco-íris pela técnica de imuno-histoquímica (Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biological). Concentração 1:100. No baço (A) círculo vermelho indicando marcação negativa de um eritrócito, cabeça da seta vermelha indica um trombócito não marcado pela IDO, As setas indicam a marcação de leucócitos de vários tamanhos e em diferentes estágios de maturação. (B) No fígado das trutas arco-íris pode-se visualizar o círculo indicando eritrócitos dentro do vaso sanguíneo (v) não marcados pela IDO; seta preta indicando a marcação de células polimorfonucleares; seta vermelha indicando a marcação de linfócitos de vários tamanhos. Em (C) rim cranial observa-se forte marcação de células do tecido interrenal indicada pela seta branca, ponta da seta mostrando uma possível célula cromafim, setas vermelhas indicando linfócitos dentro do vaso sanguíneo (v), M indicando um melano-macrófago e o círculo vermelho indicando um eritrócito não marcado. (D), expressão da IDO no imprint do rim cranial de trutas arco-íris, seta vermelha (A) marcação positiva de um monócito. Cabeça da seta vermelha, setas vermelhas indicam a marcação de linfócitos de vários tamanhos e diferentes estágios de maturação, e cabeça da seta preta indica uma célula indiferenciada. Contra- coloração: Hematoxilina de Harris (A,B,C), Giemsa (D)

4.4.. RESULTADOS DA EXPRESSÃO DA IDO EM CÉLULAS SANGUÍNEAS

Pela imuno-histoquímica, foi possível verificar a expressão de IDO em extensões sanguíneas de trutas arco-íris (*oncorhynchus mykiss*), onde algumas células que compreendem o sistema imunológico como os

linfócitos, monócitos e neutrófilos demonstraram afinidade com o anticorpo Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) concentração 1:100 (Fig. 5).

A contagem diferencial de leucócitos nas extensões sanguíneas ($\times 5000$) num aumento de $100\times$ ($20\text{ }\mu\text{m}^2$) demonstrou que em um total de 50,000 células, 6021 eram linfócitos e 378 eram monócitos detectados pela expressão da IDO. Estas células apresentaram-se com valores médios de $111,24\pm 46,50$ células positivas num total de $4712,72\pm 881,17$ para células negativas, as quais corresponderam aos eritrócitos e trombócitos. Pela avaliação das diferenças dos valores de células positivas dos diferentes grupos com o teste do Qui-quadrado (9 graus de liberdade e nível de significância de 5%) encontramos valor de 21,982 para Qui-quadrado e dependência entre a população de linfócito e monócito ($p<0,01$). Na avaliação das células positivas dos grupos pelo teste t-student, foram encontrados valores médios de $602,1\pm 202,2$ para os linfócitos positivos ($p<0,01$) e $37,8\pm 20,1$ monócitos positivos ($p=0,25$) detectados pela imuno-histoquímica.

As células polimorfonucleares (neutrófilos), obtiveram valores muito próximos a zero e não foi considerado pelos testes de Qui-quadrado e t-student, sendo possível calcular somente a sua média e desvio padrão, que foi $1,38\pm 1,78$

Fig. 5. Marcação positiva para os receptores de IDO, utilizando o anticorpo Anti-IDO policlonal NB100 2459 Novus biologicals, (concentração 1:100). Em (A) Setas vermelhas indicam a marcação de linfócitos, a seta preta indica uma célula indiferenciada marcada positivamente pela IDO, a cabeça da seta preta mostra um monócito, (B) mostra um monócito (cabeça da seta preta) e variados linfócitos (setas vermelhas, Em C podemos visualizar um monócito cabeça da seta preta e vários linfócitos indicados pelas setas vermelhas, em (D) pode-se visualizar a marcação de um neutrófilo (círculo vermelho) observa-se também a grande quantidade grânulos citoplasmáticos e núcleo segmentado, as setas vermelhas representam a a marcação positiva da IDO no citoplasma dos linfócitos. Contra-coloração: Giemsa

5. DISCUSSÃO

No presente estudo conseguimos evidenciar a expressão de Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO1) em algumas células sanguíneas como linfócitos, monócitos e neutrófilos (Fig. 5), bem como a marcação em alguns tecidos hematopoiéticos como o baço, fígado e o rim (Fig. 4), pela imuno-histoquímica e western Blot (WB), este último auxiliando na determinação do anticorpo de escolha para a realização deste trabalho científico (Fig. 1).

