UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS-FZEA

GABRIEL SASSARÃO ALVES MOREIRA

Identificação e expressão gênica das enzimas arginase 1, arginase 2, e citocinas pró-inflamatórias em *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*, imunizados com *Ichthyophthirius multifiliis*

GABRIEL SASSARÃO ALVES MOREIRA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS-FZEA

Identificação e expressão gênica das enzimas arginase 1, arginase 2, e citocinas pró-inflamatórias em *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*, imunizados com *Ichthyophthirius multifiliis*

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências do programa de Zootecnia.

Área de Concentração:
Qualidade e Produtividade animal.

Orientador:
Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SM838i Sassarão Alves Moreira, Gabriel
 Identificação e expressão gênica das enzimas
 arginase 1, arginase 2, e citocinas pró-inflamatórias
 em *Pseudoplatystoma coruscans* ... / Gabriel
 Sassarão Alves Moreira ; orientador Antônio Augusto
 Mendes Maia . -- Pirassununga, 2017.
 127 f.

 Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
 Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
 de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. *Pseudoplatystoma* spp. 2. *Ichthyophthirius*
 multifiliis. 3. imunização. 4. expressão gênica. I.
 Augusto Mendes Maia , Antônio, orient. II. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Gabriel Sassarão Alves Moreira.

Título: Identificação e expressão gênica das enzimas arginase 1, arginase 2, e citocinas pró-inflamatórias em *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*, imunizados com *Ichthyophthirius multifiliis*.

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências do programa de Zootecnia.

Data: ____/____/____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese as pessoas mais importantes para mim, minha mãe Marisa de Fátima Sassarão Alves Moreira e meu pai Paulo Antônio Alves Moreira (*in memoriam*) por serem as pessoas responsáveis pela minha vida, pelo desenvolvimento do meu caráter e por ter me apoiado em todas as fases da minha vida.

Também dedico a minha à amada esposa Heloisa Lorenzo Gamba Alves Moreira, minha companheira desde meus 15 anos que sempre foi paciente e generosa em meus momentos de desânimo e falta de estímulo. Ao mesmo tempo, estendo esta dedicatória ao meu padrasto Arnold Jaap van Lonkhuijzen pelas suas sábias palavras de incentivo e ao meu irmão Samuel Sassarão Alves Moreira que é meu melhor amigo desde meu nascimento.

Esta dedicatória se estende também ao meu, professor e orientador Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia. A este devo a confiança em minha capacidade como pesquisador além da paciência e tranquilidade para me transmitir os ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia pela orientação, confiança, paciência e apoio ao longo de todos os anos desde o meu mestrado até meu doutorado.
- A técnica Dr. Marcia Monteiro da Silva pelas valiosas dicas e ajudas na parte de biologia molecular.
- Ao Dr. Mateus C. Maldonado por todas as discussões de assuntos científicos e ajuda nas técnicas de biologia molecular.
- Ao Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro por toda sua ajuda nas análises estatísticas.
- Ao Hugo Fernandes por toda sua ajuda na criação dos peixes, engorda dos alevinos, pelas longas noites de desespero com medo dos peixes morrerem e pelas longas noites de coleta.
- Aos meus colegas de pós-graduação no laboratório de Parasitologia da FZEA/USP, Zé (José Octavio), Kássia, Juliana, Tiago, Elayna, Julio, Josi e João (Curió) por compartilhamento dos conhecimentos, aprendizados e pelos bons momentos, e também as ICs, Tati, Carol, Juliana e Amanda.
- Aos companheiros de laboratório (LMMD), Juliano Sangalli, Rafael Sampaio, Dewison, Juliano Silveira, Tiago de Bem, Pedrinho, Laís, Maitê, Gabi, Vanessa e muitos outros, que sempre me apoiaram e serviram de inspiração para meu desenvolvimento acadêmico.
- Ao Dr. Alexandre Caetano pesquisador da EMBRAPA pela sua valiosa colaboração na identificação dos genes avaliados nesta tese.
- A fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) processo 2013/16738-9 pelo apoio financeiro da minha pesquisa no país e pelo fornecimento da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) processo 2015/01822-0 que me deu ensinamentos necessários para conclusão desta tese.
- Ao Dr. Dehai Xu, meu supervisor do BEPE realizado no laboratório Aquatic Animal Health Research, USDA, ARS situado em Auburn, AL, o qual me forneceu os conhecimentos necessários para realizar o cultivo do parasita *Ichthyophthirius multifiliis*.

Em especial:

- À minha Mãe meu padrasto Arnold e meu irmão Samuel por terem me incentivado em todos os momentos difíceis dessa caminhada do doutorado.

- À minha amada esposa Heloisa, que esteve ao meu lado em todos os momentos, bons e difíceis, ao longo do desenvolvimento desse trabalho, sempre me dando carinho, apoio e incentivo.
- À minha cachorrinha shih tzu chamada Lua por ter sempre me alegrado até nos dias mais difíceis.

RESUMO

MOREIRA, G. S. A. **Identificação e expressão gênica das enzimas arginase 1, arginase 2, e citocinas pró-inflamatórias em *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*, imunizados com *Ichthyophthirius multifiliis*.** 2017. 127 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

O protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* causador da doença dos pontos brancos em muitas espécies de peixes de água doce destaca-se como um importante patógeno por ser responsável por grandes perdas para a indústria de pescados mundial. Duas espécies de peixes de grande importância para a economia no Brasil foram selecionadas para este estudo, o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829) e a cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889). Com o objetivo de avaliar a resposta imune destes peixes frente ao parasita, inicialmente, o protozoário *I. multifiliis* foi isolado e repicado em *P. corruscans* para a obtenção da forma infectante (teronte) utilizada nas imunizações. A identificação molecular dos peixes foi realizada através da amplificação e sequenciamento do gene RAG2 mostrando que as espécies puras são homozigotas enquanto o híbrido é heterozigoto para este gene. Através de PCR foi realizada ainda a caracterização parcial dos genes arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF- α dos peixes pertencentes a família *Pseudoplatystoma* que resultaram em amplificações de sequências com aproximadamente 530, 815, 400, 280 e 300 pb, respectivamente, que foram usadas para a construção de *primers* específicos utilizados nas análises de expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR). A expressão gênica em *P. corruscans* e *P. reticulatum* imunizados com terontes vivos de *I. multifiliis* foram verificadas 6, 12, 18 e 24 horas após imunização, sendo retirada amostras do baço, fígado e rim anterior dos peixes. No geral a expressão dos genes

destes órgãos em *P. corruscans* apresentam um padrão semelhante de regulação. Um aumento significativo de expressão em relação ao período de imunização foi verificado para: a arginase 2 as 6 e 18 horas no baço, as 6 h no fígado e as 6, 18 e 24 horas no rim cranial; o gene da IL1- β as 24 h no fígado e 18 h e 24 h no rim cranial; e o gene da IL-8 somente as 18 h no baço. Já os genes arginase 1 e TNF α não tiveram regulação significativa nos períodos. Para *P. reticulatum* observou-se que somente o baço teve aumento na regulação com diferenças significativas nos períodos para arginase 2, IL-8 e TNF α , as 6 e 18 horas, já os genes arginase 1 e IL1- β não apresentaram alterações significativa.

Palavras-chave: *Pseudoplatystoma* spp, *Ichthyophthirius multifiliis*, imunização, expressão gênica

ABSTRACT

MOREIRA, G. S. A. **Identification and gene expression of the enzymes arginase 1, arginase 2, and pro-inflammatory cytokines in *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*, immunized with *Ichthyophthirius multifiliis*.** 2017. 127 p. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

The ciliate protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* has been reported in various freshwater fishes and stands out as an important pathogen for being responsible to severe losses to both food and aquarium fish production. Among the fish species explored economically in Brazil it can be highlight the pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829) and cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889). At this study the parasite *I. multifiliis* was original isolated from a petshop infected fish and maintained by serial transmission on naive pintado (*P. corruscans*) to obtain the infecting form (teronte) used at immunizations. The molecular identification of fish was realized through the amplification and sequencing of RAG2 gene, were the pintado (*P. corruscans*) and cachara (*P. reticulatum*) were homozygous, while the hybrid between those fish was considered heterozygous for this gene. At the partial gene characterization from fishes belonging to the *Pseudoplatystoma* family, the PCR amplification result in sequences of 530, 815, 400, 280 and 300 pb of the genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α respectively, which were used to construct of specific *primers* for the quantitative real-time PCR (qPCR). The gene expression at *P. corruscans* and *P. reticulatum* immunized with live theronts of *I. multifiliis* was evaluated 6, 12, 18 and 24 hours after the immunization, where it was collected samples of the spleen, liver and heady kidney. The gene expression of the organs of pintado (*P.*

corruscans) showed similar pattern of expression. An up-regulation with statistical significance was observed for: arginase 2 at 6 and 18 hours at spleen, 6 h at kidney and 6, 18 and 24 h at head kidney; the gene of IL1- β at 24 h at spleen, 18 and 24 hours at head kidney; the gene of IL-8 at 18 h at spleen. The genes of arginase 1 and TNF α didn't showed statistical significant regulation at this experiment. At the gene expression of cachara (*P. reticulatum*) only the spleen had a statistical alteration after theronts immunization where the arginase 2, IL-8 and TNF α was up-regulated at 6 h and 18 h, while the arginase 1 and IL1- β didn't showed statistical alteration.

Key words: *Pseudoplatystoma* spp, *Ichthyophthirius multifiliis*, immunization, gene expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção mundial de pescado por aquicultura e de pesca extrativista <i>apud</i> FAO (2014)	22
Figura 2. Imagens de pintado <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> - A e cachara <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> - B. Imagens retirada de http://www.fishbase.org	24
Figura 3. Relacionamento filogenético de <i>I. multifiliis</i> entre as principais linhagens de protozoários ciliados derivados de sequências de genes do rRNA 18S. Retirada de (MACCOLL et al., 2015) <i>apud</i> : (WRIGHT; COLORNI, 2002)	28
Figura 4. A= Imagem de um trofote de <i>I. multifiliis</i> maduro que dará origem ao tomonete. A seta preta esta indicando o núcleo. B= Tomonte em fase adiantada de desenvolvimento onde por ser observado diversos tomitos em seu interior que irão formar terontes. C= Teronte maduro pronto para infectar. Seta preta fina indica macronúcleo vegetativo, seta preta grossa indica micronúcleo reprodutivo e seta branca indica estrutura lieberkuhn. A e B retirada de http://www.aquaflux.com.br/conteudo/colunas/ictio-informacoes-basicas.php B= retirada de SUN et al. (2009)	29
Figura 5. Ciclo biológico do parasita <i>I. multifiliis</i> retirada de (YASUMARU, 2007) <i>apud</i> : (DICKERSON, H.; CLARK, 1998)	31
Figura 6. Tanques de 1000 L localizados no Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, utilizados para a manutenção de peixes das espécies <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i>	48
Figura 7. Aquários localizados no laboratório de parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP destinados à imunização de <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i> com <i>I. multifiliis</i>	49
Figura 8. Exemplares de pintado (<i>P. corruscans</i>), capturado nos tanques do Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, que foram utilizados nas desovas	50
Figura 9. Exemplares de cachara (<i>P. reticulatum</i>), capturada no tanque do Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, que foi utilizado nas desovas	51
Figura 10. Captura de peixes adultos da espécie <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i> , mantido no Centro Nacional de Gestão em Pesquisa e Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, para realização de desovas e obtenção de alevinos	52
Figura 11. Aquários localizados no laboratório de parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP destinados à manutenção do protozoário <i>I. multifiliis</i>	56

Figura 12. Exemplos de pintado (<i>P. corruscans</i>) oriundos da desova realizada no Centro de Nacional de Gestão em Pesquisa e Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, infectados por coabitação com lebetes (<i>P. reticulata</i>) naturalmente parasitados adquiridos em uma petshop	65
Figura 13. A= Trofante. B= Teronte. Fases do protozoários <i>I. multifiliis</i> obtidos a partir de raspado de pintado (<i>P. corruscans</i>) infectados por coabitação no laboratório de parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP	66
Figura 14. Eletroferograma obtido do sequenciamento do gene RAG2 do pintado (<i>P. corruscans</i>) onde pode-se observar a presença das bases nitrogenadas guanina, adenina e citosina com um único pico, indicando homozigose	67
Figura 15. Eletroferograma obtido do sequenciamento do gene RAG2 do cachara (<i>P. reticulatum</i>) onde pode-se observar a presença das bases nitrogenadas adenina, citosina e guanina com um único pico, indicando homozigose	67
Figura 16. Eletroferograma obtidos do sequenciamento do gene RAG2 do híbrido, entre <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i> onde pode-se observar os locais de substituição de nucleotídeos entre as espécies puras e a presença de dois picos no sequenciamento da espécie híbrida, indicando a ocorrência de heterozigose	68
Figura 17. Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene RAG2 obtidas de alevinos de pintado (<i>P. corruscans</i>) e cachara (<i>P. reticulatum</i>) e seu híbrido, onde pode-se observar os locais de substituição de nucleotídeos entre as espécies puras e o peixe híbrido. Indicado a homozigose para os puros e heterozigose para os híbridos. Asterisco (*) indicam bases idênticas	69
Figura 18. Sequência parcial do gene arginase 1 obtida a partir do cDNA de fígado de <i>P. corruscans</i> , através da amplificação utilizando os <i>primers</i> para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os <i>primers</i> para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014)	71
Figura 19. Sequência parcial do gene arginase 2 obtida a partir do cDNA de fígado de <i>P. corruscans</i> , através da amplificação utilizando os <i>primers</i> para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os <i>primers</i> para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014)	72
Figura 20. Sequência parcial do gene IL1- β obtida a partir do cDNA de fígado de <i>P. corruscans</i> , através da amplificação utilizando os <i>primers</i> para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os <i>primers</i> para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014)	73

Figura 21. Sequência parcial do gene IL-8 obtida a partir do cDNA de fígado de *P. corruscans*, através da amplificação utilizando os *primers* para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os *primers* para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014) 73

Figura 22. Sequência parcial do gene TNF α obtida a partir do cDNA de fígado de *P. corruscans*, através da amplificação utilizando os *primers* para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os *primers* para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014) 74

Figura 23. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene Arg1 de pintado (*P. corruscans*) em comparação com as espécies de peixes *Clarias batrachus*, *I. punctatus*, *C. carpio*, *A. mexicanus*, *D. rerio* e com a sequência de humano. Regiões específicas da família arginase são indicados nas áreas destacadas; histidina, ácidos aspártico e glicina envolvidos na ligação dos dois átomos de manganês são: Mn2+A (+), Mn2+B (Ψ) ou ambos Mn2+A e B ($\P$) e histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina (Π). Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Os números de acesso do Genbank das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes 76

Figura 24. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene Arg2 de *P. corrucans* em comparação com as espécies de peixes *I. punctatus*, *C. carpio*, *A. mexicanus*, *C. batrachus*, *Heteropneustes fossilis* e com a sequência de humanos. Regiões específicas da família arginase são indicados nas áreas destacadas; histidina, ácidos aspártico e glicina envolvidos na ligação dos dois átomos de manganês são: Mn2+A (+), Mn2+B (Ψ) ou ambos Mn2+A e B ($\P$) e histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina (Π). Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Os números de acesso do Genbank das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes 77

Figura 25. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene IL1- β de *P. corruscans* em comparação com as espécies de peixes *Hemibagrus macropterus*, *I. punctatus*, *Tachysurus vachellii*, *Pygocentrus nattereri*, *C. batrachus* e com a sequência de humanos. Regiões específicas da família IL1- β esta indicado nas área destacada. Seta indica o sitio de corte ICE (resíduo de ácido aspártico) de mamíferos que é crucial para a ativação da IL1- β . Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes 78

Figura 26. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene IL-8 de *P. corruscans* em comparação com as espécies de peixes *G. morhua*, *S. salarm*, *I. punctatus*, *P. nattereri*, *A. mexicanus*, e com a sequência de humanos. O domínio ELR e outro resíduos são econtrado dentro do retângulo e os quatro residuos de cisteina são indicado em cinza. Resíduos idênticos

(*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes 79

Figura 27. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene TNF α de *P. corruscans* em comparação com as espécies de peixes *I. punctatus*, *Clarias*. sp, *A. mexicanus*, *C. auratus*, *C. Carpio*, e com a sequência de humanos. O domínio de transmembrana esta indicado dentro do colchete, a região específicas da família esta indicada dentro do retângulo. O potencial local de clivagem que gera o péptido maduro estão em cinza escuro e dois resíduos de cisteína cruciais para a dobragem correta do TNF α estão em cinza claro. Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes 80

Figura 28. Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no baço de *P. corruscans* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste T ($p \leq 0,05$) 82

Figura 29. Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no fígado de *P. corruscans* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste T ($p \leq 0,05$) 84

Figura 30: Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no rim cranial de *P. corruscans* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste T ($p \leq 0,05$) 86

Figura 31. Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no baço de *P. reticulatum* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste T ($p \leq 0,05$) 88

Figura 32. Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no fígado de *P. reticulatum* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão .. 90

Figura 33. Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no rim cranial de *P. reticulatum* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão 92

LISTA DE TABELA

Tabela 1: *Primers* utilizados na reação de PCR para a caracterização gênica de alevinos das espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum* e dos híbridos 54

Tabela 2. *Primers* utilizados na reação de PCR convencional para caracterização parcial dos genes da arginase 1, arginase 2, TNF- α , IL1- β e IL-8 a partir de fígado de *P. corruscans* e *P. reticulatum* 60

Tabela. 3. *Primers* utilizados na reação de PCR em tempo real (qPCR), para a quantificação dos genes arginase 1, arginase 2, TNF- α , IL1- β e IL-8 a partir de amostras obtidas do baço, fígado e rim cranial de *P. corruscans* e *P. reticulatum* 60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Produção de Peixes no Brasil	21
2.1.1 Espécies explorada economicamente no Brasil.....	23
2.2 Parasita <i>I. multifiliis</i>	26
2.2.1 Visão Geral.....	26
2.2.2 Taxonomia	27
2.2.3 Ciclo Biológico.....	30
2.2.4 Controle de <i>I. multifiliis</i>	33
2.2.5 Vacinas contra <i>I. multifiliis</i>	34
2.3 Sistema imunológico em peixes	36
3. JUSTIFICATIVA	43
4. HIPÓTESE.....	45
5. OBJETIVO GERAL	46
5.1 Objetivos Específicos	46
6. MATERIAL E MÉTODOS	47
6.1 Qualidade da água.....	47
6.2 Obtenção das espécies de <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i> em condições de laboratório....	49
6.3 Caracterização molecular de alevinos de <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i> e do peixe híbrido através da amplificação do gene RAG 2.	52
6.4 Obtenção e manutenção de <i>I. multifiliis</i>	54
6.5 Imunização de <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i> através da injeção de terontes de <i>I. multifiliis</i> e coleta de tecidos para a análise da expressão genica.	56
6.6 Extração de RNA para caracterização, parcial dos cDNA dos genes (arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α), e análise de PCR em tempo real.	57
6.7 Síntese do cDNA para caracterização, parcial dos cDNA dos genes (arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α), e análise de PCR em tempo real.	58
6.8 Desenho de <i>primers</i> para caracterização, parcial dos cDNA dos genes arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α	58
6.9 Tradução da sequência de nucleotídeos em aminoácidos dos genes arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8, TNF- α	61
6.10 Padronização e quantificação gênica através do PCR em tempo real, a partir de RNA extraído do fígado, baço e rim cranial de <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i>	61
6.11 Análise Estatística	62
7. RESULTADOS	64
7.1 Qualidade da água.....	64
7.2 Obtenção da forma infectante de <i>I. multifiliis</i>	64
7.3 Caracterização molecular das espécies de <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i>	66
7.4 Identificação dos genes arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α	70
7.5 Sequência de aminoácidos.....	74
7.6 Expressão relativa dos genes arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α em <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i> após imunização com terontes de <i>I. multifiliis</i>	81
7.6.1 Expressão relativa em <i>P. corruscans</i>	81

7.6.1.1 Baço de <i>P. corruscans</i>	81
7.6.1.2 Fígado de <i>P. corruscans</i>	83
7.6.1.3 Rim cranial de <i>P. corruscans</i>	85
7.6.2 Expressão relativa em <i>P. reticulatum</i>	87
7.6.2.1 Baço de <i>P. reticulatum</i>	87
7.6.2.2 Fígado de <i>P. reticulatum</i>	89
7.6.2.3 Rim cranial de <i>P. reticulatum</i>	91
8. DISCUSSÃO	93
9. CONCLUSÃO	107
10. Referências Bibliográficas	108

ANEXO

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira é uma atividade econômica em franca expansão, onde tanto a produção, quanto o consumo de pescado vêm crescendo a cada ano. O gênero *Pseudoplatystoma* abriga os maiores peixes da família Pimelodidae, da ordem dos Siluriformes, que são encontrados nas principais bacias hidrográficas sul-americanas. Dentre suas principais espécies exploradas economicamente no Brasil destacam-se: o pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829) e a cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* (Linnaeus, 1766), devido à alta qualidade de carne, baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares.

Porém, os sistemas de criação podem gerar um ambiente estressante para os peixes, favorecendo o aparecimento de agentes patogênicos. Assim, infestações por protozoários podem ocasionar grandes perdas para piscicultores, uma vez que os patógenos podem reduzir a taxa de crescimento dos peixes, promovendo alterações fisiológicas e hematológicas, mudanças de comportamento e altas taxas de mortalidade principalmente nas fases de larvas e juvenis.

Neste contexto o protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, (Fouquet, 1876), causador da doença dos pontos brancos, que se aloja na epiderme e brânquias de peixes é considerado um dos parasitas com maior relevância na piscicultura por possuir distribuição mundial e baixa especificidade em relação ao hospedeiro. O ciclo biológico do parasita possui 4 estágios morfológicos que consistem em forma trofante encontrada na epiderme do hospedeiro, as fases encistadas tomites e tomites e a fase infectante tomites.

Apesar da grande importância deste parasita como patógeno de peixes, os métodos utilizados como controle ainda são precários e se limitam a tratamentos com produtos químicos como, verde de malaquita (acumulativo no organismo e altamente cancerígeno) e antibióticos a base de cloranfenicol e oxitetraciclina. Com isso, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a forma

teronte do *I. multifiliis*, infectando peixes para avaliar a expressão relativa de genes imunológicos com a intenção de um melhor entendimento dos mecanismos de defesa dos peixes. Dentre os mecanismos imunológicos avaliados até o momento estão a enzima arginase que participa da ativação dos macrófagos, o fator de necrose tumoral (TNF α) que é uma citocina produzida por várias células como macrófagos, monócitos e linfócitos e a interleucina-IL-1 β e quimiocina IL-8, as quais estão relacionadas com a indução da migração de neutrófilos e macrófagos para o sítio de infecção. Até o momento, estudos realizados com o objetivo de conhecer a resposta imunológica frente às infecções parasitárias foram desenvolvidos principalmente em peixes explorados economicamente na Ásia, Europa e América do Norte como a truta (*Oncorhynchus mykiss*), a carpa (*Cyprinus carpio*) e o catfish (*Ictalurus punctatus*). Entretanto, nos peixes nativos explorados economicamente no Brasil, como *P. corruscans* e *P. reticulatum* não se conhece mecanismos básicos de resposta imune frente a infecções parasitárias. Portanto o presente estudo objetivou-se em caracterizar e quantificar a expressão dos genes arginase 1 e 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α em *P. corruscans* e *P. reticulatum* imunizados com terontes de *I. multifiliis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de Peixes no Brasil

O pescado é considerado uma das maiores fontes alimento no mundo representando cerca de 20% da ingestão total de proteína proveniente de animais. Mesmo em muitos países em desenvolvimento, o qual é consumido em baixas quantidades, representa um positivo impacto nutricional, devido ao alto valor nutricional proveniente da carne dos peixes como ácidos graxos insaturados e vitaminas (GONÇALVES, 2011).

Além do aspecto de produção de alimentos, o pescado possui grande importância econômica global, sendo um instrumento de geração de renda e inclusão social. Estima-se que em 2012 a produção de pescado tenha sido de aproximadamente 158 milhões de toneladas, movimentando 144,4 bilhões de dólares e gerando 58,3 milhões de empregos envolvidos na captura de peixes e na aquicultura (FAO, 2014).

Para atender a atual demanda de pescado, a aquicultura mundial desponta como uma alternativa viável para um aumento contínuo da produção de peixes nos próximos anos, visto que a pesca encontra-se com a produção estabilizada desde a década de 1990 (Figura 1) (FAO, 2014). No Brasil, pode-se observar a mesma tendência mundial, onde no triênio de 2008-2010, aquicultura continental obteve um incremento de aproximadamente 40%, com uma produção total de 394.340 t de pescado. Já a pesca extrativista continental registrou um pequeno aumento de 4%, onde em 2009 obteve uma produção de 239.493 t e, em 2010 obteve uma produção de 248.911 t (MPA, 2011). Devido a este aumento contínuo na produção de pescado, o Brasil ocupou a décima quarta posição entre os 25 maiores produtores de pescado de água doce do mundo, com um total de 474.3 t no ano de 2014 (FAO, 2016).

Figura 1: Produção mundial de pescado por aquicultura e de pesca extrativista

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges:** secondary title. ROME: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014.

Em 2014, o consumo mundial de pescado era de aproximadamente 16,7 kg habitante/ano porém, este número tende a subir nos próximos anos, podendo atingir 22,5 kg habitante/ano em 2030, ocasionando assim um aumento de 100 milhões de toneladas de pescado por ano (FAO, 2014). Apesar do Brasil apresentar valores inferiores em relação ao consumo mundial *per capita* de pescado, com aproximadamente 11,1 kg (BRABO et al., 2016), é esperado um grande aumento, de 104% ou mais em 2025, devido a investimentos significativos neste setor (FAO, 2016). Outros fatores que podem impulsionar o crescimento da aquicultura brasileira são: disponibilidade hídrica, clima favorável (MPA, 2011) e o grande número de espécies nativas presente no continente Sul Americano, que pode chegar a aproximadamente 8000 espécies, o que representaria 24% de todas as espécies de peixes do mundo (SACHEFER, 1998).

2.1.1 Espécies explorada economicamente no Brasil

Dentre as várias espécies de peixes nativas exploradas economicamente no Brasil, destacam-se aquelas pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma*, que são os maiores peixes da família Pimelodidae, da ordem dos Siluriformes. Estes peixes são migratórios e podem ser encontrados nas bacias hidrográficas da América do Sul como: bacia do Prata, que inclui as bacias dos rios Paraguai, Paraná e Uruguai (abrangendo os países Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) (LUNDBERG; LITTMANN, 2003; BUITRAGO-SUAREZ; BURR, 2007). Devido ao hábito alimentar piscívoro, esse peixe representa um alto papel ecológico por serem grandes predadores e desta forma, exercerem forte pressão sobre os níveis inferiores da cadeia trófica aquática (RESENDE et al., 1996).

Este gênero é composto por 8 espécies (BUITRAGO-SUAREZ; BURR, 2007) que são diferenciadas por caracteres morfológicas que envolvem pequenas variações no formato do corpo e pela coloração (barras verticais escuras, pontos ou manchas) (CARVALHO-COSTA et al., 2011). Duas destas espécies são de grande interesse econômico, sendo consideradas peixes nobres, muito apreciados no mercado nacional e internacional, cuja apreciação e valor vêm subindo para uma posição de destaque entre os peixes de água doce, devido à qualidade de sua carne, que além de branca e saborosa, apresenta baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares (KUBITZA; CAMPOS; BRUM, 1998). Sendo o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix & Agassiz, 1829) caracterizado por pontos espalhados pelo corpo, encontrado na Bacia do Prata e São Francisco (Figura 2 A) e a cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*, Linnaeus, 1766) identificada por barras verticais que pode ser identificada bacia Paraná-Paraguai e Bacia Amazônica (Figura 2 B).

Antigamente, o surubim “cachara” era uma espécie classificada como *Pseudoplatystoma fasciatum* e, acreditava-se que esta possuía uma grande distribuição geográfica pelas bacias do

Amazonas, Magdalena, Orinoco, Paraná-Paraguai e Tocantins-Araguaia (LUNDBERG; LITTMANN, 2003). Porém, uma recente reclassificação desta espécie, dividiu a espécie em *P. fasciatum* (restrita a região das Guianas) em outras 4 espécies sendo: *Pseudoplatystoma punctifer* (bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia), *Pseudoplatystoma orinocoense* (bacia do Orinoco), *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (rio Magdalena) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (localização citada acima) (BUITRAGO-SUAREZ; BURR, 2007)

Figura 2: Imagens de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* - A e cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* - B.

Fonte: <http://www.fishbase.org>

Ambos os peixes *P. corruscans* e *P. reticulatum* alcançam a maturidade sexual por volta dos quatro anos e meio de idade, e possuem um tempo de vida aproximado de 15 anos. Podem atingir aproximadamente 140 cm e 40 Kg para *P. corruscans* e 114 cm e 15 Kg para *P. reticulatum*, (RESENDE et al., 1996). Na piscicultura brasileira o pintado (*P. corruscans*) (Figura 2 A) e a cachara (*P. reticulatum*) (Figura 2 B) são frequentemente cruzados para produção a de alevinos híbridos. Os produtores relatam vantagens destes híbridos, com uma combinação de características

proveitosas de ambas as espécies como, maior crescimento, diminuição do canibalismo e maior facilidade de manejo (CAMPOS, 2010). Este peixe híbrido é vendido como o pintado, e sua produção na piscicultura brasileira teve um incremento de 82%, de 2007 com 1.592 t para 2011 com 8.824 t (SEBRAE, 2015). Em 2013, a exportação de peixes do género *Pseudoplatystoma* ocupou a 43^o posição entre todos os peixes exportados no Brasil com 1.840 t (SEBRAE, 2015).

Devido a realização deste cruzamento na aquicultura Brasileira, se tem relatos de peixes híbridos encontrados na natureza proveniente de escape de criadores (BIGNOTTO et al., 2009). O que pode colocar em risco a integridade genética desta espécie. Por isso, recentes estudos vem desenvolvendo marcadores moleculares com a intenção de realizar uma separação das espécies utilizando a biologia molecular (DO PRADO et al., 2011; DE CARVALHO et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2013; PORTO-FORESTI et al., 2013).

Além do problema de escape de peixes, as criações intensivas podem ocasionar aumento da incidência de diversos agentes patogênicos que acometem peixes. Segundo EIRAS et al. (2008) e WOO (2006) vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários podem infectar e causar diversas doenças em peixes, podendo levar a morte. Dentre estes, podemos destacar o protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876), conhecido como Ictio que é considerado um dos parasitas mais importantes na piscicultura, no Brasil sendo identificado em espécies de peixes ornamentais e de importância econômica (CECCARELLI et al., 1990; WOO, 2006; TAVARES-DIAS; LEMOS; MARTINS, 2010).

2.2 Parasita *I. multifiliis*

2.2.1 Visão Geral

Os primeiros registros da doença ocasionada por *I. multifiliis* conhecida como “pontos brancos”, onde o parasita se aloja na epiderme e brânquias de peixes (MARTINS et al., 2002), foram realizados na China em 1126 (DASHU; LIEN-SIANG, 1960; HINES, R. S. ; SPIRA, 1974). Sustentando a hipótese de que *I. multifiliis* é um protozoário endêmico do Extremo Oriente, sendo introduzido na Europa na Idade Média, com o desenvolvimento da cultura da carpa (MATTHEWS, 2005) e para muitos outros países, incluindo os Estados Unidos, através da importação de peixe dourado, *Carassius auratus* (HOFFMAN, 1970). Na América do Sul, um dos primeiros relatos de Ictio foi realizado em salmonídeos introduzidos no lago Titicaca na fronteira Peru-Bolívia (WURTSBAUGH; TAPIA, 1988).

A descrição oficial do *I. multifiliis* foi ocorrer somente em 1876, por Fouquet na França, onde o parasita foi responsável por uma grande mortalidade em trutas devido à sua rápida multiplicação (BUCHMANN et al., 2001). O nome do parasita em latim refere-se a “piolho de peixe com muitas progênes” (Greek: Ichthyo-, peixe; phthir-, piolho; multi-, muitos; fil-, cílios) devido ao grande número de prole, ou seja, terontes, que são produzidos pelos tomites encistados nos estágios de vida livre (MAKI, 2002).

Fatores-chave que influenciaram na elevada distribuição mundial de *I. multifiliis* em teleósteos de água doce, são a ampla tolerância à temperatura, juntamente com baixo grau de especificidade do hospedeiro e o ciclo de vida direto (MATTHEWS, 2005). Isso pôde ser comprovado em *Cyprinus carpio* onde o parasita, *I. multifiliis* se mostrou bem adaptado, sobrevivendo às mudanças sazonais de temperatura, de 4 a 28°C (MATTHEWS, 2005).

A doença dos "pontos brancos", representa mais danos para as populações de peixes de água doce em todo o mundo do que qualquer outro patógeno eucariótico (HINES, R.S. ; SPIRA, 1973; ROGERS; GAINES, 1975). Sendo responsável por grandes perdas econômicas, tanto em peixes de criação (LING; SIN; LAM, 1991) quanto em peixes ornamentais (RINTAMAKIKINNUNEN; VALTONEN, 1997). Apesar de não se ter registro mundial sobre as perdas econômicas anuais atribuídas à ictioftiríase, os Estados Unidos, estima-se que o protozoário *I. multifiliis* foi responsável por uma perda de aproximadamente 1000 kg de alevinos de “catfish” (*Ictalurus punctatus*) em 2002 (HANSON et al., 2008).

Devido a sua alta patogenicidade, pesquisadores avaliaram em diversas regiões do mundo a susceptibilidade de diferentes espécies de peixes comerciais a infecções por *I. multifiliis*, como por exemplo catfish (*Ictalurus punctatus*), espécies de salmão (*Oncorhynchus* spp.), espécies de carpas (*Cyprinus* spp.), espécies de tilápia (*Oreochromis* spp.) e trutas (*Salmo trutta*) que apresentaram uma alta taxa de mortalidade quando infectadas (PAPERNA, 1991; VALTONEN; KOSKIVAARA, 1994; NOBLE; SUMMERFELT, 1996; BUCHMANN; BRESCIANI, 1997; RINTAMAKIKINNUNEN; VALTONEN, 1997; MATTHEWS, 2005; XU; KLESIUS; SHOEMAKER, 2005; DICKERSON, H.W., 2006; EL-SAYED, 2006; GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN, 2007; JORGENSEN; LARSEN; BUCHMANN, 2009; HEINECKE; BUCHMANN, 2013)

2.2.2 Taxonomia

De acordo com a classificação taxonômica, o *I. multifiliis* é um protozoário pertencente ao filo Ciliophora da classe Oligohymenophorea da subordem Ophryoglenina, da sua própria família Ichthyophthiriidae (Figura 3) (LOM, J.; ROHDE; DYKOVA, 1992).

Figura 3: Relacionamento filogenético de *I. multifiliis* entre as principais linhagens de protozoários ciliados derivados de sequências de genes do rRNA 18S

Fonte: WOO, P. T. K. **Fish Diseases and Disorders. Protozoan and Metazoan Infections.** CAB International, 2006, v.1 WRIGHT, A. D. G.; COLORNI, A. Taxonomic re-assignment of *Cryptocaryon irritans*, a marine fish parasite. **European Journal of Protistology**, v. 37, n. 4, p. 375-378, 2002.

Os protozoários pertencentes a este filo possuem de um a vários conjuntos de núcleos (dualismo: micronúcleo e macronúcleo) usados para a reprodução que podem ser assexuadamente (divisão binária) e sexualmente (autogamia ou conjugação) (LOM, J. ; DYKOVÁ, 1992; DICKERSON, H.W., 2006). A inclusão do *I. multifiliis* na classe Oligohymenophorea se deu devido a presença de um orifício oral presente na formas terontes (ROQUE; DE PUYTORAC; LOM, 1967), que está localizado próximo a uma estrutura chamada Lieberkuhn, que é característico dos pertencentes a subordem Ophryoglenin (LYNN; CORLISS, 1991). No protozoário *I. multifiliis* é possível identificar estas 3 estruturas citadas acima, sendo um o macro núcleo vegetativo um micro núcleo reprodutivo que acredita-se estar envolvido na reprodução

sexuada e a estrutura Lieberkuhn encontrada somente na fase terontes responsável por foto recepção (Figura 4 A, B e C) (DICKERSON, H.W., 2006). Em relação a reprodução sexuada, novas pesquisas vem demonstrando fortes evidências que o parasita *I. multifiliis* possa trocar material genético através de conjugação, onde os autores MACCOLL et al. (2015) observaram diferentes composições genéticas em 14 SNP em *I. multifiliis* de diferentes regiões dos Estados Unidos da América.

Figura 4 A= Imagem de um trofante de *I. multifiliis* maduro que dará origem ao tomonte. Seta preta esta indicando o macronúcleo. B= Tomonte em fase adiantada de desenvolvimento onde por ser observado diversos tomitos em seu interior que irão forma terontes. C= Teronte maduro pronto para infectar. Seta preta fina indica macronúcleo vegetativo, seta preta grossa indica micronúcleo reprodutivo e seta branca indica estrutura Lieberkuhn

Fonte A e B retirada de <http://www.aquaflux.com.br/conteudo/colunas/ictio-informacoes-basicas.php> C= retirada de SUN, H. Y.; NOE, J.; BARBER, J.; COYNE, R. S.; CASSIDY-HANLEY, D.; CLARK, T. G.; FINDLY, R. C.; DICKERSON, H. W. Endosymbiotic Bacteria in the Parasitic Ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7445-7452, 2009.

Apesar do gênero *Ichthyophthirius* possuir somente uma espécie descrita, o protozoário *Ictio* possui 11 isolados ou cepas com 5 tipos de diferentes antígenos de superfície (DICKERSON, H. W.; CLARK; LEFF, 1993; DICKERSON, H.W., 2006; SWENNES et al., 2006) que foram relacionados com a capacidade de infecção no hospedeiros, virulência (SWENNES; FINDLY; DICKERSON, 2007) e com a resistência a diferentes tipos de tratamentos químicos (STRAUS; MEINELT, 2009). Esses antígenos possuem de 50 a 70 kDa e são formados pelas proteínas ancorada glicosil-fosfatidil-inositol conhecido como ((GPI)-ancorada) (CLARK et al., 2001).

2.2.3 Ciclo Biológico

O ciclo biológico do *I. multifiliis* é dividido em 04 estágios distintos: trofonte, tomonte, tomito e terontes (Figura A, B e C) (MATTHEWS, 2005; DICKERSON, H.W., 2006). O trofonte é a forma encontrada na pele e brânquias do hospedeiro onde se nutre e pode alcançar o diâmetro de aproximadamente 1 mm. O trofonte maduro se solta da epiderme para a água onde se desenvolvem em tomontes encistados. Esta forma cística é considerada como a fase reprodutiva por divisão binária ou por conjugação em que dará origem a numerosas células chamadas tomitos. O número de tomitos resultantes de um único tomonte varia de 50 a algumas centenas (Figura 5) (AIHUA; BUCHMANN, 2001).

Os estágios liberados do cisto são chamados de terontes, o qual são nadantes, e estão prontos para infectar os peixes (Figura 5) (BUCHMANN et al., 2001). Esta infecção deve ocorrer rapidamente, pois esta forma possui uma viabilidade estável de aproximadamente 12h a uma temperatura de 20°C (SUZUKI, 1935). Os terontes medem de 30 à 50 µm (MACLENNAN, 1942) com um corpo de formato piriforme recoberto de cílios (ROQUE; DE PUYTORAC; LOM, 1967).

Figura 5: Ciclo biológico do parasita *I. multifiliis*

Fonte: YASUMARU, F. A. **Influência do ácido caprílico suplementado na ração de juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* no controle de *Ichthyophthirius multifiliis***. Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2007. 41 p.

O encontro entre terontes e os hospedeiros envolvem fatores ambientais, em particular a luz possui um papel muito importante uma vez que terontes se mostram foto-atraídos (MATTHEWS, 2005). De acordo com estudos realizados por WAHLI; MEIER; SCHMITT (1991) foi relatado que os terontes possuem uma atração dirigida a luminosidade, pois quando dada uma escolha entre uma região iluminada e escurecida de um aquário, um número significativo de terontes foi localizado dentro da primeira região, e esta distribuição dos terontes se mostrou inalterada mesmo após a introdução de um peixe para a área escura. Tal resposta positiva à luz, no entanto, garantiria o movimento ascendente do parasita para a superfície, aumentando as oportunidades de contato com o hospedeiro (MATTHEWS, 2005). Além disso, pesquisas desmontaram que os terontes possuem

uma quimioatração pelos peixes quando estes estão próximos um ao outro (LOM, J.; CERKASOVA, 1974; BUCHMANN; NIELSEN, 1999; HAAS et al., 1999).