O fato dos resultados obtidos com o anticorpo IDO1 (Anti-IDO policlonal, (NB100 2459 Novus biologicals) terem sido positivos, pode estar relacionado com o fato da IDO (também referida como IDO1) e a IDO-paróloga (IDO2) catalisarem o mesmo passo da taxa limitante do catabolismo do triptofano (Trp) ao longo da via das quinureninas (PALLOTTA et al., 2011).

As bandas que detectam presença da enzima IDO nas amostras: C1, C2, (controle endógeno tumor de mama em cadelas), marcaram próximos ao peso molecular descrito nas especificações do anticorpo em 45,3 kDa, e as amostras A10 (sangue), A7 (rim cefálico) também marcaram muito próximas de 45,3 kDa (Fig. 1A), corroborando em parte com a hipótese de Thomas et al., (1999), que afirma que a IDO é uma oxigenase monomérica com peso molecular que varia entre 40 a 43 kDa. Ao analisarmos os resultados do teste de Western Blot, com o anticorpo de escolha nas amostras de células sanguíneas e rim cefálico as bandas duplas não permaneceram paralelas umas as outras como ocorre nas amostras controles, pois a segunda banda se separou mais, deixando-as distantes, as bandas duplas que apareceram tanto nos controles quanto nas amostras, marcaram o peso molecular descrito nas especificações da bula do anticorpo em 45,3 kDa, porém a própria especificação mostra que o cálculo do peso molecular está de acordo com NP_002155.1, e que ambas as bandas detectadas foram bloqueadas por incubação com sucesso com o peptídeo imunizante (e os resultados do BLAST com a sequência de peptídeo imunizante não identificou qualquer outra proteína para explicar as bandas adicionais). Este fato pode estar relacionado com o anticorpo ser policlonal e apresentar maior reatividade ou reação cruzada com outras espécies, como a truta arco-íris que, está bem distante das espécies reativas para o anticorpo. A banda dupla também foi obtida no experimento de Yuasa et al., (2007), onde a estrutura dos genes da IDO1 e da IDO2 são bem conservados e em mamíferos e são apresentados em um arranjo paralelo no mesmo cromossomo.

A IDO2 (proto- IDO) existe não somente em mamíferos, mas também em vertebrados inferiores, mas nenhum gene correspondente a IDO1 mamífera foi encontrada nos genomas da galinha ou do zebra-fish, o que não ocorreu em nosso experimento, no qual observamos a expressão da IDO1 em células sanguíneas e rim cranial de trutas arco-íris. Em humanos a expressão da IDO2 não é tão onipresente como a da IDO1, no entanto a

IDO2-mRNA pode ainda ser detectada no fígado, intestino, baço, placenta, timo, pulmão, cérebro, rim e cólon. A IDO1 e a IDO2 de mamíferos (rato) e IDO2 de sapos e peixes também foram expressas em células mamíferas intactas. Em outro experimento Yuasa et al., (2011) sugere também que a IDO de mamífero é derivada de uma proto-IDO, e que o surgimento ocorreu antes da divergência dos marsupiais e dos mamíferos placentários. O gene que provavelmente originou a IDO pode ser encontrado em bactérias e em fungos, onde foram descobertos três tipos de IDO (YUASA; BALL, 2012), sendo que sua função está relacionada à obtenção de NAD⁺ (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) via quinurenina e exerce mesma função da TDO (triptofano 2,3-dioxigenase) em mamíferos, este fato pode sugerir que a IDO1 em trutas arco-íris é expressa em células e órgão ligados a regulação da imunidade assim como o dos vertebrados superiores.

Em 2007 foram descobertos parálogos da IDO, a IDO2, e a IDO específica de mamíferos atualmente chamadas de IDO1. A IDO2 foi relatada tanto em mamíferos quanto em vertebrados mais basais (YUASA e BALL, 2012). Em diversos outros grupos de vertebrados mais basais encontrou-se moléculas muito próximas em formato e função às IDOs dos mamíferos, sendo estas as consideradas proto-IDOs. A proto-IDO foi relatada em algumas espécies de peixes e aves. Desde as camadas mais basais da escala evolutiva, a sequência de aminoácidos da proto-IDO de vertebrados foi conservada sugerindo que ela poderia exercer uma função essencial até hoje nas espécies.

Segundo Yuasa et al., (2009) as proto-IDOs formaram um agrupamento (cluster) que são distintos do agrupamento (Cluster) de mamíferos. Os Genes de IDO e proto-IDO, estão presentes paralelamente nos cromossomos dos mamíferos incluindo o marsupial Opossum (gambá) enquanto que o gene proto-IDO foi somente observado no genoma do peixe e da galinha. As análises feitas pelo WB dos lisados celulares empregaram o anticorpo direcionado contra o marcador de N-terminal-Histidina de ambas as proteínas. Todas as enzimas foram expressas a níveis comparáveis exceto a IDO1 do gambá. A quantidade da expressão de IDO1 do gambá foi estimada em 12 a 20% da IDO1 do rato. Sendo que a atividade degradante de L- triptofano da IDO1 do gambá é muito forte. Levando a crer que pode ser levemente toxica para as células. A fraca expressão de IDO2 do peixe pode ser causada pela grande distância filogenética entre o peixe (fonte de enzima) e humano (célula hospedeira) (YUASA et al., 2009). Esta evidência sugere que a IDO1 e a IDO2 surgiram via da duplicação do gene que ocorreu em um ancestral mamífero depois da divergência da linhagem mamífera. Em contraste esta árvore filogenética e as árvores previamente reportadas sugerem que a duplicação do gene ocorreu antes da divergência dos vertebrados. Alguns projetos de sequência de genoma de mais de 10 espécies de peixes estão em andamento e a IDO1 do peixe pode ser encontrada entre nestes projetos (YUASA et al., 2009). A árvore filogenética da IDO apresenta: proteínas relacionadas a IDO em moluscos, a IDO1 sendo encontrada em monotremados, marsupiais e mamíferos superiores (camundongos e humanos) e a IDO2 (proto-IDO), em anfíbios, peixes, aves, monotremados, marsupiais e mamíferos superiores. Todas as enzimas obtiveram uma expressão parecida exceto a IDO1 do marsupial e IDO2 do peixe, no qual a expressão foi menor. (YUASA et al., 2012). A dificuldade para detectar a expressão da IDO em trutas pode estar relacionada com a baixa expressão da IDO devida a maior distância filogenética em relação aos vertebrados superiores.

A fraca marcação do baço e do fígado podem estar relacionada a este fato, e a não marcação da banda de IDO do fígado pode ser explicada pelos achados de Yuasa et al., (2011), que sugeriu que a IDO1 não é expressada no fígado, mas foi possível amplificar o cDNAs da IDO1 de amostras de fígado, contudo o resultado da quantidade da amostra do PCR da IDO1 foi muito menor do que da IDO2 sugerindo que as amostras

amplificadas podem derivar dos leucócitos residuais das amostras do fígado. No fígado a marcação da expressão da IDO ficou limitada a algumas células dentro de pequenos vasos sanguíneos (Fig. 4B), sendo que este fato pode estar ligado a não marcação da IDO1 pelo teste de western blot contendo amostras do fígado, porém podemos visualizar a marcação de linfócitos dentro dos vasos sanguíneos pelo método da imuno-histoquímica, sugerindo que a marcação dos linfócitos na truta arco-íris possa estar correlacionada somente aos leucócitos e não com a estrutura hepática.

Por não possuírem medula óssea, os linfócitos dos peixes migram para o baço. E os achados encontrados no tecido esplênico pela técnica da imuno-histoquímica, demonstra que as marcações das expressões da IDO são aleatórias, porém algumas células imaturas, dentre elas os leucócitos marcados estavam dentro de pequenos vasos sanguíneos ou disperso no tecido esplênico, por ser um órgão linfóide e possuir em sua estrutura tanto os linfócitos T quanto B, sugere-se que a marcação só ocorra nos leucócitos e que a estrutura esplênica não é marcada pela IDO como podemos visualizar neste experimento, onde as áreas de cordões esplênicos não estão marcados positivamente (Fig. 4A). Este achado corrobora com a afirmação de que as células IDO-positivas estão amplamente distribuídas primariamente e secundariamente em órgãos linfóides (MUNN et al., 1999). Foi relatado no experimento de Dai e Zhu (2010), que poucas células do baço de ratos controle expressavam a IDO, onde foi relatada a presença de aglomerados de pequenas células mononucleares dispersos na polpa vermelha do baço (Mellor et al., 2003; Dai e Zhu., 2010). Os resultados deste estudo mostraram que as células IDO-positivas foram marcadas principalmente em regiões espalhadas na polpa vermelha, em particular na zona marginal localizada entre a polpa branca e a polpa vermelha circundante, contendo macrófagos e células reticulares (com funções de apresentação de antígeno), estas características puderam ser observadas também neste presente experimento.