Após o contato do teronte com o epitélio do hospedeiro, o parasita apresenta movimento rápido em torno do seu eixo, para que ocorra a penetração entre junções intercelulares (HAAS et al., 1999) e dentro do tecido, o teronte passa por modificações em seu formato através do aparecimento de um aparato bucal, utilizado na alimentação (DICKERSON, H.W., 2006) de detritos celulares ocasionado pelo seu movimento físico (CANELLA; ROCHHI-CANELLA, 1976). O teronte passa a ser chamado de trofonte após o aumento drástico em seu tamanho e o desaparecimento da organela de Lieberkuhn (MATTHEWS; MATTHEWS; EKLESS, 1996; DICKERSON, H.W., 2006).

A duração necessária para que o trofonte conclua a alimentação e saia do hospedeiro é extremamente dependente de temperatura do ambiente (DICKERSON, H.W., 2006). De acordo com AIHUA; BUCHMANN (2001), este período pode demorar de 20 dias em temperatura de 7°C como 7 dias em temperatura de 20°C. A liberação do trofonte para a água geralmente ocorre quando este atinge um tamanho de aproximadamente 85µm (EWING; KOCAN, 1986). Esta saída do trofonte do hospedeiro pode ser responsável pelas altas taxas de mortalidade ocasionada pelo parasita *I. multifiliis*, devido a criação de lesões na pele (EWING; KOCAN, 1986), levando a uma desregulação osmótica (HINES, R.S. ; SPIRA, 1973) e gerando uma abertura a infecções secundárias por fungos e bactérias (DICKERSON, H.W., 2006).

O trofonte passa a ser chamado de tomonete assim que cessa a alimentação e extrai-se do epitélio para água (MATTHEWS, 2005; DICKERSON, H.W., 2006). Esta fase é considerada como o estágio reprodutivo do parasita (DICKERSON, H.W., 2006). Após a saída do hospedeiro, o tomonete nada durante aproximadamente 1 hora antes de segregar uma matriz proteica pegajosa (EWING; KOCAN; EWING, 1983). O período entre a saída do hospedeiro e a secreção da parede

do cisto também é influenciado pela temperatura do ambiente. DICKERSON, H.W. (2006) cita que tomites resfriados a 10°C cessam completamente a produção da matriz proteica, porém, quando estes mesmo tomites são aquecido a 23°C, voltam a ter seus metabolismos reestabelecidos. Além da parede cística proteger o parasita contra a possível entrada de fungo e bactéria esta tem a função de prender o tomonte em substrato (DICKERSON, H.W., 2006). Logo após a secreção da parede cística, inicia-se uma série de divisões que resultará na formação de 500 à 1000 células nomeadas de tomites (DICKERSON, H.W., 2006). Após 24 horas, esta divisão se encerra e os tomites começam a se diferenciar em terontes, assumindo um formato de célula piriforme, ocorre a formação de um perfuratório (DICKERSON, H.W., 2006). Os primeiros terontes a diferenciar fazem um orifício na parede do cisto para sua saída, deixando um buraco na parede destes, através da qual os organismos restantes podem sair (DICKERSON, H.W., 2006).

2.2.4 Controle de *I. multifiliis*

Apesar da importância do *I. multifiliis* como patógeno de peixes, os métodos utilizados como controle não são específicos, e se limitam ao tratamento com produtos químicos como o diflubenzuron (conhecido na aquicultura como verde de malaquita) (DICKERSON, H.W., 2006). O uso disseminado deste produto pode gerar alguns problemas como, poluição ambiental e desequilíbrio ecológico por se tratar de um produto tóxico (WEI; LI; YU, 2013). Atualmente, o verde malaquita é considerado como o melhor tratamento contra *I. multifiliis*, por afetar todos os estágios do ciclo biológico (TIEMAN; GOODWIN, 2001). Entretanto, o verde malaquita é acumulativo nos tecidos dos peixes (fígado, rins, músculo e peles) (CAMACHO, 2010) e quando estes animais são ingeridos por humanos, o produto pode desencadear atividades cancerígenas e mutagênicas (POE; WILSON, 1983).

Devido a este perigo para saúde humana, o verde malaquita foi banido nos Estados Unidos pela Food and Drug Administration (FDA) desde de 1991, e da União Europeia (EC directive 90/676/EEC; article 14, regulation 2377/90/EEC) desde 2000. Enquanto no Brasil sua utilização ainda é indiscriminada, pois não há uma legislação brasileira para o uso de xenobióticos em peixes e outros organismos aquáticos (SCHALCH et al., 2005). Além do verde malaquita, outros produtos tem sido utilizado no controle do ictioftiríase, porém com sucesso limitado como: permanganato de potássio (1,3 mg/L), formalina (0,2 ml/L), sulfato de cobre (0,63 mg/L), sal comum (10g/L), (CARNEIRO; SCHORER; MIKOS, 2005), produtos naturais obtidos a partir de extratos de plantas como sanguinarina, diidrosanguinarina e diidro queleritrina de *Macleaya cordata* (YAO et al., 2010; YAO et al., 2011), queleritrina e cloroxilonina de *Toddalia asiática* (SHAN et al., 2014) e cynatratoside-A e cynanversicoside C de *Cynanchum paniculatum*. Porém, nenhum dos métodos citados acima produzem uma proteção de longo prazo em seu hospedeiro contra o parasita *I. multifiliis*.

2.2.5 Vacinas contra *I. multifiliis*

Uma alternativa para a ictioftiríase em peixes pode ser a aplicação de vacina, como no caso de algumas doenças virais (SOMMERSET et al., 2005; AHMADIVAND et al., 2017) e bacterianas (WANG, Y. et al., 2017) de peixes. Entretanto, até o momento não se tem a descrição de uma vacina comercial contra as mais importantes doenças parasitárias de peixes, incluindo o *I. multifiliis* (SOMMERSET et al., 2005).

Alguns pesquisadores observaram que peixes que são infectados naturalmente por terontes de *I. multifiliis* adquirem uma proteção imunológica que pode durar de meses até um ano (BURKART; CLARK; DICKERSON, 1990; DICKERSON, H.W., 2006), sendo este período

relacionado com a carga parasitaria que foram infectados (DICKERSON, H.W., 2006). A partir dessa constatação, vários pesquisadores vêm tentando esclarecer quais são os mecanismos envolvidos nessa imunidade adquirida contra *I. multifiliis*. De acordo com DICKERSON, H. W.; CLARK (1996) a infecção com várias formas de *I. multifiliis* vivos ou mortos, conferiram respostas imunológicas do tipo celular e humoral em *O. mykiss* e *I. punctatus* contra o parasita. XU; KLESIUS; SHELBY (2004) também demonstraram que a imunização intraperitoneal dos peixes é mais eficiente quando realizadas com os parasitas vivos de *I. multifiliis* na forma terontes, através do aumento dos anticorpos e da proteção adquirida contra novas infecções deste parasita.

Esses anticorpos podem ser encontrados no muco e no soro de peixes infectados com *I. multifiliis* e estão envolvidos na proteção contra infecções subsequentes (CLARK; DICKERSON; FINDLY, 1988; LING; SIN; LAM, 1993). A produção dos anticorpos de imobilização ocorre após o contato com os antígenos de superfície ancoradas GPI dos parasitas, conhecidos como antígenos de imobilização (i-Ag), assim classificadas devido a paralização flagelar do parasita tornando-o vulnerável ao sistema imune do hospedeiro (CLARK; DICKERSON; FINDLY, 1988; CLARK et al., 2001). Além disso, i-Ag de terontes isolados mostram-se capazes de gerar proteção contra desafios subsequentes, mostrando ser uma opção efetiva de vacina contra *I. multifiliis* (WANG, X. T.; DICKERSON, 2002).

Apesar das vacinas com diferentes formas do parasita (trofonte, tomonte e teronte) ou de i-Ag purificados terem imunizado peixes, a obtenção desses imunógenos é difícil já que é realizada a partir de peixes infectados o que torna essas opções de vacinação muito demorada, cara e impraticável em larga escala para imunização de animais de produção (WANG, X. T.; DICKERSON, 2002). Dessa forma, se faz necessário estudos para a obtenção de antígenos para vacinas contra *I. multifiliis*.

Atualmente, sabe-se que essas vacinas são capazes de gerar uma proteção, mas não se sabe ainda todos os mecanismos envolvidos na defesa que os peixes desenvolvem contra infecções pelo *I. multifiliis*. Algumas pesquisas para compreender a resposta imunológica dos peixes frente à infecção por estes parasitas foram realizadas através da titulação de anticorpos no soro através de ELISA. Porém, nem sempre é possível relacionar os títulos de anticorpos com imunização adquirida pelos peixes (SIGH; BUCHMANN, 2001). Além disso, outros fatores podem estar relacionados à proteção (XU; KLESIUS; SHOEMAKER, 2008). Por isso, as ferramentas de biologia molecular têm sido imprescindíveis nos estudos que visam aumentar os conhecimentos de expressão gênica relacionada ao sistema imunológico de peixes teleósteos (LINDENSTROM; BUCHMANN; SECOMBES, 2003; BYON et al., 2005).

2.3 Sistema imunológico em peixes

O sistema imunológico é um conjunto de estruturas e processos biológicos de um organismo que tem a função de detectar uma grande variedade de agentes como, bactérias, fungos, vírus e parasitas, na proteção contra doenças e na distinção destes patógenos contra o próprio tecido saudável (RAUTA; NAYAK; DAS, 2012). O sistema imunológico pode ser encontrado em todas as formas, de vida desde os invertebrados (na forma de enzimas que protegem as bactérias) até nos vertebrado com um sistema mais complexo (humanos) (BECK; HABICHT, 1996). O sistema de defesa pode ser dividido em duas categorias, o sistema imunológico inato e o sistema imunológico adaptativo.

A defesa inata surgiu desde os primeiros organismos rudimentares, sendo considerada o primeiro mecanismo imunológico onde o hospedeiro se defende de uma infecção de forma não específica, ou seja, as células do sistema inato reconhecem e respondem a patógenos de uma

maneira genérica (RAUTA; NAYAK; DAS, 2012). Dentro deste sistema estão barreiras epiteliais, fagócitos, sistema complemento e exterminadoras naturais (natural killers-NK) (ABBAS; LICHTMAN, 2008)

Já o sistema adaptativo ou sistema adquirido surgiu após aparição dos primeiros vertebrados com mandíbula, e é composto por células sistêmicas altamente especializadas, que trabalham em conjunto para eliminar ou prevenir doenças (RAUTA; NAYAK; DAS, 2012). A ativação deste sistema ocorre pelo sistema imunológico inato "não específico" o qual é evolutivamente mais antigo (considerado como o principal sistema de defesa em praticamente em todos seres vivos) (RAUTA; NAYAK; DAS, 2012). Além disso, os mecanismos imunológicos adaptativos são altamente complexos, específicos e marcados pela diversidade e memória (RAUTA; NAYAK; DAS, 2012) no qual, a resposta é realizada pelas células B que vão originar anticorpos e células T, que são formadoras das células T efectoras (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

Os peixes teleósteos possuem a organização dos órgãos linfoides secundário (responsáveis pela formação de células de defesa) semelhantes à dos mamíferos, excetos por não possuírem medula óssea e nódulos linfáticos (PRESS; EVENSEN, 1999). Assim, o rim dos peixes é o órgão que possui células imunes, sendo o rim anterior considerado o órgão homólogo e funcional do sistema imunológico, uma vez que, neste órgão é encontrada a maior concentração de linfócitos B (BROMAGE et al., 2004; ZWOLLO et al., 2005; ZWOLLO et al., 2008). Além disso, o rim anterior (aglomerular) assume funções hematopoiéticas e é responsável pela produção de células fagocíticas, células processadoras de antígenos, células produtoras de anticorpos e células de memória, através de centros melanomacrofágicos (RAUTA; NAYAK; DAS, 2012).

O baço dos teleósteos possui função semelhante a encontrada nos mamíferos onde, este órgão funciona como o principal órgão imunológico secundário com abundante IgM + células B maduras (BROMAGE et al., 2004; ZWOLLO et al., 2005; ZWOLLO et al., 2008). Além disso, nos peixes

o baço tem papel vital na hematopoese, na produção de anticorpos (MANNING; NAKANISHI, 1996) e captura de antígenos (PRESS; DANNEVIG; LANDSVERK, 1994).

Além dos órgãos linfóides citados acima, o fígado e timo dos peixes também possuem funções imunológicas, sendo o fígado o responsável pela produção de compostos humorais tais como, proteínas do sistema do complemento, produção de proteínas de fase aguda da resposta inflamatória (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014), mobilização de neutrófilos (KUM; SEKKIN, 2011) e produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (DASH et al., 2015; GRASSO et al., 2015). Já o timo, um órgão localizado próximo à cavidade opercular é responsável pela produção de linfócitos T envolvidos na estimulação da fagocitose, rejeição do aloenxerto e produção de anticorpos pelas células B (MANNING; NAKANISHI, 1996; BOWDEN; COOK; ROMBOUT, 2005; WHYTE, 2007).

Células pertencentes ao sistema imunológico como, neutrófilos, monócitos, trombócitos, células plasmáticas, células B, células T, células assassinas naturais (NK) e eosinófilos são encontradas tanto nos mamíferos, quanto nos peixes, uma vez que estas se originaram junto aos primeiros teleósteos (MANNING; NAKANISHI, 1996; SECOMBES, 1996; WHYTE, 2007).

Nos mamíferos, a ativação dos macrófagos é dividida em dois tipos (GORDON, 2003). A ativação clássica esta relacionada (macrófagos M1) com a imunidade celular através da produção das espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (EISENSTEIN et al., 1994; NATHAN; SHILOH, 2000). E a ativação alternativa dos macrófagos (macrófagos M2) que está relacionada com imunidade humoral, onde a enzima arginase aumenta a atividade fagocitária e a expressão dos genes do complexo principal de histocompatibilidade 2 (MHC de classe II) (JOERINK; SAVELKOUL; WIEGERTJES, 2006), que por sua vez, está relacionado com a apresentação de antígenos através da sua interação com células T e regular as respostas específicas das células B e T (BUONOCORE et al., 2007). Além disso, os macrófagos M2 também estão relacionados com

imunossupressão na proteção de órgãos e tecidos contra os efeitos citotóxicos das EROs (espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo) e óxido nítrico (NO) em inflamações crônicas (NOEL et al., 2004)

Dentro do ciclo ornitina-ureia (OUC), a enzima arginase é amplamente distribuída por todo o espectro evolutivo em organismos, tendo uma ampla distribuição nos tecidos de animais (JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996). Esta enzima participa da síntese da uréia nos animais ureotélicos, para a desintoxicação de amônia, onde é considerada como a última enzima do ciclo (OUC), sendo encontrada em concentração mais elevada no fígado (SRIVASTAVA; RATHA, 2013). São várias as isoformas da arginase já identificadas (ZAMECKA; POREMBSKA, 1988), entre elas, podem-se destacar as isoformas arginase 1 predominantemente encontrada no fígado, e arginase 2 encontrada no compartimento mitocondrial em tecidos não-hepáticas (ASH, 2004).

Uma das funções destas enzimas nos peixes está ligada a ativação alternativa dos macrófagos. Esta ativação nos peixes é feita pela arginase 2 que ao contrario dos mamíferos é realizada pela arginase 1 (WIEGERTJES; JOERINK, 2004). Os autores SIGH; LINDENSTROM; BUCHMANN (2004a) observaram uma alta expressão deste gene após a infecção de *I. multifiliis* em truta (*O. mykiss*). Além disso, alguns autores (YU et al., 2001; DA SILVA et al., 2002; VINCENDEAU et al., 2003) relataram que a atividade da arginase pode baixar drasticamente o nível de L-arginina no ambiente extracelular, dificultando assim a proliferação e manutenção das células de parasitas e do próprio hospedeiro. Já no ambiente intra-celular, a arginase também pode baixar os níveis de L-arginina ocasionando a diminuição do substrato de óxido nítrico sintetase (iNOS).

De acordo com estudos do JOERINK; SAVELKOUL; WIEGERTJES (2006), com carpas (*Cyprinus carpio* L.) imunizadas com LPS (lipopolisacarídeos), pode ser encontrada uma alta expressão nos rins da arginase 1, com maior nível após 6 h da infecção. Já a expressão da arginase

2 pode ser encontrada em todos os órgãos, porém, com uma maior expressão no fígado também 6 h após infecção. Resultados obtidos por GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN (2007) também demonstraram uma alta expressão do gene da arginase 2 no sangue nos períodos de 3, 12, 24, 36 e 48 horas após infecção experimental de carpas (*C. carpio* L.) com *I. multifiliis*.

Além dos macrófagos, podem-se destacar algumas citocinas que estão envolvidas na imunidade inata e imunidade adaptativa, onde a função principal destas, está relacionada em respostas de processos inflamatórios (ALVAREZ-PELLITERO, 2008). A IL-1 β é uma interleucina pró-inflamatória que possui diversos efeitos biológicos sistêmicos com um papel essencial na iniciação e regulação de respostas imunitárias e inflamatórias em mamíferos (DINARELLO, C. A., 1997), através da estimulação de macrófagos para a produção de COX-2, MHC classe II (HONG et al., 2001), necrose tumoral TNF- α e iNOS (ALVAREZ-PELLITERO, 2008; COVELLO et al., 2009; HARUN; WANG; SECOMBES, 2011). O aumento da síntese de citocinas derivadas de macrófagos realizadas pela IL1- β pode estimular a regulação, migração de leucócitos, aumento significativo da fagocitose e atividade bactericida de macrófagos (WU et al., 2015). Em experimento com peixes, foi observado um aumento na regulação de IL1- β a e IL1- β b no baço e rim anterior de *O. mykiss* após 6 h da imunização com o parasita *I. multifiliis* (SIGH; LINDENSTROM; BUCHMANN, 2004b).

A citocina TNF α é uma proteína produzida por várias células como macrófagos, monócitos, linfócitos T e B e linfócitos assassinas naturais (NK) (TRACEY; CERAMI, 1993). Esta citocina é considerada uma proteína transmembranar do tipo dois ou glicoproteína, que é clivada no domínio C-terminal extracelular para liberar um peptídeo maduro biologicamente ativo (SECOMBES et al., 2001). Nos mamíferos, o processo inflamatório desencadeia a liberação de citocinas sendo a TNF α liberado inicialmente, e em seguida a interleucina-1 β (IL- 1 β) e IL-6, as quais estão relacionadas

com a indução da migração de neutrófilos e macrófagos para o sítio de infecção (SECOMBES et al., 2001).

Estudos relacionados com TNF α de peixes, pesquisadores conseguiram identificar uma continua expressão deste gene em uma grande variedade de peixes como a truta arco-íris (*O. mykiss*) sendo observada alta expressão no rim anterior e nas brânquias, 4 h após a imunização com por LPS (LAING et al., 2001). Na carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) a expressão “in vitro” da TNF α utilizando culturas de células do rim anterior ocorreu 1 h, 3 h e 6 h após a serem infectadas com LPS (ZHANG et al., 2012). Na carpa comum (*C. carpio* L.) pode ser identificado um aumento gradativo da expressão da TNF α no sangue, atingindo seu maior nível as 48 h em peixes infectados com *I. multifiliis* (GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN, 2007). Além disso, pode ser observado que a atividade deste gene é semelhantes a dos mamíferos, sendo demonstrado em peixe-japonês onde ocorreu a indução da resposta quimiotática, fagocitose e produção de óxido nítrico pelos macrófagos (GRAYFER; BELOSEVIC, 2009). Em contrapartida, análises realizadas de TNF α recombinantes em dourada (*Sparus aurata*) não foi observado a explosão respiratória de macrófagos no rim anterior (ROCA et al., 2008). Sendo assim, pode-se observar que a atividade da TNF α é variada em diferentes espécies de peixes (ZHANG et al., 2012).

Além desses mecanismos pró-inflamatórios citados, a IL-8 se destaca como uma importante interleucina membro da família de quimiocinas CXC pró-inflamatórias, que medeiam respostas inflamatórias e imunitárias (KENDRICK et al., 2014), conhecidas pela atração de neutrófilos em mamíferos (SCAPINI et al., 2000), devido a participação na indução de agentes inflamatórios (MUKAIDA; HARADA; MATSUSHIMA, 1998). As quimiocinas CXC são pequenas proteínas com 8 a 12 kDa (ALLEN; CROWN; HANDEL, 2007). Definidas por 4 resíduos de cisteína, que formam ligações dissulfeto como parte da estrutura primária, e um domínio de três resíduos de aminoácidos, ELR antes da primeira cisteína (ELR + CXC) (COVELLO et al., 2009). Acredita-se

que o domínio ELR possui uma importante função na eficácia da IL-8, pois com uma alteração em qualquer um dos três aminoácidos pode desencadear uma diminuição drástica na capacidade de recrutar leucócitos, particularmente neutrófilos, para o local da inflamação (KIM et al., 2007). A IL-8 foi inicialmente caracterizada em lampreia (NAJAKSHIN et al., 1999) e mais recentemente descoberta em peixes cartilaginosos (INOUE et al., 2003), bem como em teleósteos (COVELLO et al., 2009). De acordo com WANG, G. L. et al. (2017) pode ser observado um aumento na expressão gênica da interleucina IL-8 de *Siniperca chuasti* após imunização com *Flavobacterium columnare*. Na pele de *I. punctatus* também pode ser notado um aumento da expressão da IL-8 após 6 dias da imunização com *I. multifiliis* (MOREIRA et al., 2017).

Vários estudos relacionados a susceptibilidade de peixes comerciais como truta do arco-íris (*O. mykiss*), carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), peixe zebra (*Danio rerio*), carpas comum (*Cyprinus carpio*) e catfish (*I. punctatus*) ao *I. multifiliis* vêm sendo desenvolvidos em todo mundo (CROSS; MATTHEWS, 1993; AIHUA; BUCHMANN, 2001; SIGH; LINDENSTROM; BUCHMANN, 2004b; JOERINK; SVELKOU; WIEGERTJES, 2006; YAO et al., 2010; VON GERSDORFF JORGENSEN, 2016; XU et al., 2016; MOREIRA et al., 2017). Entretanto, nada se conhece sobre a resposta imunológica à infecção por este parasita nos peixes de importância comercial no Brasil, como *P. corruscans* e *P. reticulatum*. Estes estudos que estão sendo proposto servirão de base para o conhecimento da resposta imune destes peixes frente a infecções por *I. multifiliis* podendo indicar medidas profiláticas para o controle do parasita, inclusive, no futuro desenvolvimento de controle para este parasita através de vacinas.

3. JUSTIFICATIVA

Dentro do gênero *Pseudoplatystoma* as espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*, possuem uma grande importância no contexto da pesca extrativista continental e, mais recentemente, têm sido introduzidos com grande sucesso na piscicultura. A inserção desta espécie na piscicultura vem demandando grandes esforços na adequação do manejo reprodutivo, nutricional e sanitário, sempre visando melhorar a produtividade.

A piscicultura é uma atividade produtiva e em franca expansão no Brasil, no entanto, para que esta prática se torne de fato uma opção segura e viável, é necessário enfatizar práticas de manejo sanitário, conhecimento de possíveis patógenos e suas interações com o hospedeiro, visto que estes, podem em sistemas de criação, propiciar sérios problemas para a atividade. Entre os agentes causadores de enfermidades em peixes, merece destaque o *I. multifiliis* que pode afetar peixes em ambientes naturais e também aqueles mantidos em sistemas de cultivo em várias partes do mundo. Em peixes criados principalmente nos sistemas intensivos e super intensivos, devido ao estresse causado pelo manejo e alimentação, ou ainda, pela qualidade da água, o problema ganha maior dimensão. Todavia, os avanços no estudo destes parasitas em peixes do Brasil não acompanharam o desenvolvimento do mercado de pescado e da piscicultura.

Para o controle das enfermidades que infectam os peixes vem sendo utilizado diversos produtos químicos, como o azul de metileno, o permanganato de potássio, o sulfato de cobre, o verde de malaquita e alguns antibióticos a base de cloranfenicol e oxitetraciclina. Além desses produtos terem um alto valor comercial, alguns possuem efeitos tóxicos, como o verde malaquita que pode colocar em risco o consumidor e ocasionar danos ao meio ambiente.

No Brasil, existem vários registros do parasitismo por *I. multifiliis* em uma variedade grande de peixes, mas as informações são restritas à sua identificação através das lesões sugestivas de pele e identificação das formas do parasita pela microscopia ótica. Com isso, informações a respeito da

resposta imunológica e alterações patogênicas são pouco conhecidas nos peixes nativos do Brasil e não existe nenhum estudo a respeito da resposta imune de peixes frente a este parasita, desta forma, estamos propondo uma pesquisa inédita no país onde serão utilizados pintado e cachara, peixes de alta expressão econômica. O estudo proposto caracteriza a resposta imune de peixes de alta importância econômica frente a um parasita causador de grandes perdas na piscicultura, o *I. multifiliis*, através da análise da expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no baço, fígado, rim anterior. Esperamos estes conhecimentos possam facilitar medidas profiláticas para o controle do parasita, inclusive no futuro o desenvolvimento de vacinas.

4. HIPÓTESE

Nas fases iniciais da imunização experimental com *I. multifilis* ocorre um aumento na expressão dos genes das isoformas 1 e 2 da enzima da arginase e de citocinas pró-inflamatórias IL1- β , IL-8 e TNF- α no baço, fígado e rim anterior dos peixes *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

5. OBJETIVO GERAL

Verificar a expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no baço, fígado e rim anterior das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* após imunização experimental com o parasita *I. multifiliis*.

5.1 Objetivos Específicos

- Isolamento do parasita *I. multifiliis* de peixes vivos com características da infecção pela presença de pontos brancos.
- Manutenção do parasita *I. multifiliis* através de passagens em peixes da espécie *P. corruscans* que nunca tiveram contato com o parasita.
- Obtenção da forma infectante (terontes) do parasita *I. multifiliis* mantidos através de passagens em peixes da espécie *P. corruscans*.
- Caracterizar por métodos moleculares (amplificação e sequenciamento do gene de ativação da recombinação 2 - Rag-2) as espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* que foram utilizados nas imunizações experimentais com parasita *I. multifiliis*.
- Realizar imunização dos peixes das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* com terontes do parasita *I. multifiliis*.
- Isolar e caracterizar parcialmente o cDNA dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α de *P. corruscans* e *P. reticulatum* e avaliar os níveis de expressão desses genes no baço, fígado e rim anterior dos peixes 6, 12, 18 e 24 horas após a imunização por terontes de *I. multifiliis*.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no laboratório de parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP, em colaboração com o Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP.

6.1 Qualidade da água

O manuseio animal deste experimento foi realizado em dois laboratórios. Sendo um localizado no CEPTA, onde foram realizadas as desovas e criações dos peixes utilizados neste estudo. Neste laboratório os peixes de *P. corruscans* e *P. reticulatum* foram mantidos em 2 caixas de 1000 L cada com sistema aberto (renovação contínua de água) (Figura 6). A água utilizada nestas caixas era procedente da represa que fazia irrigação de todos os tanques do CEPTA. Sendo assim houve a necessidade da utilização de 2 tipos de filtragens, onde o primeiro filtro (areia) retinha as partículas sólidas e o segundo filtro (lâmpada UV) tinha a finalidade de eliminar vírus, bactérias, parasitas e principalmente o protozoário *I. multifiliis*. A temperatura da água era mantida a uma temperatura de aproximadamente 23⁰C, através de aquecedores/termostatos e a oxigenação era realizada através de bombas e por meio de pedras porosas. Diariamente esses tanques de 1000 L eram esvaziados até a metade e limpos para a retirada dos restos de alimentos e peixes mortos. Nos primeiros 30 dias os alevinos foram alimentados diariamente com artêmia salina (ArtêmiaSalina do RN-Natal-RN) e depois com ovos de peixes e após os 60 dias com ração comercial destinada para alevinos carnívoros.

O segundo laboratório localizado na USP/FZEA (Figura 7) era composto por 14 aquários de 40 L sendo 10 destinados para imunização e 4 para manutenção do parasita. Estes aquários

possuíam um sistema semelhante ao do CEPTA, com a diferença que neste ao invés de lâmpada UV havia um filtro para retirada de impurezas e 3 filtros de carvão ativado para retirada do cloro da água, o qual é tóxico para os peixes. Para a oxigenação foram utilizadas 2 bombas de ar com pedra porosa. O controle de temperatura foi realizado por termostato individual em cada aquário. Este laboratório também contava com controle da luminosidade de 12h de luz por 12h de escuro realizado por um timer. Os parâmetros da água como pH, cloro, alcalinidade, Amônia, Nitrito, Oxigênio dissolvido e Dureza total foram aferidos no final do experimento.

Figura 6: Tanques com capacidade de 1000 L localizados no Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, utilizados para a manutenção de peixes das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Fonte: Própria autoria

Figura 7: Aquários localizados no laboratório de parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP destinados à imunização de *P. corruscans* e *P. reticulatum* com *I. multifiliis*.

Fonte: Própria autoria

6.2 Obtenção das espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum* em condições de laboratório.

Para a criação dos peixes deste experimento, foram realizadas desovas no CEPTA das matrizes de peixes das espécies *P. corruscans* (Figura 8) e *P. reticulatum* (Figura 9), que foram capturadas nos tanques com auxílio de redes (Figura 10). Todas as matrizes e 05 exemplares de cada espécie oriunda da desova foram caracterizadas geneticamente através da amplificação e sequenciamento do gene RAG2 (este método encontra-se descrito no item 2.3). Este procedimento foi realizado para garantir que as espécies eram geneticamente puras. Em pisciculturas ou até mesmo em ambiente natural espécimes considerados fenotipicamente como puras, foram identificadas como sendo híbridas entre as espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum* através de técnicas moleculares (VAINI et al., 2014).

Além da desova das espécies puras também foi realizada a produção de peixes híbridos através do cruzamento de machos de *P. corruscans* com fêmeas *P. reticulatum*, e vice-versa, ou seja, fêmea de *P. corruscans* com machos de *P. reticulatum*.

Figura 8: Exemplares de pintado (*P. corruscans*), capturado nos tanques do Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, que foram utilizados nas desovas.

Fonte: Própria autoria

Figura 9: Exemplares de cachara (*P. reticulatum*), capturada no tanque do Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, que foram utilizados nas desovas.

Fonte: Própria autoria

Figura 10: Captura de peixes adultos da espécie *P. corruscans* e *P. reticulatum*, mantido no Centro de Nacional de Gestão em Pesquisa e Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, para realização das desovas e obtenção de alevinos.

Fonte: Própria autoria

6.3 Caracterização molecular de alevinos de *P. corruscans* e *P. reticulatum* e do peixe híbrido através da amplificação do gene RAG 2.

As espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum* vêm sendo cruzadas na piscicultura devido a um custo mais baixo na produção, a precocidade e docilidade dos híbridos em relação às raças puras (CARVALHO et al., 2008). Porém, fuga do híbrido interespecífico "Surubim" para o ambiente natural, juntamente com a falta de mecanismos para sua identificação, pode reduzir a integridade genética de espécies parentais puras, pois híbrido é fértil e pode cruzar com seus parentais puros, causando introgressão gênica (MARQUES, 2002; PORTO-FORESTI et al., 2008).

Sendo assim se fez necessário realizar a genotipagem dos peixes *P. corruscans* e *P. reticulatum* que foi feita como descrito por (DO PRADO et al., 2011) com algumas modificações. Amostragem da nadadeira caudal de 05 alevinos de cada espécie foram coletadas, para a extração de DNA e realização da amplificação do gene RAG2 através da reação de PCR convencional. A extração de DNA para a realização das reações de PCR convencional foi realizada utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Após a extração o DNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) a 260 e 280 nm (A260/A280) e amostras com valores próximos a 1,8 foram consideradas puras.

A amplificação do gene RAG2 foi realizada utilizando os *primers* descritos por DO PRADO et al. (2011) e VAINI et al. (2014) (Tabela 1). As reações foram realizadas com um volume total de 25µl, os quais consistiram de 150 µM de dNTP, 3,0 mM de MgCl₂, 0,1 a 0,4 µM de cada primer, 0,25 U Taq DNA polimerase, tampão 1x Taq DNA polymerase, 40 ng de DNA e H₂O MiliQ realizadas em termociclador AG 22331 Hamburg (Eppendorf). A termociclagem utilizado na amplificação consistia de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação (95°C por 30s), hibridização (55°C por 45s), extensão (72°C por 15s) e finalizado com um etapa de extensão a 72°C por 5 min. Em seguida este material foi submetido à eletroforese junto com o padrão de pares de base (1Kb DNA Ladder Invitrogen®) em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE (0,045 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA pH 8.0), corados com SYBER SAFE DNA GEL STAIN (Invitrogen®) e analisados em transiluminador. Os *amplicons* foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e sequenciados utilizando-se o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, EUA) utilizando-se os mesmos *primers* usados nas reações de amplificação. Em seguida os fragmentos do gene RAG2 foram visualizadas, montadas

e editadas com o programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999). Para cada sequência, foi realizada uma busca através da ferramenta nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) no website do National Center for Biotechnology Information (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmação da amplificação genica.

As sequências parciais do gene RAG 2 obtidas para cada espécie foram alinhadas e comparadas no NCBI em buscas de *locus* específicos para cada espécie identificadas como espécies puras conforme resultado obtidos por DO PRADO et al. (2011); VAINI et al. (2014).

Tabela 1: *Primers* utilizados na reação de PCR para a caracterização gênica de alevinos das espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum* e dos híbridos, através da amplificação do gene RAG2.

<i>Primers</i>	Sequências
*RAG2 SiluF	5'-CCTGAGTGCTACCTTATTCATGGA -3'
*RAG2 SiluR	5'-CTTGGGAGGAAGAGACCATC -3'

6.4 Obtenção e manutenção de *I. multifiliis*

I. multifiliis foram obtidos através de 10 peixes lesebistes (*Poecilia reticulata*) que apresentavam sinais da doença (pontos brancos) de uma petshop. Estes peixes foram colocados em 1 aquário juntamente com 4 exemplares de peixes da espécie *P. corruscans* com tamanho de $17 \pm 1,1$ cm proveniente da desova realizada no CEPTA e que não apresentavam sinais de infecção pelo *I. multifiliis*. Após 6 dias foi constatado que o parasita *I. multifiliis* havia passado dos lesebistes (*P. reticulata*) para *P. corruscans*, através da presença de pontos brancos distribuídos por todo o hospedeiro. Estes animais infectados foram então divididos em outros 4 aquários (Figura 11) (ou seja 1 em peixe infectado por aquário) e foi adicionado mais 4 peixes *P. corruscans* sem sinais de

infecção pelo parasita em cada aquário. Conforme os peixes morriam devido a infecção, novos peixes eram adicionados aos aquários para manutenção do parasita.

Para obter as formas infectante (terontes) de *I. multifiliis* 3 peixes da espécie *P. corruscans* que apresentavam sinais da infecção (pontos brancos) foram eutanasiados através da secção da coluna cervical. Em seguida a pele foi cuidadosamente raspada diversas vezes, com o auxílio de uma lamínula e lavada em 100 ml de água sem cloro. A água contendo trofontes foi filtrada com o auxílio de uma tamize de 500 µm para a retenção do muco dos peixes. Esta água foi então transferida para 2 placas de petri as quais foram mantidas em estufa BOD a temperatura de 23⁰C. Após 18 a 24 h ocorreu à eclosão dos terontes que foram filtrados com auxílio de uma tamize, com poro de diâmetro de até 40 µm para a remoção dos detritos. Para a concentração dos terontes o líquido contendo os parasitas foi centrifugado a 300g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida os terontes foram contados em 5 gotas de 10 µl com auxílio da câmara de Sedgewick–Rafter que tinha como objetivo a padronização do inóculo para de terontes de *I. multifiliis* para a realização da infecção experimental como descrito por XU; KLESIUS (2013).

Figura 11: Aquários localizados no laboratório de parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP destinados à manutenção do protozoário *I. multifiliis*.

Fonte: Própria autoria

6.5 Imunização de *P. corruscans* e *P. reticulatum* através da injeção de terontes de *I. multifiliis* e coleta de tecidos para a análise da expressão genica.

As imunizações das duas espécies utilizadas neste experimento foram realizadas separadamente, sendo inicialmente realizada com *P. corruscans* com tamanho de $17,45 \pm 1,1$ cm e em seguida com *P. reticulatum* com tamanho de $15 \pm 0,8$ cm. Para ambas as espécies o procedimento descrito abaixo foi o mesmo: 40 exemplares de peixes foram transferidos das caixas de 1000 L do CEPTA para 8 aquários de 40 litros no laboratório situado na USP (Figura 7). Os animais foram aclimatizados por aproximadamente 15 dias. Após este período foi realizada a imunização dos peixes dos aquários 1 a 4 (grupo imunizado) que receberam injeção intraperitoneal de 200 µl para *P. corruscans* e 600 µl *P. reticulatum* contendo aproximadamente 12.000 terontes. Os peixes dos aquários 5 a 8 (grupo controle) receberam uma injeção intraperitoneal de solução fisiológica estéril de NaCl a 0,9% na mesma quantidade.

A coleta das amostras dos tecidos do baço, fígado e rim anterior de ambas as espécies de peixes foram realizadas nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas após as imunizações, onde 5

exemplares de ambos os grupos imunizado e controle foram eutanasiados mediante transecção da coluna vertebral. As amostras dos tecidos coletados foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e em seguida foram armazenadas a 80 graus negativo para a posterior extração de RNA.

6.6 Extração de RNA para caracterização, parcial dos cDNA dos genes (arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α), e análise de PCR em tempo real.

As extrações de RNA para caracterização, parcial dos cDNA dos genes avaliados neste experimento foram realizadas com amostras do fígado de *P. corruscans* capturado no rio São Francisco, Minas Gerais, e de *P. reticulatum* procedentes do CEPTA. Para análise da expressão gênica, foi realizada a extração de RNA de amostras dos tecidos do baço, fígado e rim cranial de *P. corruscans* e *P. reticulatum* coletados nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas após injeções peritoneais dos grupos de imunizado e controle. As extrações foram realizadas com o reagente TRIzol® (Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante. As rupturas dos tecidos foram feitas através de maceração em um microtubo de 1,5mL com pistilos estéreis. A quantidade de RNA foi aferida pelo NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) através da leitura de absorbância a 260 nm, e sua pureza foi determinada calculando-se a razão das absorbâncias medidas a 260 e 280 nm (razão 260/280). Razões 260/280 próximas de 2,0 foram consideradas com grau de pureza aceitável. Para verificar a integridade dos RNAs, eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE foi realizada a fim de verificar a ocorrência de duas bandas claras e bem definidas que representavam as subunidades 18S e 28S do rRNA, indicando que os mRNAs não estavam degradados.

6.7 Síntese do cDNA para caracterização, parcial dos cDNA dos genes (arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α), e análise de PCR em tempo real.

Inicialmente o RNA obtido foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) a fim de diminuir a influência de uma possível contaminação por DNA genômico (gDNA) nas reações de qPCR. Em seguida foi produzida a primeira fita de cDNA utilizando 1 μ g do RNA total, com *primer* Oligo-dT15 (500mg/ μ l) através do Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription KitTM (Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante. O programa de termociclador utilizado nesta reação foi de 25⁰C por 10min, 37⁰C por 2h e finalizado a 85⁰C por 5 min.

6.8 Desenho de *primers* para caracterização, parcial dos cDNA dos genes arginase 1, arginase 2, IL-1 β , IL-8 e TNF α .

Devido a inexistência na literatura da caracterização dos genes das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* os *primers* utilizados para amplificação inicial foram obtidos a partir de regiões homologas das sequências de outras espécies de peixes disponíveis no GenBank. Para o gene arginase 1, as sequências foram alinhadas pelo programa ClustalW inserido no BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999), e os *primers* foram desenhados em regiões aparentemente conservadas do gene. Para o gene arginase 2, os *primers* forma construídos utilizando como base descrição de JOERINK; SAVELKOUL; WIEGERTJES (2006). Para obtenção das sequências parciais dos genes IL 1- β , IL-8 e TNF α , foi feita uma colaboração Dr. Alexandre Rodrigues Caetano, pesquisador da Embrapa recursos genéticos e biotecnologia que vem trabalhando no sequenciamento de genomas e transcriptomas de peixes de importância econômica do Brasil, dentre eles *P. reticulatum*. Embora a montagem final do transcriptomas de *P. reticulatum* ainda não esteja concluída, foi possível utilizar este banco de dados para realizar uma busca de fragmentos dos genes IL1- β , IL-8 e TNF α ,

por homologia com *Ictalurus punctatus* para IL 1- β , *Carassius auratus* para IL-8 e *Cyprinus carpio* para TNF α . Estas sequências foram editadas para a remoção dos íntrons utilizando-se o programa GenomeScan (YEH; LIM; BURGE, 2001). Após a obtenção das sequências através do transcriptoma foi realizado o desenho de *primers* utilizando o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para a amplificação destes genes. Os *primers* e seus respectivos tamanhos dos fragmentos desejados encontram na tabela 2.