No rim cefálico foi possível observar uma expressão positiva da IDO nas células presentes dentro dos vasos sanguíneos, sendo que este parâmetro também pôde ser observado no estudo realizado com camundongos machos e fêmeas onde foi identificada a expressão da IDO em camadas da musculatura lisa de pequenos vasos sanguíneos localizados nos rins, ao passo que em células endoteliais vasculares não foi encontrada marcação específica (DAI e ZHU, 2010). Houve marcação positiva para a IDO no tecido hematopoiético, pois o rim cefálico é considerado um órgão primário diferenciador de células (ZAPATA, 1981), além de ser o principal tecido hematopoiético, possui função endócrina e imunológica, atuando na produção de anticorpos e catecolaminas (WEYTS et al., 1999), este fato pode explicar os achados encontrados como a marcação positiva da IDO em glândulas interrenais e células cromafins (Fig. 4C). Nos teleósteos as células cromafins formam pequenas ilhas nas paredes das veias e, em algumas espécies, encontram-se dispersas nos rins cefálicos. Estas células desempenham funções equivalentes às das medulas adrenais em mamíferos. A biossíntese das catecolaminas ocorre através das células cromafins dos teleósteos e a inativação dessas moléculas ocorre pela via hepática e pelos rins antes de serem excretadas pela urina. (SENS, 2009). Rocha et al., (2001) observou que a glândula interrenal e as células cromafim estão interligadas e distribuídas no rim cefálico, o que pode ser observado neste estudo. Geralmente, a glândula interrenal consiste de grupos, cordões ou faixas de células, enquanto as células cromafins formam pequenos grupos, ambos inseridos muito próximos aos vasos sanguíneos o que pode ser observado neste estudo. A excreção de corticosteróides, (cortisol) nas células interrenais e catecolaminas nas células cromafins, assim como a adrenalina e a noradrenalina, são consideradas as respostas primárias do estresse (TAVARES-DIAS, 2001). Estudos realizados por Farias, et al., (1989), demonstraram que a

morfologia do tecido interrenal e das células cromafins era frequentemente variável, mesmo quando se examinavam espécies de peixes filogeneticamente próximas.

O fato das células interrenais e cromafins terem marcado positivamente (Fig. 4C), pode estar relacionado a ação anti-inflamatória comprovada da IDO, sendo que um estudo realizado com pacientes com doenças inflamatórias demonstrou que o T helper 1 (Th-1), IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF- α) são fortes indutores da expressão de IDO (WOLF; WOLF; RUMPOLD, 2004) e que a expressão e suas atividades influenciam os mecanismos da ativação imune (HAINZ; OBEXER; WINKLER, 2005). Ao realizar os imprints com o rim cefálico observamos a marcação de monócitos e de muitos linfócitos que se encontravam em diversos tamanhos (Fig. 4D) este fato pode estar relacionado com os achados de Kfoury et al., 1999 que identificou duas populações de linfócitos morfológicamente distintas em trutas arco-íris, as quais diferem-se em seus tamanhos e presença de grânulos. A marcação positiva da IDO em órgãos hematopoiéticos de trutas arco-íris pode ser um indicativo de que a atividade da IDO presente em células da linhagem dos monócitos e macrófagos possa estar relacionada aos mecanismos de defesa, e deste modo ajudar a acabar com infecções. A IDO atua com mecanismos parecidos, pois recentes estudos têm dirigido os efeitos imunomodulatórios da IDO em muitos aspectos, incluindo alergia, imunologia de tumores, autoimunidade e infecção por HIV em humanos (FUCHS; FORSMAN; HAGBERG, 1990; MELLOR et al., 2003; VON BUBNOFF; KOCH; BIEBER, 2003; MURRAY, 2003; MULLER et al., 2005). No contexto geral, a IDO pode contribuir para limitar os mecanismos imunes efetores e prevenir a atividade imune exagerada ou gerar uma imunossupressão. Desta forma a atividade da IDO é considerada como tendo um potencial ambivalente podendo atuar em benefício ou detrimento do hospedeiro. A atividade imunológica da IDO pode ser vista como um mecanismo de feedback que contra regula a ativação imune (MUNN, 2006). Podemos supor que estes mecanismos possam existir em vertebrados inferiores como, por exemplo, nas trutas arco-íris, dado aos achados obtidos neste trabalho.