Para amplificação dos genes foi utilizado o cDNA com um programa de termociclagem, que consistia em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5min seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 60s), hibridização (54°C para arginase 1 por 60s, 58°C para arginase 2 por 60s, 52°C para TNF- α por 60s, 59°C para IL-1 β por 60s e 63°C para IL-8 por 60s), extensão (72°C por 60s) e finalizado com um etapa de extensão a 72°C por 5min. Após a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese, purificados, sequenciados e comparados pelo Blast (blastn) no Genbank como descrito no item 2.3.

Após a obtenção das sequências parciais dos genes se procedeu o desenho de novos *primers* (Tabela 3) para PCR em tempo real dos genes arginase 1, arginase 2, TNF α , IL 1- β e IL-8 e TNF α , utilizando também o programa Primer Blast. Para confirma a especificidade dos primer desenhados estes foram submetidos a PCR convencional com um programa de termociclagem semelhante ao descrito acima com diferença que para hibridização do primer foi utilizado 60°C para todos genes. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese, purificados, sequenciados e comparados pelo Blast (blastn) no Genbank também como descrito no item 2.3.

Tabela 2: *Primers* utilizados na reação de PCR convencional para caracterização parcial dos genes da arginase 1, arginase 2, TNF- α , IL1- β e IL-8 a partir de fígado de *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Sequências dos <i>primers</i>	Gene amplificado	Tamanho do fragmento (*PB)	Referência
F-AGCATGAACTGCAGGATGGTT R-CAGGGTGAATGGTTTGCCATAA	IL-8	278	Neste Estudo
F-TGCGTAGCGGCCTTTACTTC R- CACTCTCCACGTTAGGCAGC	TNF- α	303	Neste Estudo
F- GCTGGACTGCTCTGATCCTT R- TGGAGTATAGGCCGAGAGGT	IL1- β	400	Neste Estudo
F-CGATCCATGGTCATGCAGCCT R-GGGATTTTGTAATCAGCTGGGTG	arginase 1	630	Neste Estudo
F- GTTTGTTCCGCTCGGCTCTG R- GTTCGCTTTGCGATCCTGAG	arginase 2	1000	Neste Estudo

Fonte: Pró

Tabela 3: *Primers* utilizados na reação de PCR em tempo real (qPCR), para a quantificação dos genes arginase 1, arginase 2, TNF- α , IL1- β e IL-8 a partir de amostras obtidas do baço, fígado e rim cranial de *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Sequência dos <i>primers</i>	Gene amplificado	Tamanho do fragmento esperado (PB)	Referência
F-AGCAGGAATGACTGTTGAGCC R-ATCTCAGTGTGTGTGCAGTGT	IL-8	120	Neste Estudo
F-TGTCTCGCTGGTCAGATTCC R-CAGGTTGAATGCAGCTCCGA	TNF- α	134	Neste Estudo
F- ACATGCGCTGTGTTGCTAATG R-TCAAATCGACCACCATGCTCT	IL1- β	144	Neste Estudo
F- TATGATGTTGACGCCCTGGAC R- CATCAATAGCAGACAGGAGCC	arginase 1	133	Neste Estudo
F-CACCCATGACATCACCGTCT R-TCCACATCTCTCAGGCCGAT	arginase 2	175	Neste Estudo
F-CCTGCGGCTTAATTTGACTC R-CTGTCAATCCTGTCCGTGTC	18S	45pb	(BREISSAN et al., 2011)

6.9 Tradução da sequência de nucleotídeos em aminoácidos dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8, TNF- α .

As sequência de RNA da arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8, TNF- α que foram amplificadas corretamente a partir do cDNA utilizando os *primers* desenhados neste experimento, foram traduzidas para aminoácidos através do programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999). O qual foram comparados com outras sequências de aminoácidos através do programa BLAST (N) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) para pesquisa de sequências semelhantes. Para a busca das assinaturas da família, resíduos e domínios específicos para cada proteína analisada neste experimento foi utilizado o programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) através da comparação com outras sequências de peixes e humanos depositadas no GenBank.

6.10 Padronização e quantificação gênica através do PCR em tempo real, a partir de RNA extraído do fígado, baço e rim cranial de *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

As padronizações do primers foram realizadas com RNA total do fígado para arginase 1 e baço para arginase 2, IL1- β , IL-8, TNF- α , e 18s primer universais para eucariotos descrito por BRESSAN et al. (2011). A eficiência dos pares de primers, tanto dos genes alvos quanto dos controles endógenos, foi calculada a partir de curva padrão realizada com 5 diluições seriadas de 1:3 de cDNA e com uma concentração de 0,09 mmol de cada primer seguindo a fórmula $E=10(-1/\text{slope})$. Todos primers utilizadas neste estudo apresentaram eficiências entre 92 e 110%. Para as análises de expressão, foram utilizados os cDNAs de 5 peixes de cada grupo (imunizados e controle) em cada um dos 4 períodos pós-infecção (6, 12, 18, 24 h). Para o baço de *P. corruscans* as análises foram realizadas apenas com 3 amostras dos peixes para ambos os grupos (imunizados e controle) devido a degradação do RNA.

As reações de qPCR foram realizadas em duplicata com um volume final de 10 μ L contendo 5 μ L de GoTaq® Real-Time qPCR (Promega), 0,09 μ M de cada primer, 16 ng de cDNA e água ultrapura para completar o volume final de 10 μ L. Foi utilizado o modo de ciclagem, que consistiu de 2 minutos a 50°C para ativação da enzima uracil-DNA glycosylase (UDG), 10 minutos a 95°C de desnaturação inicial e ativação da DNA polimerase, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 60s, no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para verificar a presença de produtos inespecíficos ou possíveis contaminações, reações controle sem cDNA foram realizadas em cada análise de qPCR. Imediatamente após cada etapa de amplificação, foi realizada uma curva de dissociação dos produtos obtidos para verificar a ocorrência de ligação inespecífica ou dímeros dos primers, utilizando uma taxa de elevação de temperatura de 0,5°C/30s entre 55-95°C. Para calcular a expressão relativa pelo algoritmo $2^{-\Delta Ct}$ os dados dos ciclos no qual as reações atingiram o limiar da fase exponencial ou Threshold Cycle (Ct) nas reações de qPCR dos genes alvo (arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α) foram normalizados (ΔCt) pelos Cts do gene de referência endógeno (18S rRNA).

6.11 Análise Estatística

As análises de expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α , em cada órgão obtidos nos grupos imunizados em relação ao grupo controle em cada um dos períodos foram realizadas de forma isolada. O efeito do tempo dentro de cada grupo não foi considerado, uma vez que já foi demonstrado, que injeção de solução salina estéril realizada no grupo controle, pode ocasionar uma alteração da expressão de citocinas pró-inflamatórias (NGUYEN-CHI et al., 2015), o que poderia interferir na expressão dos genes em análise no presente trabalho. Os valores da expressão normalizada dos genes alvo ($2^{-\Delta Ct}$) foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA)

e as médias foram então comparadas pelo teste t de Student para testar diferenças significativas de expressão entre os peixes imunizados e controle utilizando o programa SAS® University Edition. Os gráficos foram montados com auxílio do programa Graphpad Prism 5.01 (Graphpad Software, CA, USA). Em todas as análises estatísticas o nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

7. RESULTADOS

7.1 Qualidade da água

Os parâmetros da água dos aquários onde estavam mantidos os grupos de peixes imunizados e grupo controle, foram avaliados após a última coleta (24 h). Para os pintados *P. corruscans* os valores foram: pH: $6,8 \pm 0$, cloro: 0 ± 0 , temperatura: $26 \pm 0,9$ °C, oxigênio: $6 \pm 1,6$ mg/L, amônia: $0,0012 \pm 0,0005$ mg/L, nitrato: concentração abaixo do detectado. Para cachara *P. reticulatum* os valores foram: pH: $6,8 \pm 0$, cloro: 0 ± 0 , temperatura: $25 \pm 0,8$ °C, oxigênio: $7 \pm 1,0$ mg/L, amônia: $0,0016 \pm 0,0005$ mg/L, nitrato: concentração abaixo do detectado

7.2 Obtenção da forma infectante de *I. multifiliis*

A manutenção do protozoário *I. multifiliis* foi realizada em pintados (*P. corruscans*) de aproximadamente 17 cm obtidos de desovas no laboratório do CEPTA que não tiveram contato com o parasita. Portanto, a utilização destes animais para a manutenção do parasita resultou na obtenção de um número expressivo de peixes infectados, constatada através da formação de diversos pontos brancos (mais de 20 por cm²) disseminados por toda extensão do corpo do hospedeiro (Figura 12). Raspados da pele destes, resultaram na obtenção de grande número de trofontes (Figura 13 A), a partir dos quais foram obtidos terontes (Figura 13 B), utilizados na preparação de inóculos para a imunização dos peixes *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Figura 12: Exemplares de pintado (*P. corruscans*) oriundos da desova realizada no Centro de Nacional de Gestão em Pesquisa e Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, infectados por coabitação com lebstes (*P. reticulata*) naturalmente parasitados adquiridos em uma petshop.

Fonte: Própria autoria

Figura 13. A= Trofonte. B= Teronte. Fases do protozoários *I. multifiliis* obtidos a partir de raspado de pintado (*P. corruscans*) infectados por coabitação no laboratório de parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP.

Fonte: Própria autoria

7.3 Caracterização molecular das espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Através da amplificação parcial do gene RAG2 foi possível obter sequências com aproximadamente 500 pb para as espécies de peixes obtidas das desovas realizadas no CEPTA/ICMBio. Esses fragmentos se mostraram homogêneos para cada grupo, o que era esperado, considerado que os animais eram todos provenientes de uma única desova. Após a confirmação da amplificação do RAG2 pelo site NCBI foi possível identificar diferenças entre as espécies estudadas (Figura 14 a 17). Sendo observado que em três posições, a espécie *P. corruscans* possuíam as bases guanina, adenina e citosina (Figura 14 e 17) enquanto, que a espécie *P. reticulatum* tinham as bases adenina, citosina e guanina (Figura 15 e 17) nas mesmas posições. Já no sequenciamento do peixe híbrido (obtidos do cruzamento entre as espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum*) foi observada a presença de um alelo de cada uma das espécies (Figura 16). Demonstrando assim que os peixes híbridos são heterozigotos neste *locus*.

Estes resultados mostram que temos um alto grau de confiança de estarmos avaliando a expressão gênica em espécies corretamente identificadas, não apenas nos baseando em características fenotípicas, uma vez que é extremamente difícil identificar espécies puras de pintados e cacharas utilizando apenas características morfológicas.

Figura 14: Eletroferograma obtido do sequenciamento do gene RAG2 do pintado (*P. corruscans*) onde pode-ser observado a presença das bases nitrogenadas guanina, adenina e citosina com um único pico, indicando homozigose.

Fonte: Própria autoria

Figura 15: Eletroferograma obtido do sequenciamento do gene RAG2 do cachara (*P. reticulatum*) onde pode-ser observado a presença das bases nitrogenadas adenina, citosina e guanina com um único pico, indicando homozigose.

Fonte: Própria autoria

Figura 16: Eletroferograma obtidos do sequenciamento do gene RAG2 do híbrido, entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* onde pode-se observar os locais de substituição de nucleotídeos entre as espécies puras e a presença de dois picos no sequenciamento da espécie híbrida, indicando a ocorrência de heterozigose.

Fonte: Própria autoria

Figura 17: Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene RAG2 obtidas de alevinos de pintado (*P. corruscans*) e cachara (*P. reticulatum*) e seu híbrido, onde é observado os locais de substituição de nucleotídeos entre as espécies puras e o peixe híbrido. Indicado a homozigose para os puros e heterozigose para os híbridos. Asterisco (*) indicam bases idênticas.

Pintado	-----CCCAACAACGAGCTGTCTCGAGCCTC	27
Hibrido	-----TCCTTATTCATGGAGGCCGAACACCCAACAACGAGCTGTCTCGAGCCTC	50
Cachara	CCTGAGTGCTACCTTATTCATGGAGGCCGAACACCCAACAACGAGCTGTCTCGAGCCTC	60

Pintado	TACATACTAAATGTTGACAATCGTGGATGTAATCGGAAGGTCACACTGAGATGCCAGGAG	87
Hibrido	TACATACTAAATGTTGACAATCGTGGATGTAATCGGAAGGTCACACTGAGATGCCAGGAG	110
Cachara	TACATACTAAATGTTGACAATCGTGGATGTAATCGGAAGGTCACACTGAGATGCCAGGAG	120

Pintado	AAAGAGTTGGTCGGTGAACCTCCAGAAGCGCGGTATGGACACACCCTTAGCGTAGTCCAC	147
Hibrido	AAAGAGTTGGTCGGTGAACCTCCAGAAGCGCGGTATGGACACACCCTTAGCGTAGTCCAC	170
Cachara	AAAGAGTTGGTCGGTGAACCTCCAGAAGCGCGGTATGGACACACCCTTAGCGTAGTCCAC	180

Pintado	AGCAGAGGCAAAAGCGCCTGTGTTCTGTTTGGTGGCAGATCCTACATGCCTGCTTCTGAG	207
Hibrido	AGCAGAGGCAAAAGCGCCTGTGTTCTGTTTGGTGGCAGATCCTACATGCCTGCTTCTGAG	230
Cachara	AGCAGAGGCAAAAGCGCCTGTGTTCTGTTTGGTGGCAGATCCTACATGCCTGCTTCTGAG	240

Pintado	CGGACCACAGAGACTGGAACCTGCATGGTGGACTGTCCACCCCAATTATCTCATTGAC	267
Hibrido	CGNACCACAGAGANCTGGAACCTGCATGGTGGACTGTCCACCCCANATTATCTCATTGAC	290
Cachara	CGAACCACAGAGACCTGGAACCTGCATGGTGGACTGTCCACCCAGATTATCTCATTGAC	300
	** *****	
Pintado	CTGGAGTTTGGCTGCTCTTCAGCGCACACCCTCCCAGAGCTCACTGACGGCCAGTCATTC	327
Hibrido	CTGGAGTTTGGCTGCTCTTCAGCGCACACCCTCCCAGAGCTCACTGACGGCCAGTCATTC	350
Cachara	CTGGAGTTTGGCTGCTCTTCAGCGCACACCCTCCCAGAGCTCACTGACGGCCAGTCATTC	360

Pintado	CACATAGCACTGGCACGAGAGGACTGCGTCTACTTCTTGGGTGGCCACATCGCGTCTACT	387
Hibrido	CACATAGCACTGGCACGAGAGGACTGCGTCTACTTCTTGGGTGGCCACATCGCGTCTACT	410
Cachara	CACATAGCACTGGCACGAGAGGACTGCGTCTACTTCTTGGGTGGCCACATCGCGTCTACT	420

Pintado	GACTGCCGACCACCTCGCCTGTTTCAGGCTGCGTGTAGAGCTTCTTTTAGGCAGTCCATTA	447
Hibrido	GACTGCCGACCACCTCGCCTGTTTCAGGCTGCGTGTAGAGCTTCTTTTAGGCAGTCCATTA	470
Cachara	GACTGCCGACCACCTCGCCTGTT-----	443

Pintado	CTCTCCTGTGAGATCCTTAATGATGGTCTCTTCCTCCCAAGA	489
Hibrido	CTCTCCTGTGAGATCCTTAATGATGGTCTCTTCCTCCCAAGA	512
Cachara	-----	443

Fonte: Própria autoria

7.4 Identificação dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α .

As análises de amplificação e sequenciamento dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α resultaram em sequências com aproximadamente 530, 815, 400, 280 e 300 pb respectivamente (Fig 18 a 22) de *P. corruscans* e *P. reticulatum*. Na comparação com outras sequências depositadas no GenBank através da busca BLAST, foi observado uma identidade de 93% para arginase 1, 90% para arginase 2, 87% para IL1- β e 81% para TNF α com sequências de *I. punctatus* sob o número de acesso XM 017483579, XM 017464637, AJ586102, AJ345097 respectivamente. O gene da IL-8 foi o único que teve a maior identidade com a espécie *Astyanax mexicanus* com número de acesso XM 007229283.

Somente após esta confirmação foi realizado a construção de *primers* para a reação de tempo real (qPCR), como mostra a tabela 3. Os quais também foram sequenciados, onde foi observado que estes fragmentos possuíam homologia com as sequências já identificadas. Os fragmentos podem ser identificados nas figuras de 18 a 22 onde arginase 1 esta localizada entre 363 à 495 pb, arginase 2 entre 364 à 520 pb, IL-1 β entre 88 à 231 pb, IL-8 entre 58 à 177 pb e TNF α entre 106 à 239 pb.

Devido a alta similaridade entre as sequências de *P. corruscans* e *P. reticulatum* obtidas neste experimento, as figuras 18 à 22 mostram somente sequência de *P. corruscans*.

Figura 18: Sequência parcial do gene arginase 1 obtida a partir do cDNA de fígado de *P. corruscans*, através da amplificação utilizando os *primers* para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os *primers* para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014).

```

TCATGCAGCCTGCAGACCTGAGCTGGGTGTGGTGTGGGTGGATGCCCATGCTGACATCAACACACCTCTAACCCTCCGACAGGAACACATCCACGG
12 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96

GCAACCCATGTCCTACCTTATCCGTGAACTGTCCACTAAGATTCCCTGCCTTGCCAAACTTCTCATGGATCAAGCCTTGCCATAGCAGCAAAAGATATA
98 100 102 104 106 108 110 112 114 116 118 120 122 124 126 128 130 132 134 136 138 140 142 144 146 148 150 152 154 156 158 160 162 164 166 168 170 172 174 176 178 180 182 184 186 188 190 194

GTGTACATTGGACTCAGAGATGTAGACCCAGAGGAACACTACATCCTGAAACACCTGGGTATTAAGACTTCTCTATGACAGAGGTAGACAGTCTTG
196 198 200 202 204 206 208 210 212 214 216 218 220 222 224 226 228 230 232 234 236 238 240 242 244 246 248 250 252 254 256 258 260 262 264 266 268 270 272 274 276 278 280 282 284 286 288 290 292

GAATTGCCAAGGTTATGGAACAGACATGTGATCATATATTTTCAAAGATAAAAAAAAAACATCCACCTGAGTATGATGTTGACGCCCTGGACCCCTC
294 296 298 300 302 304 306 308 310 312 314 316 318 320 322 324 326 328 330 332 334 336 338 340 342 344 346 348 350 352 354 356 358 360 362 364 366 368 370 372 374 376 378 380 382 384 386 388

AGTGACACCAGCTACAGGGACGCCAGTGATAGGAGGCTTGACATACAGAGAGGGCATCTACATCACTGAGTATGTGTGTCAAACAGGGCTCCTGCTC
390 392 394 396 398 400 402 404 406 408 410 412 414 416 418 420 422 424 426 428 430 432 434 436 438 440 442 444 446 448 450 452 454 456 458 460 462 464 466 468 470 472 474 476 478 480 482 484 486 488 490 492 494 496 498 500 502 504 506 508 510 512 514 516 518 520 522 524 526 528 530 532 534 536 538 540 542 544 546 548 550 552 554 556 558 560 562 564 566 568 570 572 574 576 578 580 582 584 586 588 590 592 594 596 598 600 602 604 606 608 610 612 614 616 618 620 622 624 626 628 630 632 634 636 638 640 642 644 646 648 650 652 654 656 658 660 662 664 666 668 670 672 674 676 678 680 682 684 686 688 690 692 694 696 698 700 702 704 706 708 710 712 714 716 718 720 722 724 726 728 730 732 734 736 738 740 742 744 746 748 750 752 754 756 758 760 762 764 766 768 770 772 774 776 778 780 782 784 786 788 790 792 794 796 798 800 802 804 806 808 810 812 814 816 818 820 822 824 826 828 830 832 834 836 838 840 842 844 846 848 850 852 854 856 858 860 862 864 866 868 870 872 874 876 878 880 882 884 886 888 890 892 894 896 898 900 902 904 906 908 910 912 914 916 918 920 922 924 926 928 930 932 934 936 938 940 942 944 946 948 950 952 954 956 958 960 962 964 966 968 970 972 974 976 978 980 982 984 986 988 990 992 994 996 998 1000

GCTATTGATGTCGTGGAGGTGAACCCAAAGCGAGCCAAAAGA
486 490 492 494 496 498 500 502 504 506 508 510 512 514 516 518 520 522 524 526 528 530 532 534 536 538 540 542 544 546 548 550 552 554 556 558 560 562 564 566 568 570 572 574 576 578 580 582 584 586 588 590 592 594 596 598 600 602 604 606 608 610 612 614 616 618 620 622 624 626 628 630 632 634 636 638 640 642 644 646 648 650 652 654 656 658 660 662 664 666 668 670 672 674 676 678 680 682 684 686 688 690 692 694 696 698 700 702 704 706 708 710 712 714 716 718 720 722 724 726 728 730 732 734 736 738 740 742 744 746 748 750 752 754 756 758 760 762 764 766 768 770 772 774 776 778 780 782 784 786 788 790 792 794 796 798 800 802 804 806 808 810 812 814 816 818 820 822 824 826 828 830 832 834 836 838 840 842 844 846 848 850 852 854 856 858 860 862 864 866 868 870 872 874 876 878 880 882 884 886 888 890 892 894 896 898 900 902 904 906 908 910 912 914 916 918 920 922 924 926 928 930 932 934 936 938 940 942 944 946 948 950 952 954 956 958 960 962 964 966 968 970 972 974 976 978 980 982 984 986 988 990 992 994 996 998 1000