Nas extensões sanguíneas, observou-se marcação seletiva de alguns leucócitos, dentre eles monócitos e linfócitos (Fig. 5). Segundo Tavares Dias; Moraes (2004), os monócitos geralmente são caracterizados morfológicamente como células grandes e arredondadas, com núcleo em formato de “grão de feijão”, citoplasma basofílico e vacuolizado, podemos observar tais características nos monócitos marcados pela IDO. A marcação positiva de monócitos nos leva a supor que as células que expressam a IDO possam estar em um estágio de maturação celular específico, ou que somente algumas células possuam receptores para IDO. Acreditamos que esta assertiva é verdadeira pelo fato de que em mamíferos nem todos os tipos de leucócitos expressam o mesmo nível de IDO (WANG et al., 2013). Alguns monócitos são estimulados pelo fator- estimulador- de macrófagos (MCSF) tornando-se macrófagos que suprimem a proliferação de células T *in vitro* (MUNN *et al.* 1999), este fato pode estar associado a um estágio específico de maturação. As células marcadas positivamente para a IDO fazem parte do sistema imunológico dos teleostes. Munn et al., (1999) observou em seu estudo que os monócitos diferenciados sob a influencia do fator estimulante da colônia de macrófagos adquiriram a habilidade de suprimir a proliferação de células T *in vitro* via rápida e seletiva degradação do triptofano pela IDO. Nos salmonídeos a grande quantidade de melano-macrófagos no rim cefálico é comum (PRESS et al, 1994), e são consideradas uma das células mais evidenciadas, que podem ser encontradas livres ou agrupadas no tecido (COSTA, 2007), porém não foi possível evidenciar se os macrófagos também foram marcados pela IDO devido a sua coloração mascarar a reação do DAB na imuno-histoquímica.

Os dados estatísticos demonstraram que de um total de células marcadas positivamente para a IDO a

maioria era de linfócitos onde seus valores médios foram de $602,1 \pm 202,2$ ($p < 0,01$), ressaltando a hipótese de que a porcentagem de linfócitos circulantes em trutas-arco íris é grande. (HOUSTON et al., 1996). Outra evidência que comprova a marcação de linfócitos são suas características morfológicas onde as células apresentam-se predominantemente arredondadas de tamanhos variados, com projeções citoplasmáticas, sem granulações visíveis, núcleo com cromatina densa ocupando quase todo o citoplasma (KFOURY et al., 1999; TAVARES DIAS; MORAES, 2004), sendo que foi possível observar estas características neste experimento.