```

Fonte: Própria autoria

Figura 19: Sequência parcial do gene arginase 2 obtida a partir do cDNA de fígado de *P. corruscans*, através da amplificação utilizando os *primers* para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os *primers* para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014).

```

TGTCGGAGCTCCGATTCTCCAAAGGACAGAAAAGGAGAGGAGTGGAGCTCGGACCCAAAGCCATCAGAGACGCCGGCTTGGTGGAGAGACTGACCAG
12  4  6  8  10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 97

CTTGGAATGCTGTGCATGATTTTGGAGACCTGAGTTTCGAGCACTCGGAGGAAGATGACAGATTTCATGAACGTACCCTTCCCACGCACCGTGGGA
98 100 102 104 106 108 110 112 114 116 118 120 122 124 126 128 130 132 134 136 138 140 142 144 146 148 150 152 154 156 158 160 162 164 166 168 170 172 174 176 178 180 182 184 186 188 190 194

CGAGCCAATCAGATTCTGTGGATGCCATGAGCAGAGCGGTGGGGTGGGCCATACGGCTGTCTAGGAGGAGATCAGAGCTTGGCCATTGGTT
195 198 200 202 204 206 208 210 212 214 216 218 220 222 224 226 228 230 232 234 236 238 240 242 244 246 248 250 252 254 256 258 260 262 264 266 268 270 272 274 276 278 280 282 284 286 288 291

CAGTCGAGGCCATGCCAACAGCGTCCGGATCTTTGTCTGATTGGGTTGAGCGCCATGCTGACATTAAACACCCCATGACATCACCGTCTGGAAA
292 296 298 300 302 304 306 308 310 312 314 316 318 320 322 324 326 328 330 332 334 336 338 340 342 344 346 348 350 352 354 356 358 360 362 364 366 368 370 372 374 376 378 380 382 384 386 388

CCTCCATGGCCAGCCAGTCGCGTTTCATGCTCAAAGAGCTGCAGGACAAGATGCCAGCAGTTCCTGGATTCTCCTGGATGAAACCATTCCTCACAGCA
389 392 394 396 398 400 402 404 406 408 410 412 414 416 418 420 422 424 426 428 430 432 434 436 438 440 442 444 446 448 450 452 454 456 458 460 462 464 466 468 470 472 474 476 478 480 482 484 486 488 490 492 494 496 498 500 502 504 506 508 510 512 514 516 518 520 522 524 526 528 530 532 534 536 538 540 542 544 546 548 550 552 554 556 558 560 562 564 566 568 570 572 574 576 578 580 582 584 586 588 590 592 594 596 598 600 602 604 606 608 610 612 614 616 618 620 622 624 626 628 630 632 634 636 638 640 642 644 646 648 650 652 654 656 658 660 662 664 666 668 670 672 674 676 678 680 682 684 686 688 690 692 694 696 698 700 702 704 706 708 710 712 714 716 718 720 722 724 726 728 730 732 734 736 738 740 742 744 746 748 750 752 754 756 758 760 762 764 766 768 770 772 774 776 778 780 782 784 786 788 790 792 794 796 798 800 802 804 806 808 810 812 814 816 818 820 822 824 826 828 830 832 834 836 838 840 842 844 846 848 850 852 854 856 858 860 862 864 866 868 870 872 874 876 878 880 882 884 886 888 890 892 894 896 898 900 902 904 906 908 910 912 914 916 918 920 922 924 926 928 930 932 934 936 938 940 942 944 946 948 950 952 954 956 958 960 962 964 966 968 970 972 974 976 978 980 982 984 986 988 990 992 994 996 998 1000

TTGCTGTCTGCGATGGATCTAGTGGAGGTCAACCCAAAC
777 780 782 784 786 788 790 792 794 796 798 800 802 804 806 808 810 812 814

```

Fonte: Própria autoria

Figura 20: Sequência parcial do gene IL1- β obtida a partir do cDNA de fígado de *P. corruscans*, através da amplificação utilizando os *primers* para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os *primers* para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014).

```

GGCTGGACTGCTCTGATCCTTTAGCCTTGAGTGGCAGATGTGACCTGCACAAAGGACTCCCTATCGAAGTCACCAAGGAGCCTCTTAACATGCGCTG
12  4  6  8  10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 97

TGTTCCTAATGTTGTAATCAGTCTGCAGAGGCTGAAGCACATTCGAAGCGTTCAGTCCACAGAGTTCAGTACCAGGACCTCTTCTATATTTTCATG
98 100 102 104 106 108 110 112 114 116 118 120 122 124 126 128 130 132 134 136 138 140 142 144 146 148 150 152 154 156 158 160 162 164 166 168 170 172 174 176 178 180 182 184 186 188 190 192 194

GAAAAATGTGATTGAAGAGAGCATGGTGGTTCGATTGAAATGTCAGTGAATCCAAAAGTTACAGCCAGCAGGAAAAGGTTGTGCAGTGCACGATATGTG
195 198 200 202 204 206 208 210 212 214 216 218 220 222 224 226 228 230 232 234 236 238 240 242 244 246 248 250 252 254 256 258 260 262 264 266 268 270 272 274 276 278 280 282 284 286 288 290 291

ACAAGTCTAAGAGGGCCTTGGTGCAAAGGGGAAATCTTCTGCTGGCCATTACTCTGAAGGGTGGAAATGAGAAAAATAAGCATGGTTCAACCTCTC
292 296 298 300 302 304 306 308 310 312 314 316 318 320 322 324 326 328 330 332 334 336 338 340 342 344 346 348 350 352 354 356 358 360 362 364 366 368 370 372 374 376 378 380 382 384 386 388

GGCCTATACTCCAA
389 392 394 396 398 402

```

Fonte: Própria autoria

Figura 21: Sequência parcial do gene IL-8 obtida a partir do cDNA de fígado de *P. corruscans*, através da amplificação utilizando os *primers* para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os *primers* para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014).

```

TTGCATGAAGTGCAGGATGGTTTCTATCTTTGTGATCCTGGCCTTCATAACTNTGACAGCAGGAATGACTGTTGAGCCACGGTGTGCTGTAGTGGG
12  4  6  8  10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 97

GTTGAGAGTCGGCGTTTTTGGGAACTAATCGAGCGCGTTGAACTTTTTCCCCCGAATCCACACTGCACACACACTGAGATCATTGCCACACTGAAAG
98 100 102 104 106 108 110 112 114 116 118 120 122 124 126 128 130 132 134 136 138 140 142 144 146 148 150 152 154 156 158 160 162 164 166 168 170 172 174 176 178 180 182 184 186 188 190 192 194

GCAGCGGTGAGCAGATCTGTCTGGATACTAAAGCACAATGGGTAATGAAGGTGATCGAGAAGATTATGGCAAACCATTCACCTAA
195 198 200 202 204 206 208 210 212 214 216 218 220 222 224 226 228 230 232 234 236 238 240 242 244 246 248 250 252 254 256 258 260 262 264 266 268 270 272 274 276 278 280

```

Fonte: Própria autoria

Figura 22: Sequência parcial do gene TNF α obtida a partir do cDNA de fígado de *P. corruscans*, através da amplificação utilizando os *primers* para caracterização parcial. Na região em destaque esta localizado a sequência amplificada utilizando os *primers* para tempo real. A visualização desta sequência foi feita através do programa Unipro UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012; GOLOSOVA et al., 2014).

Fonte: Própria autoria

7.5 Sequência de aminoácidos

Em relação às proteínas dos genes amplificados neste experimento as sequências de aminoácidos da arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α foram comparadas com outras sequências de peixes e humanos depositados no Genbank (Figura 23 a 27), onde pode ser observado que as enzimas arginase 1 e arginase 2 de *P. corruscans* e *P. reticulatum* possuem regiões conservadas com características da família das enzimas da arginase, além dos resíduos de ligação de dois íons de manganês (Mn²⁺A e B), de ligação com L-arginina e sequência de segmentação mitocondrial (Figuras 23 e 24). Entre as sequências que tiveram maior similariedade na busca Blast com *P. corruscans* e *P. reticulatum* foram as obtidas para arginase 1 de *I. punctatus* (número de acesso XP_017339068.1) com 91% de similariedade, e para arginase 2 foram os aminoácidos de *C. batrachus* (número de acesso AGZ94901.2) com 95% de similariedade.

A sequência de aminoácidos da IL1- β de *P. corruscans* obtidas neste experimento mostraram uma alta similaridade com as sequências de outras espécies que se encontram depositadas no genbank, incluindo uma similaridade de 80% com a proteína do peixe da espécie

Hemibagrus macropterus (número de acesso AFL93442.1). O tamanho da sequência de aminoácidos obtidas para a IL1- β , não foi suficiente para a comparação com regiões específicas das proteínas da família IL1- β (Figura 25)

Em contrapartida, através da amplificação do RNA da interleucina IL-8 de *P. corruscans* e *P. reticulatum* foi possível realizar a tradução completa da proteína (CDS), onde pode ser verificado a presença de quatro resíduos de cisteína e um domínio ELR, que são regiões características das proteínas da família IL-8 (Figura 26). A sequência de aminoácido que mais se assemelhou a IL-8 de *P. corruscans* foi a de *I. punctatus* (numero de acesso XP_017316606.1) com 86% de similariedade

A sequência de aminoácido TNF α obtido através da amplificação do RNA de *P. corruscans* neste experimento, apresentou um fragmento da região da assinatura da família da TNF α (Figura 27). Além disso, também pode ser observado 2 resíduos de cisteína, que são cruciais para a dobragem correta do TNF α (Figura 27). Dentre as sequências de aminoácidos depositadas no Genbank, o peixe *I. punctatus* (NP_001187101.1) foi a que mais se assemelhou a *P. corruscans* e *P. reticulatum* com 72% de similariedade.

Devido a alta similaridade entre as sequências de aminoácidos *P. corruscans* e *P. reticulatum* obtidas neste experimento as figuras abaixo mostram somente os aminoácidos obtidos de *P. corruscans*.

Figura 23: Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene Arg1 de pintado (*P. corruscans*) em comparação com as espécies de peixes *Clarias batrachus*, *I. punctatus*, *C. carpio*, *A. mexicanus*, *D. rerio* e com a sequência de humanos. Regiões específicas da família arginase são indicados nas áreas destacadas; histidina, ácidos aspártico e glicina envolvidos na ligação dos dois átomos de manganês são: Mn2+A (+), Mn2+B (Ψ) ou ambos Mn2+A e B (¶) e histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina (II). Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Os números de acesso do Genbank das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes.

Pintado_P.corruscans_Arg1	-----	0
C.batrachus_arg1_JQ680981.2	MMKMHSRDAARAALTLRLALLRRQLHSGVIGAPFSRGQPRDGVQRPDVIRGAGLVKRL	60
I.punctatus_Arg1_XP_017339068.1	-----MKLLNTAVRIFRRDLHSGVIGAPFSKGQPRDGVQRLGPDVIREAGLVKRL	50
C.carpio_Arg1_CAI38845.1	MTVMRSFSLRAAFHIFTRDLHHHH-CVGIIGAPFSKGQQRDGVQRPDLIRAAGLVQKL	59
A.mexicanus_Arg1_XP_007260102.1	-----GTNTVCPDQPKDGVQRLGPDLLIRAAGLVNRL	30
D_rerio_Arg1_NP_001038662.1	MMKMKSLSGSRAALHIFRHLHGHQYRYSVGIIGAPFSKGQQRDGVQEGADLIRAAGLVQKL	60
H.sapiens_Arg1_NP_001231367.1	-----MSAKSRTIGIIGAPFSKGQPRGVEEGPTVLRKAGLLEKL	40

Pintado_P.corruscans_Arg1	-----	0
C.batrachus_arg1_JQ680981.2	EQQ-----DCMVVDYGNLIFEEVSNDHPFGTTKQPRVGLANKQVADAVQVRKNDGY	112
I.punctatus_Arg1_XP_017339068.1	EQQ-----GCVVKDYGNLIFEDVSNDPEIGRTKQPRVGLANKQVADAVQVRKNDGH	102
C.carpio_Arg1_CAI38845.1	KGQ-----GCVVKDYGNLTFEDIPNDEPIGRKLTQPRVGRANELLAGAVQKIKSDGN	111
A.mexicanus_Arg1_XP_007260102.1	KEQ-----GCDVKDYGNLAFESVSSDEPVGLAKRPRAVGRANQLADAVRRIKHDGH	82
D_rerio_Arg1_NP_001038662.1	KGQ-----GCVVKDYGNVTFENLPNDESIGRLKTPRAVGRANELLSGAVQKIKSDGN	112
H.sapiens_Arg1_NP_001231367.1	KEQVTQNFLLILECDVKDYGDLFPADIPNDSPPQIVKNPRSVGKASEQLAGKVAEVKKNR	100

Pintado_P.corruscans_Arg1	-----PLRQEHIGHQPMYSYLIREL	19
C.batrachus_arg1_JQ680981.2	TCVMLGGDHS LAIGSINGHAACRPESLVVWDAHADINTPLTSPGTGNIHQPMYSYLIREL	172
I.punctatus_Arg1_XP_017339068.1	TCVMLGGDHS LAIGSINGHAAYRPELSVVWDAHADINTPLTSPGTGNIHQPMYSYLIREL	162
C.carpio_Arg1_CAI38845.1	TCVMLGGDHS LAIGSISGHAASRHELSVLWDAHADINTPLTTPGTGNIHQPLSYLIREL	171
A.mexicanus_Arg1_XP_007260102.1	TCVMLGGDHS LAIGSINGHAASGSESVVWDAHADINTPLTTTGTGNIHQPMYSYLIREL	142
D_rerio_Arg1_NP_001038662.1	TCVMLGGDHS LAIGSISGHAAYRHELSVLWDAHADINTPLTTPGTGNIHQPMYSYLIREL	172
H.sapiens_Arg1_NP_001231367.1	ISLVLGDDHSLAIGSISGHARVHPELGVWDAHADINTPLTTTSGNLHGQPVFLLKEL	160

Pintado_P.corruscans_Arg1	STKIPALPNFWSWIKPCIAAKDIVYIGLRDVPDEEHYILKHLGIKTFMSTEVDSLGIKVM	79
C.batrachus_arg1_JQ680981.2	HNKIPVMPNFSWIQPCVTAQDIVYIGLRDVPDEEHYILKHLGIKTFMSTEVDSLGIKVM	232
I.punctatus_Arg1_XP_017339068.1	CTKIPVLPNFSWIKPCIAAQDVYIGLRDVPDEEHYILKHLGIKTFMTEVDSLGIKVM	222
C.carpio_Arg1_CAI38845.1	HSKIPIIPNFSWLKPCVAAKDIVYIGLRDVPDEEHYILKHLGIKTFMSTEVDRLGIAKVM	231
A.mexicanus_Arg1_XP_007260102.1	HNKIPVIPNFSWIKPCIAAKDIVYIGLRDVPGEHYILKYLGIKTFMSSEVDRLGIAKVM	202
D_rerio_Arg1_NP_001038662.1	HSKMPKLPNFSWLKPCIAAQDVYIGLRDVPDEEHYILKYLGIKTFMSTEVDRLGIAKVM	232
H.sapiens_Arg1_NP_001231367.1	KGKIPDVPGFSWVTPCISAKDIVYIGLRDVPGEHYILKTLGIKYFSMTEVDRLGIGKVM	220

Pintado_P.corruscans_Arg1	EQTCDHIFSKIKKNIHLSYDIDALDPSVTPATGTPVIGGLTYREGIYITEYVCQTGLLSA	139
C.batrachus_arg1_JQ680981.2	EQTCDHIFSKIKKPIHLSYDIDALDPSLAPATGTPVIGGLTYREGIYITEYLCQTGLLSA	292
I.punctatus_Arg1_XP_017339068.1	EQMCDHIFSKIKKPIHLSYDIDALDPSVAPATGTPVIGGLTYREGIYITEYVCQTGLLSA	282
C.carpio_Arg1_CAI38845.1	EQTCDHMFSSKVKKPIHLSFDIDALDPSVSPATGTPVAGGLTYREGIYITEYVCQTGLLSA	291
A.mexicanus_Arg1_XP_007260102.1	EQTCDHIFTKVKKPIHLSYDIDALDPSVAPATGTPVVGGLTYREGVYITEHICQTDLLSA	262
D_rerio_Arg1_NP_001038662.1	EQTCDHMFSSKVKKPIHLSFDIDALDPSVSPATGTPVAGGLTYREGIYITEHICQTDLLSA	292
H.sapiens_Arg1_NP_001231367.1	EETLSYLLGRKKRPIHLSFDVGLDPSFTPATGTPVVGGLTYREGIYITEEYKTGLLSG	280

Pintado_P.corruscans_Arg1	IDVVEVNPKRKR-----	152
C.batrachus_arg1_JQ680981.2	IDIVEVNPKLAKREEEAQLTASVAVDLVLCGFRVREGSHRADYKIPEP-	341
I.punctatus_Arg1_XP_017339068.1	VDVVEVNPQAKREEEARFTANVAVDLVLCGFRVREGSHAADYKIPDP-	331
C.carpio_Arg1_CAI38845.1	VDMVEVNPQCKTEDEIKSTVNAAVDLLGCGFRVREGSHEPDYQIPNP-	340
A.mexicanus_Arg1_XP_007260102.1	VDIVEVNPKRGRTEDEVQSTVNAAVDLLGCGFRVREGSHPADYKMPDP-	311
D_rerio_Arg1_NP_001038662.1	VDMVEVNPKLGRTEDEIKSTVNAAVDLLGCGFRVREGSHDPDYKMPNP-	341
H.sapiens_Arg1_NP_001231367.1	LDIMEVNPGLGKTPPEVTRTVNTAVAITLACFGLAREGNHKKPIDYLNPPK	330

Fonte: Própria autoria

Figura 24: Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene Arg2 de *P. corrucans* em comparação com as espécies de peixes *I. punctatus*, *C. carpio*, *A. mexicanus*, *C. batrachus*, *Heteropneustes fossilis* e com a sequência de humanos. Regiões específicas da família arginase são indicados nas áreas destacadas; histidina, ácidos aspártico e glicina envolvidos na ligação dos dois átomos de manganês são: Mn2+A (+), Mn2+B (Ψ) ou ambos Mn2+A e B (¶) e histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina (II). Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corrucans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Os números de acesso do Genbank das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes.

Pintado_P.corrucans)Arg2	-----SELRFSGKQKRRGVELGPKAIRDAGLVERL	30
I.punctatus_Arg2_XP_017320126.1	MAVRGPLSRFLRSALSSCCPQSRHLSVAIVGAPFSKGQKRRGVELGPKAIRDAGVVERL	60
C.carpioCA_Arg2_F02014.2	MALRGPLSRLLRSTMSSCQQRN--SQSVAILGAPFSKGQKRRGVHGPKAIRDAGLVERL	58
A.mexicanus_arg2_XM_007247521.2	MALRGPLSRFLQSTLSSCQHSR--AHSVAILGAPFSKGQKRRGVHGPKAIRDAGLVERL	58
C.batrachus_Arg2_AGZ94901.2	MAVRGPLSRFLRSALSACQ--SRA-HSVAIVGAPFSKGQKRRGVHGPKAIRDAGLVERL	58
H.fossilis_Arg2_AHA36868.2	MAVRGPLSRVFRSALSSCQSR--AHSVVAIVGAPFSKGQKRRGVHGPKAIRDAGLVERL	58
H.sapiens_Arg2_NP_001163.1	MSLRGSLRLLQTRVHSILK--KSVHSVAIVGAPFSQGGKRRGVHGPAAIREAGLMKRL	58
	***** **	
Pintado_P.corrucans)Arg2	TSLENAVHDFGDLSPFEHSEEDDRFMNV-PFPRTVGRANQILSDAMSRAVGVGHTAVMLGG	89
I.punctatus_Arg2_XP_017320126.1	ASLENAVHDFGDLSPFEHLEEDDRFMNV-PFPRTVGRANQILSDTMSRAVGAGHTAVMLGG	119
C.carpioCA_Arg2_F02014.2	SNLDYAVHDFGDLAFKHLEKDEHFMHV-PFPRTVGRANQLLSGAVSGAVGAGHTCIMLGG	117
A.mexicanus_arg2_XM_007247521.2	ANLEYPVHDFGDLSPFHLEKDDHFMHV-PYPRTVGRATQLVSGAVSRAVEAGHTSVMLGG	117
C.batrachus_Arg2_AGZ94901.2	RSLENAVHDFGDLSPFEHLEEDDRFMNV-PFPRTVGRANEILSEAI-STAVGAGNTAVMLGG	117
H.fossilis_Arg2_AHA36868.2	RSLENAVHDFGDLRFEPHQEDNRFMNV-PYPRTVGRANEILSDAISRAVGAGHTTVMMLGG	117
H.sapiens_Arg2_NP_001163.1	SSLGCHLKDFGDLSPFVPKDDLYNNLIVNPRSVGLANQELAEVVSRAVSDGYSCVTLLGG	118
	* :***** * :*: : : : ***: *.: : : .: * * * : : **	
Pintado_P.corrucans)Arg2	¶Ψ ¶ + Ψ II	
I.punctatus_Arg2_XP_017320126.1	DHSLAIGSVAGHAQQRPDLCLLIWVDAHADINTPMTSPSGNLHGQPVAFMLKELQDKMPAV	149
C.carpioCA_Arg2_F02014.2	DHSLAIGSVAGHAQQRPDLCLLIWVDAHADINTPMTSPSGNLHGQPVAFMLKELQDKMPV	179
A.mexicanus_arg2_XM_007247521.2	DHSLAIGSVAGHAQQCPDLCLLIWVDAHADINTPLTSPSGNLHGQSVAFLLKDLQNKMPV	177
C.batrachus_Arg2_AGZ94901.2	DHSLAIGSVAGHAQQCPDLCLLIWVDAHADINTPLTSPSGNLHGQSVAFMLKELQDKMPDV	177
H.fossilis_Arg2_AHA36868.2	DHSLAIGSVAGHAQQRPDLCLLIWVDAHADINTPMTSPSGNLHGQPVAFMLKELQDKMPAV	177
H.sapiens_Arg2_NP_001163.1	DHSLAIGTISGHARHCPDLVWVDAHADINTPLTSSCNLHGQPVSFLLRELQDKVPQL	178
	*****: **: : : : :*****: **: :*****: **: :*****: **: : *	
Pintado_P.corrucans)Arg2	PGFSWMKPFLLTARDLVYIGLRDVPGEHVILKNLGIQCFTMRDVRMGQRMVEVTLDDL	209
I.punctatus_Arg2_XP_017320126.1	PGFSWMKPFLLAARDLVYIGLRDVPGEHVILKSLGIQCFTMRDIDRLGMQRMVEVTLDDL	239
C.carpioCA_Arg2_F02014.2	PGFSWMKPFLLSARDLVYIGLRDVPGEHILKTLGIQYFSMRDIDRMGIQRMVEVTLDDL	237
A.mexicanus_arg2_XM_007247521.2	PGFSWMKPFLLKARDLVYIGLRDVPGEHVILKSLGIQYFSMRDIDRMGIQRMVEVTLDDL	237
C.batrachus_Arg2_AGZ94901.2	PGFSWMKPFLLSAKDLVYIGLRDVPGEHVILKNLGIQCFSMRDIDRMGMQRMVEVTLDDL	237
H.fossilis_Arg2_AHA36868.2	PGFSWTKPFLLAARDLVYIGLRDVPGEHVILKSLGIQCFSMRDIDRMGMQRMVEVTLDDL	237
H.sapiens_Arg2_NP_001163.1	PGFSWIKPCISSASIVYIGLRDVPPEHIFILKNYDIQYFSMRDIDRLGIQKVMERTFDLL	238
	***** * : : :***** ***. ** *:*:*:*:*:*:* *:* *	
Pintado_P.corrucans)Arg2	¶ + II	
I.punctatus_Arg2_XP_017320126.1	LARKQRAIHLSPDIDAFDPSLAPATGTPVNGGLTYREGIYITEIHNTGLLSAMDLEVN	269
C.carpioCA_Arg2_F02014.2	LARKQRIPIHLSPDIDAFDPTLAPATGTPVNGGLTYRE-----	276
A.mexicanus_arg2_XM_007247521.2	LARKQRIPIHLSPDIDAFDPSLAPATGTPVNGGLTYREGIYVTEIHNTGLLSVMDVVEVN	297
C.batrachus_Arg2_AGZ94901.2	LARKPRPIHLSPDIDAFDPAAPATGTPVNGGLTYREGIYITEIHNTGLLSAMDLEVN	297
H.fossilis_Arg2_AHA36868.2	LARKQRIPIHLSPDIDAFDPSLAPATGTPVNGGLTYREGIYITEIHNTGLLSAMDLEVN	297
H.sapiens_Arg2_NP_001163.1	LARKQRIPIHLSPDIDAFDPTLAPATGTPVNGGLTYREGIYITEIHNTGLLSVMDLEVN	297
	IGKQRIPIHLSPDIDAFDPTLAPATGTPVNGGLTYREGMYIAEIHNTGLLSALDLVEVN	298
	: : : * *****:***** *****	
Pintado_P.corrucans)Arg2	P-----	270
I.punctatus_Arg2_XP_017320126.1	-----	276
C.carpioCA_Arg2_F02014.2	PTLGATPEAVEATSLAVDVISSALGQTREGAHIAFPKIEPKEDTELRL-----	347
A.mexicanus_arg2_XM_007247521.2	PTLGGGPEAVEATSLAVDVIIASSLGTREGAHVLSQEIAPKEDTEQLRL-----	348
C.batrachus_Arg2_AGZ94901.2	PALGASTEAVEATAALAVDVIIASSLGTREAAHRTARPVEPRLLRPATRT-----	348
H.fossilis_Arg2_AHA36868.2	PALGASAEAVEATAGLAVDVIIASSLGTREAGLSIPQIVEPNADTNLRL-----	347
H.sapiens_Arg2_NP_001163.1	PQLATSEEEAKTTANLAVDVIIASSFGQTREGGHIVDQLPTPSPDESENQARVRI	354

Fonte: Própria autoria

Figura 25: Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene IL1- β de *P. corruscans* em comparação com as espécies de peixes *Hemibagrus macropterus*, *I. punctatus*, *Tachysurus vachellii*, *Pygocentrus nattereri*, *C. batrachus* e com a sequência de humanos. Regiões específicas da família IL1- β esta indicado nas área destacada. Seta indica o sitio de corte ICE (resíduo de ácido aspártico) de mamíferos que é crucial para a ativação da IL1- β . Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes.

pintado_P.corruscans_IL1b	-----LDCSDPLALSGRCDLHKGLPIEVTK-	26
H.macropterus_IL1b_AFL93442.1	MADKDLL---MLESYFG--SDSGFDSDDTDFDELDCSDPLAMSSRCDLHKGIRIEVTKE-	54
I.punctatus_IL1b_CAE51868.1	MDDKDLL---TLERSFD--SDCGFDSAMDDELDCSDPLAMSGRCDLHEGLRIEVTKE-	54
T.vachellii_IL1b_AFK27936.1	-----DLHEGIRIEVTKE-	13
P.nattereri_IL1b_XP_017549214.1	MADKNLL---LVESFPD--NDSAFESDGTDFDELDCSDPLAMSGRCDLHKGLRIEISEQ-	54
C.batrachus_IL1b_AFJ20613.1	-----	0
H.sapiens_IL1b_AAA59135.1	MAEVPPELASEMMAYYSNEDDLFFEADGP--KQMKCS--FQDLDLCPDGGIQLRISDHH	56
pintado_P.corruscans_IL1b	-PLNMRCVANVVISLQRLKHRSVQSTFTDQDLFYIFMENVIEESMVVDLKCSESKSYS	85
H.macropterus_IL1b_AFL93442.1	-PLSMRSVANIIVIAVHRLKHTQRVQSTFTDQDLFNIFMENVIEESMVVDLKCNESESKSYS	113
I.punctatus_IL1b_CAE51868.1	-PLSMRQVANVVIALQRLKLTQNIQSTFTDQELFNVIENVIEESMVINLKCTESKSYS	113
T.vachellii_IL1b_AFK27936.1	-PLSMRSVANVVIALQRMKHTQHVSQSTFTDQDLFTIFIENVIEESIAIDLKCSSESQSYS	72
P.nattereri_IL1b_XP_017549214.1	-PHTMRQVTNIIIALQKPKQ---VRSTFTDHLEFNIIENIVEESMGLKVNCESSRTYN	110
C.batrachus_IL1b_AFJ20613.1	---IMRPIANVVIALQRLKLTERTVQSTFTDQELFNIFIENVIEETIVINLNCSESKSYS	57
H.sapiens_IL1b_AAA59135.1	YSKGFRAQASVVVAMDKLRKMLVPCQTQENDLSTFFPFIFEEEPFPDPTWDNEAYVHD	116
	* : . : : : : : : : * : : * . : . * * : . . : . :	
pintado_P.corruscans_IL1b	QOEKVVQCTICDKSKRALVQREN--LLAITLKGGEKNKAWFNLSAYTP-----	133
H.macropterus_IL1b_AFL93442.1	MQDKIVQCTICDKSKRALVRRDKLPILLAITLKGANENKAWFNLSAYNPPNCRENTKGQ	173
I.punctatus_IL1b_CAE51868.1	LQDKVVRCTICDKSKRALVQREKLPIIIAFTLKGKNKDNKAWFNLSAYTPNCTENTKGQ	173
T.vachellii_IL1b_AFK27936.1	MQDKTVQCTICDKSKRALVQREKLPIIIAFTLKGGEENKAWFNLSAYNPPNCRGNAGQ	132
P.nattereri_IL1b_XP_017549214.1	KQDRVIQCTVCDGLKKSLVQSQTGTPNLLAVTLRGGNSNRSVGINLSTYTPGCKA-TNGQ	169
C.batrachus_IL1b_AFJ20613.1	LQDKVVQCTICDKSKRALVQREKFPILLAFITL-----	89
H.sapiens_IL1b_AAA59135.1	APVRSINCLTRDSQQKSLVMSGPY-ELKALHLQCGDMEQQVVFMSFVQC---EESNDKI	172
	▲ : : . * : * : : * * * . *	
pintado_P.corruscans_IL1b	-----	133
H.macropterus_IL1b_AFL93442.1	PVCLGIVKSNLFLSCKLQNE---TPFLSIEEVEDKESLKAIRENDELERFLFLRKSGDT	230
I.punctatus_IL1b_CAE51868.1	PVCLGIVKTNLFLSCTLENE---TPFLGLEEVKDKERLKSQENDGMRFFSSETALVTP	230
T.vachellii_IL1b_AFK27936.1	PVCLGIVKSNLFLSCTMQND---TPFLGIEEVKDKESLKTIKENDGMRFLFLRNGPGDS	189
P.nattereri_IL1b_XP_017549214.1	PICKLIAQSNLYLACTKESGTSQPHLILEDVKDEETLKTIEENDGMRFLFFRKVTGGS	229
C.batrachus_IL1b_AFJ20613.1	-----	89
H.sapiens_IL1b_AAA59135.1	PVALGLKEKNLYLSCVLKDD---KPTLQLESVDPKNYPK-----KMEKRFPVFNKIEINN	224
pintado_P.corruscans_IL1b	□ -----	133
H.macropterus_IL1b_AFL93442.1	LNTFESVRYPGWFITTSKDDFKPVQMSKQ--PSHLQLFTLHDETVPVPHDEF	280
I.punctatus_IL1b_CAE51868.1	LTPSKSVKYPGWFITTSKEDYKPVQCKQ--SSHLQLFTLHDETVPVQNEI	280
T.vachellii_IL1b_AFK27936.1	LNTFESVRYPGWFITTSKDDFKPVQMTNQ--TSHLQLFTLHDETVPVQSN-	237
P.nattereri_IL1b_XP_017549214.1	INTFESVKYPHWFISTSKNESMPVDMCVEEDTSRQKVFTLQDQKVI-----	275
C.batrachus_IL1b_AFJ20613.1	-----	89
H.sapiens_IL1b_AAA59135.1	KLEFESAQFPNWYISTSQAENMVFVLGGTKGQDITDFTMQFVSS-----	269

Fonte: Própria autoria

Figura 26: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene IL-8 de *P. corruscans* em comparação com as espécies de peixes *G. morhua*, *S. salar*, *I. punctatus*, *P. nattereri*, *A. mexicanus*, e com a seqüência de humanos. O domínio ELR e outro resíduos são econtrado nas áreas destacadas e os quatro residuos de cisteina são indicado em negrito. Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à seqüência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Número de acesso das seqüências utilizadas estão indicados na frente dos nomes.

```

pintado_P.corruscans_IL8      -----CMNCRMVSIFVILAFITXTAG-----MTVEPRCRCSGVESRRFG-KLIERVELFPP      50
G_morhua_IL8_AJ535731.2      MKMTSGKIPIGSLLVLLVLLTITEGRSLRGLGMELRCRCIQTESRQIG-RHIGMVEIIPA      59
S.salar_IL8_NM_001140710.2    ---MSIRMSASLVIVLLALLTITEGMSLRGVGADLRRCIETESRRIG-RLIKKVMFPP      56
I.punctatus_IL8_XP_017316606.1  -----MNCRTVFVFLAFITLTAG-----MSVEPRCRCSGLESRRVG-KLIEHVELFPP      49
P.nattereri_IL8_XP_017541078.1  -----MNSRILGVCLLLAVFPLTEGMSIPGMGVPRCRCSGTESKRIG-RLIESVELFPP      54
A.mexicanusX_IL8_P_007229345.1  -----MKCIVVCVSLLMVFFTLAEGMSLHGLGVEPRCRCSGTESRRIG-KLIESIELFPP      54
H.sapiens_IL8_AAA59158.1      ---MTSKLAVALLAAFLISAALCEGAVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFikelRVIES      57
                                .      :      ::      *      :      **:      *      :      .      :      *      :      :
                                .      :      ::      *      :      **:      *      :      .      :      *      :      :

pintado_P.corruscans_IL8      NPHCTHTEIIATLKGSCQQICLDTKAQWVMKVIEKIMANHSP- 92
G_morhua_IL8_AJ535731.2      NSHCEETEIIATLKRTGQEVCLDADAPWVKNVIERMISSRRH- 101
S.salar_IL8_NM_001140710.2    SSHCRDTEIIATLSNGQEQICLDVSAPWVKRVIKKMLANNK-- 97
I.punctatus_IL8_XP_017316606.1  NPHCTHTEIIATLKGSSQQICLDTKAPWVVKVIAKIMANHSP- 91
P.nattereri_IL8_XP_017541078.1  NPHCKETEIIATLKNTGQEQICLDTPAPWVKVIEKIMASRSP- 96
A.mexicanusX_IL8_P_007229345.1  NPHCKDTEIIATLKSNGQEQICLDPKAPWVTKVIEKILAKRSS- 96
H.sapiens_IL8_AAA59158.1      GPHCANTEIIIVKLS-DGRELCCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS 99
                                .      **      .****..*      .:::***      **      .*:      :::

```

Fonte: Própria autoria

Figura 27: Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene TNFa de *P. corruscans* em comparação com as espécies de peixes *I. punctatus*, *Clarias. sp*, *A. mexicanus*, *C. auratus*, *C. Carpio*, e com a sequência de humanos. O domínio de transmembrana está indicado dentro do colchete, a região específica da família está indicada dentro do retângulo. O potencial local de clivagem que gera o péptido maduro está em cinza escuro e dois resíduos de cisteína cruciais para a dobragem correta do TNFa estão em cinza claro. Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. corruscans*, traços indicam a ocorrência de gaps. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes.

Pintado_P.corruscans_TNfa	-----	0
I.punctatus_TNfa_NP_001187101.1	--MASDSQVVL--DVDGPRVTIVREKASWSSSGVWRTCGVL--LAVALCAAAAVCFPSQNK	54
Clarias.sp_TNfa_AIX03024.1	-----	0
A.mexicanus_TNfa_XP_015457510.1	--MTSQNQVIL--DVDPAQVIVSRKASTAWSSRWKLCMAL--LAIIVCAAGAVFPTFNK	54
C.auratus_TNfa_ABU50127.1	MMIDVESQLAEEGA----QVTV-----SRRSGVWRVCGVL--LAVALCAAAAVCFPTFNK	49
C.carpio_TNfa_XP_018936089.1	--MMDLENQFLEEGALPLPQVM-----SRRSGVWRVCGVL--LAVALCAAAAVCFPTLNK	52
H.sapiens_TNfa_NP_000585.2	--MSTESMI-R--DVELAEALPKKTGG---PQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTFLCLLH	52
Pintado_P.corruscans_TNfa	-----	0
I.punctatus_TNfa_NP_001187101.1	--THNKPDE--TQEI--KHSLRQ-----IS--QTAKAAIHLSGHYNPQVSSVSMQWPDNAD	102
Clarias.sp_TNfa_AIX03024.1	-----KAAIHLSGQYNPLVSNSSVEWFDNAD	26
A.mexicanus_TNfa_XP_015457510.1	--TNKPDSD--TDDI--RHSLRQ-----VS--NSATGAIHLSGHYNPVSNVSTVEWTDSD	102
C.auratus_TNfa_ABU50127.1	--SQNNQES--GNEL--RLTLRDHLSKEN--VTSKAAIHLTGAYDPDVCTDNLWDKQND	101
C.carpio_TNfa_XP_018936089.1	----NNQEG--GNAL--RLTLRDHLSKEN--VTSKVAIHLTGAYDSVCKDNLWDKQND	102
H.sapiens_TNfa_NP_000585.2	FGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPAHV---VANPQAEQQLQWLNRRA	109
Pintado_P.corruscans_TNfa	-----	38
I.punctatus_TNfa_NP_001187101.1	-----RLYXVYSQASYRVSCITYEDD--EDEGOVLHMSHTVSRWSD	159
Clarias.sp_TNfa_AIX03024.1	QSFSS--GLKLEDNEIKILRDGLYFVYSQASYRLLCKAEGD--ETEGEVMMHSHKVSRWSD	83
A.mexicanus_TNfa_XP_015457510.1	QSFSS--GLKLEGNEIKIFRKGLYFVYSQASYSLNCKAEGE--EDEGEVMMHLTHKVRWSD	162
C.auratus_TNfa_ABU50127.1	QSFNGGLVLKNNIHIHPNGLYFVYSQASYRVNCLKTGESEDEESAVHLSHMVSRSWN	158
C.carpio_TNfa_XP_018936089.1	QAFVSGGLKLVLDREIIIPYDGIYFVYSQVSFPHISCKADVT--EEHEGVHMSHAVLRFSE	159
H.sapiens_TNfa_NP_000585.2	QAFVSGGLELVDREIIIPNDGIYFVYSQVSFPHISCKHDVT---EDQDVVHMSHAVLRYSE	161
	NALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLPKQGG-----CPSTHVLTLTHTISRIAV	
	:* :***. :	
Pintado_P.corruscans_TNfa	SYDSWKPLLSTTRSTCKKTL--DGDHMPWYGAIYLGAAFNLEAGDKLRTDMDTNLLPNVE	96
I.punctatus_TNfa_NP_001187101.1	SYSSWKPLLSSATRSACKKTT--EEYQKYWYGAVYLGAAFNLEAGDKLRTVMDEKLLPKVE	217
Clarias.sp_TNfa_AIX03024.1	AYNSYKPLLSSIKSTCKKTR--KDGATKWFGAIYLGAAFNLEAGDKLRTV-----	131
A.mexicanus_TNfa_XP_015457510.1	SYPKYQPLLSTVTRTACRKIHSSSDSGEQWFAVYVGAIFKLEAGDKLCTDMDSKMLPEVE	222
C.auratus_TNfa_ABU50127.1	SYASYKPLFSAIRSACVHAT---DTEDLWYNTIYLGAAFNLRAGDKLRTDTTTELLPRVE	215
C.carpio_TNfa_XP_018936089.1	SYGSKPLFSAIRSACVHAS---DSEDLWYNTIYLGAAFNLRADRLRTTETKELLPRVE	216
H.sapiens_TNfa_NP_000585.2	SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYILGGVFPQLEKGDRLSAEINRPDYLD-F	220
	:* . ***: :: * :	
	: :: . **: *:* :	
Pintado_P.corruscans_TNfa	S-----	97
I.punctatus_TNfa_NP_001187101.1	SAGGKTFFGTFSL	230
Clarias.sp_TNfa_AIX03024.1	-----	131
A.mexicanus_TNfa_XP_015457510.1	TESGKTFFGMFSL	235
C.auratus_TNfa_ABU50127.1	SENGKTFFGVFAL	228
C.carpio_TNfa_XP_018936089.1	SENGKTFFGVFAL	229
H.sapiens_TNfa_NP_000585.2	AESGQVYFGIIAL	233

Fonte: Própria autoria

7.6 Expressão relativa dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α em *P. corruscans* e *P. reticulatum* após imunização com terontes de *I. multifiliis*.