Ao analisar as imagens ao microscópio de luz, pudemos observar a marcação positiva de alguns neutrófilos que nos teleósteos são caracterizados pelo formato arredondado, núcleo geralmente na forma de bastonete raramente apresentam-se na forma segmentada, com cromatina nuclear pouco compactada e sem nucléolo visível. Seu citoplasma é repleto de granulações acidofílicas. (TAVARES DIAS; MORAES, 2004). Os neutrófilos possuem grande quantidade de peroxidase, uma enzima lisossômica presente em células fagocíticas, que promove a oxidação de certos compostos pelo peróxido de hidrogênio no processo de fagocitose, podendo aderir às células endoteliais e migrar para o foco inflamatório, atraídos por quimiotaxia (IWAMA e NAKANISHI, 1996). A sua marcação positiva pode ser devida à reatividade cruzada entre a peroxidase endógena dos neutrófilos e o DAB, podendo desta forma considerar estas células como falso positivas (LI et al., 1987). Este fato corrobora com o fato de que os neutrófilos possuem peroxidase em seus grânulos citoplasmáticos. Quando realizada a imuno-histoquímica, é feito um primeiro bloqueio com peróxido (peróxido de hidrogênio e metanol), esta faz com que consequentemente ocorra a inibição da peroxidase endógena, fazendo com que o DAB se ligue à biotina, marcando os grânulos de neutrófilos, promovendo um resultado falso positivo da célula, no entanto não podemos afirmar se estas células são falso positivas, ou se a marcação da IDO é verdadeira nesta célula. Pois Wang et al. (2013), realizaram um estudo com macaco rhesus (*Macaca mulatta*) e observaram que nem todos os tipos de leucócitos expressam o mesmo nível de IDO, sendo que os mais elevados níveis da enzima foram encontrados em células do tipo CD14+, CD16+, CD56+ e em células dendríticas (DCs), tendo destaque a célula CD14+ e os granulócitos que demonstraram uma maior porcentagem dessa expressão. Este fato talvez possa justificar a marcação positiva da IDO em alguns neutrófilos, bem como em outras células como os linfócitos ou monócitos, e células imaturas.

Diante dos resultados obtidos até o presente momento podemos sugerir que algumas proteínas se mantiveram conservadas durante a evolução e possam estar relacionadas aos mecanismos reguladores da resposta imunológica nesta espécie, assim como nos mamíferos. A hipótese deste trabalho poderá contribuir para experimentos posteriores no intuito de trazer mais informações relevantes do ponto de vista filogenético.

6. CONCLUSÃO

Baseado nas observações durante a elaboração deste experimento sugere-se que houve marcação positiva da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO1), nos órgãos hematopoiéticos (rim cefálico, baço, fígado), leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos) e glândula interrenal de trutas arco-íris.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKSDALE, A. R.; BERNARD, A. C.; MALEY, M. E.; GELLIN, G. L.; KEARNEY, P. A.; BOULANGER, B. R.; TSUEI, B. J.; OCHOA, J. B. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. **Surgery**, v. 135, n. 5, p. 527-535, 2004.

COSTA, G. M. **Estudo histomorfológico e análise dos perfis celulares do ri rim cefálico, fígado, baço e timo do *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887, Teleósteo, characidae), pacu.** . Dissertação de mestrado (mestrado em ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 134, 2007.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. W.; TIDWELL, H. J. Anaesthetics in aquaculture. **SRAC publication, southern regional aquaculture center**, USA, n. 3900, 2004.

DAI, X.; ZHU, B. T. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Tissue Distribution and Cellular Localization in Mice: Implications for Its Biological Functions. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. V.58(1), 2010.

DELLA CHIESA, M.; CARLOMAGNO, S.; FRUMENTO, G.; BALSAMO, M.; CANTONI, C.; CONTE, R. The tryptophan catabolite Lkynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. **Blood**, v.108, n.13, p. 4118-4125, 2006.

FARIAS, E. C.; ALEXANDRINO, A. C.; PINHEIRO, E. F. G.; BORELLA, M. I. Histologia do tecido interrenal e das células cromafins de curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, Pisces Cypriniformes Durante o Ciclo Reprodutivo. Ver, Fac. MED. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, v. 26 n. 1, p. 7-13, 1989.

FLETCHER, T. C. Non-antibody molecules and the defense mechanisms of fish. In: Pickering, A.D. (Ed.). **Stress and Fish**. New York: Academic Press, p.171-183, 1981.

FORERO, A. R. Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae), en Cundinamarca, Colombia. **Revista de Biología tropical**, v. 43, n. 1-3, p. 283-288, 1995.

FUCHS, D.; FORSMAN, A.; HAGBERG, L. Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. **Journal of Interferon & Research**, v.10, p. 599, 1990.

GALL, G. A. E.; CRANDELL, P. A. The rainbow trout. **Aquaculture**, v. 100, p.1-10, 1992.

GARCIA-LEME, J. Hormones and inflammation. Boca Raton: **CRC Press**, p. 238, 1989.

HACKING, M. A.; BUDD, J.; HODSON, K. The ultrastructure of the liver of rainbow trout: normal structure and modifications after chronic administration of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 477-491, 1977.

HAJNZ, U.; OBEXER, P.; WINKLER, C. Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood**, v. 105, p. 4127, 2005.

HORTON, J.; LACKIE, A. **Immunology**. 2 ed. St. Louis: Mosby, p. 15.1-15.16, 1989.

HOUSTON, A. H.; N. DOBRIC e KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. **Fish Physiology. Biochemistry**. 15 (4): 339-347. 1996.

IWAMA, K.; NAKANISHI, T. The fish immune system: organism, pathogen and environment. **Academic Press**, v. 15, 1997.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish Immune System. **Fish Physiology**, v.15, 1996.

KFOURY JR, J. R.; KURODA, A.; NAKAYASU, C.; FUKUDA, H.; OKAMOTO, N. Analysis of rainbow trout peripheral blood leucocytes separated by flow cytometry cell sorting. **Fish Pathology**, 34(1).1-6, 1999.

KFOURY JR, J. R.; NAKAYASU, C, J. C.R.; OKAMOTO, N. Characterization of a monoclonal antibody specific to rainbow trout thrombocytes. *Journal of Experimental Zoology*, v. 284, p. 309-3016, 1999.

LI, C. Y.; ZIESMER, S. C.; LAZCANO-VILLAREAL, O. Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method. **Journal of histochemistry & cytochemistry**. 35(12):1457-60, 1987.

LIANG, J.; SUN, L.; WANG, Q.; HOU, Y. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. **International Immunopharmacology**, n.6, p. 830– 838, 2006.

LOVY, J. A. N.; SAVIDANT, G. P.; SPEARE, D. J.; WRIGHT, G. M. Langerin/CD207 positive dendritic-like cells in the haemopoietic tissues of salmonids. **Fish and shellfish immunology**, v. 27, n. 2, p. 365-368, 2009.

MATUSHIMA, E. R. **Cinética da reação inflamatória induzida pela carragenina na bexiga natatória de Oreochromis niloticus (Tilápia do Nilo)**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo (Dissertação de Mestrado), 53pp, 1988.

MELLOR, A.L., MUNN, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 762– 769, 2004.

MELLOR, A. L.; BABAN, B.; CHANDLER, P.; MARSHALL, B.; JHAVER, K.;HANSEN, A.; KONI, P. A.; IWASHIMA, M.; MUNN, D. H. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 1652- 1655, 2003.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal antifetal immune responses. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 5-13, 2001.

MESEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; GARCIA-AYALA, A. Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost seabream (*Sparus aurata* L): an ultrastructural and cytochemical study. **Anatomical Record**, n. 241 p. 303-309, 1995.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance, v. 117, n. 5, p. 1147-1154, 2007.

MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. **Current Opinion Immunology**, v.18, p. 220, 2006.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; HOU, D.; BABAN, B.; LEE, J. R.; ANTONIA, S. J.; MESSINA, J. L.; CHANDLER, P.; KONI, P. A.; MELLOR, A. L. Expression of IDO by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 280–290, 2004.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; LEE, J. R. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, v. 297, p. 1867-1870, 2002.

MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, I. B.; PASHINE, A.; MELLOR, A. L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 9, p. 1363– 1372, 1999.

MUNN D. H., ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S. J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A. L. Prevention of allogenic fetal rejection by tryptophan catabolism, **Science**, v. 281, n. 5380, p.1191-1193, 1998.

MURRAY, M. F. Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis. **Lancet Infectious Disease**, v. 3, p. 644, 2003.

PALLOTTA, M. T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; VACCA, C.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; SERVILLO, G.; BRUNACCI, C.; CALVITTI, M.; BICCIATO, S.; MAZZA, E. M. C.; BOON, L.; GRASSI, F.; FIORETTI, M. C.; FALLARINO, F.; PUCCETTI, P.; GROHMANN, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells, *Nature Immunology*, p. 35, 2011.

PALLOTTA, M. T.; BOON, L. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 9, p. 870-878, 2011.

PRESS, C. M. L.; DANNEVIG, B. H.; LANDSVERK, T. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells the spleen and head kidney of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Biology*, v. 4, p. 79-93, 1994.

ROCHA, R. M.; SANTOS, L. H. S.; VICENTINI, C. A.; CRUZ, C. Structural and Ultrastructural Characteristics of Interrenal Gland and Chromaffin Cell of Matrinxã, *Brycon cephalus* Gunther (teleostei-characidae). **Anatomy Histology Embryology**, v.30, p. 351-355, 2001.

ROCHA, E.; MONTEIRO, R. A. F.; PEREIRA, C. The liver of the trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. *Journal of Anatomy*, v. 185, p. 241-249, 1994.

SANCHES, D. S. **Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo “GAP”, as conexinas em tecidos ósseo normal e neoplásico de cães**, 2007, p. 73. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.73, 2008.

SECOMBES, C. J. The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. London: Academic Press, p. 63-105, 1996.

SECOMBES, C. J.; FLECHER, T.C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. **Annu. Rev. Fish Dis.**, v.2, p.53-71, 1992.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; LIM, C. Immunity and disease resistance in fish. In: LIM, C., WEBSTER, C. D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Food Products Press, p.149-162, 2001.

SENS, D. R **Efeitos do Triclorfom no Crescimento e Parâmetros Hematológicos de Tambaquis (*Colossoma macropomum*)**, 2009, p. 60, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Tocantins,

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

TAKIKAWA, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3 dioxygenaseinitiated L-tryptophan metabolism. **Biochemical Biophysical Research Community**, v. 338, n. 1, p. 12-19, 2005.

TAKIKAWA, O.; YOSHIDA, R.; KIDO, R.; HAYAISHI, O. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of biological chemistry*, v. 261, n. 8, p. 3648-3653, 1986.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: **Vilimpress**, p.144, 2004.

TAVARES-DIAS, M MELO, J. F. B.; MORAES, G, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. Variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n. 4, p. 693-698, 2002.

TAVARES-DIAS,M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *B. Inst. Pesca*, v. 27 p. 43-48, 2001.

THOMAS, R. S.; STOCKER, R. Redox reactions related to indoleamine 2,3- dioxygenase and tryptophan metabolismo along the kynurenine pathway. *Redox Report*, v. 4, n. 5, p. 199-220, 1999.

WANG, N. L.; ZHANG, W. J.; DUAN, J. Z.; YANG, G. B. Indoleamine 2,3-dioxygenase is differentially expressed by different white blood cell populations of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**. doi: 10.1111/jmp.12054, 2013.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal Fisheries Research**, Board of Canada. V.22, n.5, 1970.

WEYTS, F. A. A.; COHEN, N.; FLINK, G.; VERBURG, B. M. L. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v.9,p.1-20, 1999.

WOLF, A. M.; WOLF, D.; RUMPOLD, H. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. **Clinical of Immunology**, v. 113, p. 47–55, 2004.

YUASA, H. J.; BALL, H. J. The evolution of three types of indoleamine 2,3-dioxygenases in fungi with distinct molecular and biochemical characteristics. **Gene**. 504, 64-74, 2012.

YUASA, H. J.; USHIGOE, A.; BALL, H. J. Molecular evolution of bacterial indoleamine 2,3-dioxygenase. **Gene**. 485, 22-31, 2011.

YUASA, H. J.; BALL, H. J.; HO, Y. F.; AUSTIN, C. J. D.; WHITTINGTON, K. B.; MAGHZAL, G. J.; JERMIIN, L. S.; HUNT, N. H. Characterization and evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases IDOs from monotremes and marsupials. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**.153, 137-144, 2009.

YUASA, H. J.; TABUCO, M.; TAKAHASHI, A.; HASEGAWA, T.; NOMA, H.; SUZUKI, T. Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases. **Journal Molecular Evolution**. 65, 705-714, 2007.

YUASA, H. J.; SUZUKI, Y. Do molluscs posses indoleamine 2,3-dioxygenase? v.140, n. 3, p. 445-54, 2005.

VON BUBNOFF, D.; KOCH, S.; BIEBER, T. New jobs for an old enzyme: the revival of IDO. **Trends of Immunology**, v. 24, p. 296, 2003.

ZAPATA, A. G. Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 5, n. 4, p. 685-690, 1981.

ZAPATA, A.G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. The fish immune system. London: **Academic Press**, p.1-62, 1996.