Após a injeção intraperitoneal de 12.000 terontes de *I. multifiliis* nos peixes das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* os níveis de mRNA dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α do baço, fígado e rim cranial foram avaliados por qPCR e a expressão de cada um desses genes foi estimada em relação ao gene de referência endógeno 18S rRNA. As amostras do baço *P. corruscans* obtidas 24 h após a imunização foram excluídas das análises de qPCR, uma vez que não foi possível realizar a identificação das banda ribossomais do 18s e 28s idicando que houve uma degradação destas amostras.

7.6.1 Expressão relativa em *P. corruscans*

7.6.1.1 Baço de *P. corruscans*

No baço de *P. corruscans* os 5 genes avaliados (arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α) neste experimentos demonstram um padrão semelhante de expressão, onde pode ser observado um aumento na expressão as 6 e 18 horas e uma diminuição na expressão as 12 h do grupo imunizado em relação ao grupo controle (Figura 28). Porém, somente arginase 2 e IL-8 demonstraram variações estatisticamente signifacantes (Figura 28). Onde para arginase 2 foi observado variação sigificativa no periodos de 6 h ($p=0,0231$) e as 18 h ($p=0,0164$). Às 6 h, a expressão de Arg2 foi 32 vezes maior em relação ao controle, enquanto às 18 h esse aumento foi ainda mais significativo, com uma diferença de 59 vezes maior. Para o gene da IL-8 a variação sigificativa foi observada as 18 h ($p=0,0486$) com um grande aumento de 128 vezes em sua expressão do grupo imunizado (Figura 28). As variações na expressão do gene da arginae 1 e TNF α não foram significativas.

Figura 28: Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no baço de *P. corruscans* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste T ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

7.6.1.2 Fígado de *P. corruscans*

Dentre os órgãos avaliados neste experimento o fígado se mostrou o menos efetivo de *P. corruscans* em resposta à imunização com o parasita *I. multifiliis*. Onde foi notado que todas as variações nas médias da arginase 1 do grupo imunizado em relação ao grupo controle não tiveram diferença significativa (Figura 29). Para os genes arginase 2 e a IL-1 β , pode ser observado apenas uma variação significativa para cada, na expressão do grupo imunizado em relação ao grupo controle, sendo para gene da arginase 2 as 6 h ($p \leq 0,0001$) com um aumento na expressão de 65 vezes e para o gene IL-1 β as 24 h ($p = 0,0005$) com aumento na expressão de 18 vezes (Figura 29). Apesar do aumento da expressão da IL-8 em todos os períodos não terem sido validados pela estatística, pode ser observado uma diferença significativa do grupo imunizado frente o grupo controle ($p < 0.0001$). Assim como no baço a expressão do gene da TNF- α do fígado, não apresentou alterações significativa (Figura 29).

Figura 29: Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no fígado de *P. corruscans* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste T ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

7.6.1.3 Rim cranial de *P. corruscans*

Assim como no baço e fígado as variações nas médias da arginase 1 dos grupos imunizados e controle não tiveram alterações significativa. Para os demais genes o rim cranial se mostrou como o órgão mais efetivo em resposta à imunização com o parasita *I. multifiliis*. Para os genes da arginase 2 e IL1- β pode ser observado aumento na expressão em três períodos, para arginase 2 as 6 h ($p=0,004$) com variação de 6,1 de vezes, as 18 h ($p=0,002$) com variação de 3,5 vezes, e as 24 h ($p = 0,04$) com variação de 2,1 vezes, para o gene da IL1- β foi observado aumento na expressão em dois períodos, as 18 h ($p = 0,0019$) com variação de 15 vezes e as 24 h ($p = 0,0001$) com variação de 14 vezes (Figura 30). O gene da IL-8 e da TNF- α do rim cranial não apresentaram diferenças significativas nos períodos (Figura 30). Sendo apenas observado alterações significativas do grupo imunizado frente ao grupo controle de $p=0,008$ para IL-8 e $p=0.03$ para TNF- α .

Figura 30: Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no rim cranial de *P. corruscans* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste T ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

7.6.2 Expressão relativa em *P. reticulatum*

7.6.2.1 Baço de *P. reticulatum*

Dentre os órgãos que foram avaliados neste experimento o baço de *P. reticulatum* foi único que apresentou variações significativas, dentro dos períodos após imunização com o parasita *I. multifiliis*. Sendo observado aumento significativo nos períodos de 6 e 18 horas para arginase 2 com variações de 79 vezes ($p=0,0001$) e 36 vezes ($p=0,004$), para IL-8 com variações de 1 vez ($p=0,001$) e 117 vezes ($p=0,007$) e para TNF- α com variação de 35 vezes ($p=0,001$) e 7 vezes ($p=0,006$) respectivamente.

Além disso, esta diferença não foi notada para os genes da arginase 1 e IL1- β , o qual tiveram alterações significativas apenas em relação do grupo imunizado frente o controle de $p=0.02$ e $p=0,0001$.

Figura 31: Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no baço de *P. reticulatum* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste T ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

7.6.2.2 Fígado de *P. reticulatum*

Apesar das médias de expressão da arginase 1 terem apresentado menores valores do grupo imunizado em relação ao grupo controle, essas diferenças não foram estatisticamente significantes nos períodos analisados, podendo ser observado apenas interação estatística do grupo imunizado frente ao grupo controle ($p=0,0001$) (Figura 32). Para os genes arginase 2, IL1- β e IL-8 pode ser observado aumentos nos valores das expressões, porém assim como arginase 1 as variações nas médias de expressões não foram estatisticamente significativas nos períodos analisados, podendo ser observado apenas interação estatística do grupo imunizado frente ao grupo controle $p=0,0004$, $p=0,0003$ e $p=0,0003$ respectivamente. A expressão do gene da TNF- α no fígado não apresentou nenhuma variação significativa pelos teste estatísticos (Figura 32).

Figura 32: Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no fígado de *P. reticulatum* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Própria autoria

7.6.2.3 Rim cranial de *P. reticulatum*

Diferentemente dos outros órgãos avaliados neste experimento a expressão da arginase 1, arginase 2 e TNF- α no rim cranial de *P. reticulatum* não apresentaram nenhuma alteração estatística (Figura 33). Neste órgão as únicas alterações estáticas que puderam ser observadas devido a imunização do parasita *I. multifiliis* foi na expressão dos genes IL1- β e da IL-8 que obtiveram diferenças significativas do grupo imunizado frente ao grupo controle com $p=0,02$ e $p=0,0004$ respectivamente.

Figura 33: Expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α no rim cranial de *P. reticulatus* imunizados com *I. multifiliis* (■) e grupo controle (■) nos períodos de 6, 12, 18 e 24 horas pós-imunização. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão.

Rim Cranial

Fonte: Própria autoria

8. DISCUSSÃO

Uma das maiores dificuldades no cultivo de pintado (*P. corruscans*) e cachara (*P. reticulatum*) esta relacionado com a perda de juvenis pela doença dos pontos brancos, ocasionada pelo protozoários *I. multifiliis* e outras enfermidades como as virais e bacterianas. Com isso as técnicas utilizadas no controle deste parasita incluem a aplicação de diversos produtos químicos, que além de controlar a infestação, possuem efeitos secundários como degradação ambiental, efeito mutagênicos para os seres humanos e aumento dos custos de produção para piscicultor.

Diversas pesquisas vem sendo realizadas com o objetivo de aumentar os conhecimentos relacionados com os aspectos biológicos do *I. multifiliis*, e os mecanismos imunológicos resultantes da interação deste parasita com diversas espécie de peixes infectados pelo protozoário (BAUER, 1953; AIHUA; BUCHMANN, 2001; BUCHMANN et al., 2001; GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN, 2007; SUN et al., 2009; VON GERSDORFF JORGENSEN, 2016). Pesquisa estas que foram desenvolvidas com objetivos de propor mecanismos mais eficazes no combate deste protozoário.

Pesquisadores demonstraram que peixes que sobrevivem à infecção inicial desenvolvem imunidade protetiva, indicando que a imunização é uma alternativa viável para no controle da infecção desse parasita em peixes de criação (WANG, X. T.; DICKERSON, 2002; DICKERSON, H.W., 2006; VON GERSDORFF JORGENSEN, 2016). Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de conhecer os aspectos imunológicos em peixes infectados, frente ao parasitismo de *I. multifiliis* em suas diversas fases como trofote, tomonete, terontes vivos ou mortos ou mesmo fragmentos do parasitas, injetados por via intraperitoneal (BUCHMANN; NIELSEN, 1999; XU; KLESIUS, 2003; XU; KLESIUS; SHOEMAKER, 2008).

Neste experimento a imunização dos peixes *P. corruscans* e *P. reticulatum* para posterior avaliação da expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α , foi realizada através

da imunização via injeção intraperitoneal com terontes vivos. De acordo com experimentos realizados por XU; KLESIUS; SHELBY (2004) esta via e a fase do parasita demonstraram-se como os agentes imunogênicos de *I. multifiliis* com uma maior eficiência e proteção de hospedeiro contra novas infecções.

Previamente as análises de caracterização e expressão dos genes de interesse do presente trabalho, todos os peixes utilizados neste experimento foram caracterizados molecularmente para certificar que se tratavam de exemplares de *P. corruscans* e *P. reticulatum* puros, pois de acordo com VILLELA (2015) os surubins híbridos gerados nas pisciculturas são comercializados na fase juvenil de crescimento, quando não é possível diferenciar visualmente híbridos F1 de indivíduos puros com precisão, necessitando portanto, de métodos mais avançados.

Dentre os métodos utilizados para a identificação de peixes híbridos SCRIBNER; PAGE; BARTRON (2000) relataram que 45% dos estudos utilizam métodos morfológicos; 35% empregam isoenzimas, 12% realizam por amplificação do DNA mitocondrial, 4% realizam por amplificação do DNA nuclear e 2% utilizarão separação de cariótipos.

Para a separação de híbridos entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* os métodos moleculares como PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) e PCR-multiplex (ou o termo mais adequado: PCR espécie- específica) podem ser utilizando para a identificação de 6 marcadores moleculares (DO PRADO et al., 2011; HASHIMOTO et al., 2013). Sendo 3 baseados em genes nucleares: RAG2 (gene de ativação da recombinação 2), EF1 α (fator de elongação 1 α), GLOB (β -globina) e 18S (RNA ribossomal 18S) e 2 baseados em genes mitocondriais 16S (gene ribossomal 16S) e COI (citocromo oxidase C subunidade 1). Porém, apesar destes diversos genes serem descritos por terem a capacidade de separar peixes das espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans* e seus híbridos, VILLELA (2015) relatou, que somente a amplificação dos genes RAG 2, 18S e COI são indicados para esta

finalidade. Desta forma, utilizamos somente a amplificação do RAG 2 para caracterizar os alevinos dos grupos experimentais.

Apesar das técnicas de PCR-RFLP e PCR-multiplex terem sido descritas como métodos eficientes para uma rápida e pouco dispendiosa identificação de híbridos (DO PRADO et al., 2011; HASHIMOTO et al., 2013), neste trabalho estas técnicas se mostraram ineficientes devido a falta de replicação dos resultados. Sendo assim se fez necessário realizar o sequenciamento do gene RAG2 para a identificação das regiões polimórficas.

Através das sequências do gene RAG2 de cada uma das espécies analisadas, puderam ser observadas alterações em determinadas posições das quais foi possível diferenciar os exemplares de cada espécie. As sequências dos peixes híbridos apresentaram picos duplos nos eletroferogramas (Figura 16) em posições em que havia diferença entre os puros homozigotos, sugerindo assim a ocorrência de hibridização. Sendo assim estes resultados fortemente indicaram que as imunizações e análises de expressão gênica foram realizadas com espécimes puras de *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Devido a inexistência de dados na literatura referente as sequências de DNA, RNA ou proteínas das enzimas arginase 1 e arginase 2 e das citocinas IL1- β , IL-8 e TNF α para os peixes das espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum* ou mesmo para qualquer outro peixe da família Pseudoplatystoma foi necessário realizar a caracterização parcial das sequências destes genes. O sequenciamento utilizando os *primers* específicos para cada gene desenvolvido neste experimento resultou na caracterização parcial dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF α com aproximadamente 530, 815, 400, 280 e 300 pb respectivamente.

A partir das sequências dos genes obtido foi realizada a sua tradução para aminoácidos, resultando em sequências parciais das proteínas da arginase 1, arginase 2, IL1- β , TNF α com 152, 270, 133 e 97 aminoácidos respectivamente. Para a interleucina IL-8 foi possível obter a sequência

completa da proteína, composta por 92 aminoácidos. Através da comparação das sequências de aminoácidos das enzimas da arginase 1 e arginase 2 de *P. corruscans* com outras sequências de peixes e com a sequência de humano foi observado a ocorrência de sítios específicos da família arginase, o qual inclui 8 resíduos de histidina, ácido aspártico e glicina envolvidos na ligação dos dois íons de manganês, 2 resíduos de histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina e uma sequência de segmentação mitocondrial (JOERINK; SAVELKOUL; WIEGERTJES, 2006). De acordo com JOERINK; SAVELKOUL; WIEGERTJES (2006) esta composição de ambas arginase de peixes identificadas até momento possuem o mesmo padrão, sugerindo assim que as funções das isoformas 1 e 2 da arginase para as espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* possuem funções semelhantes a outros peixes.

Na comparação de sequência parcial de aminoácidos da citocina IL-1 β de *P. corruscans* com outras sequências de IL-1 β , foi observado a presença de vários sítios conservados entre os aminoácidos de peixes e humanos. Embora, a sequência de aminoácidos obtida neste experimento não tenha sido grande o suficiente para detectar sítios de ligação característicos da enzima, a comparação das sequências de outros peixes em relação à de humanos mostrou similaridade, através assinatura da família IL-1 β (PLEIC et al., 2014) e 2 resíduos de cisteína (WU et al., 2015).

Apesar das sequências de aminoácidos demonstrarem tal similaridade entre peixes e humanos, a IL-1 β dos mamíferos somente é ativada por uma caspase-I denominado ICE (enzima conversora de interleucina-1b) (HOWARD et al., 1991) que possui a função de clivar a ligação de Asp-X onde X é tipicamente um pequeno resíduo hidrofóbico tal como Gly, Ala, Asn, Val ou Ser (NETT et al., 1992; GHAYUR et al., 1997) produzindo uma forma ativa C-terminal (HOGQUIST et al., 1991; THORNBERRY et al., 1992). Nos peixes foi reportado que ativação da IL-1 β ocorre após uma Ala⁹⁵ para truta (*O. mykiss*) (HONG et al., 2001) e Ala⁸⁶ para badejo (*Dicentrarchus labrax*) (BUONOCORE et al., 2004) sugerindo que este Ala se equivale ao resíduo de ativação da

IL-1b dos mamíferos. Porém, os mecanismos e o local de clivagem exata do processamento nos teleósteos ainda não foram totalmente esclarecidos (BIRD et al., 2002; SAKAMAKI; SATOU, 2009).

A interleucina IL-8 foi uma das primeiras quimiocinas CXC descobertas em peixes sendo clonada e caracterizada em diversos peixes, como bagre do canal (*I. punctatus*) (CHEN, L. Q. et al., 2005), fugu (*Takifugu rubripes*) (SAHA et al., 2007), linguado japonês (*Paralichthys olivaceous*) (LEE et al., 2001), truta do arco-íris (*O. mykiss*) (LAING et al., 2002), carpa comum (*C. carpio*) (HUISING et al., 2003), bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) (SEPPOLA et al., 2008), peixe zebra (*D. rerio*) (OEHLERS et al., 2010) entre outros. Pesquisas demonstraram que a proteína IL-8, possui 4 resíduos de cisteína que podem ser encontradas em todas as sequências de peixes, aves e mamíferos identificadas até o momento (WANG, G. L. et al., 2017). Além disso, as quimiocinas da família CXC possuem um domínio ELR em sua sequência, que em aves e mamíferos possui um importante papel na atração de neutrófilos (ROSENKILDE; SCHWARTZ, 2004). Nos peixes este domínio ELR é substituído por ELH, SLH, EQH, DLR, LLR ou EPR (LEE et al., 2001; HUISING et al., 2003; SAHA et al., 2007; CHEN, L. C. et al., 2008; LI, H. Y. et al., 2013; WANG, T. T. et al., 2013) com exceção de 2 peixes, a arinca (*Melanogrammus aeglefinus*) e o bacalhau do Atlântico (*G. morhua*) que possuem o domínio ELR como encontrado nas aves e mamíferos (SEPPOLA et al., 2008). Apesar de ser observado que os peixes possuem uma formação diferente neste domínio a função da interleucina IL-8 dos teleósteos continua tendo um importante papel na atração de neutrófilos (WANG, G. L. et al., 2017).

Através da comparação da sequência de aminoácidos completa da IL-8 de *P. corrucaans* com outras sequências na literatura, pode ser observado que esta possui uma grande homologia com sequências de peixes e mamíferos apresentando 4 resíduos de cisteína e do domínio EPR,

sugerindo assim que a IL-8 de *P. corruscans* e *P. reticulatum* possuem funções semelhantes à dos demais peixes já identificados.

Dentro da estrutura da cadeia de aminoácido da TNFa dos mamíferos e outros teleósteos pôde ser identificado dois resíduos de cisteína conservados que participam na dobragem correta e maturação da TNFa, um domínio trans-membranar, um sitio de clivagem de protease (TACE-Enzima conversora TNFa) e uma assinatura da família TNF (KAJUNGIRO; XUE; AYNEALEM, 2015) o que demonstra que essa enzima em peixes teleósteos assim como de *P. corruscans* e *P. reticulatum* possui funções semelhantes a outro animais.

Após a identificação molecular dos peixes e a caracterização parcial dos genes se procedeu a imunização com terontes vivos de *I. multifiliis* em *P. corruscans* e *P. reticulatum* afim de avaliar a expressão gênica de duas isoformas da arginase e de genes que participam do processo pró-inflamatório no baço, fígado e rim cranial. A escolha destes órgãos é justificada uma vez que na literatura pode ser encontrado que os principais tecidos que integram a resposta imunitária em teleósteos são: rim anterior, juntamente com o timo, brânquias, mucosa intestinal e pele por possuírem uma grande população de leucócitos (WANG, G. L. et al., 2017).

A defesa do hospedeiro contra organismos patogênicos se inicia através da resposta imune inata que possui a função de controlar a infecção até que a resposta imune adaptativa se desenvolva e seja montada a imunidade específica (PLEIC et al., 2014). Após o reconhecimento dos patógenos o sistema imune inato, ativa os mecanismos imunológicos através da liberação de citocinas, proteínas de sinalização de células do sistema fagocitário que atuam como mediadores intercelulares (PLEIC et al., 2014), dentre esse mediadores estão a arginase que participa da ativação dos macrófagos e das interleucinas, IL1- β , IL-8 e TNF- α que participam dos processos pró-inflamatórios.

A enzima arginase (l-arginina aminohidrolase, E.C. 3.5.3.1) pode ser encontrada em todos animais (desde bactérias e leveduras até vertebrados) sendo considerada uma metaloenzima de manganês binuclear que catalisa a hidrólise da l-arginina em l-ornitina e ureia (HIRD, 1986). Nos microrganismos e invertebrados até o momento foi descrito apenas um tipo de arginase localizado nas mitocôndrias (DZIK, 2014). Em contrapartida nos vertebrados se tem a descrição de diversas isoformas sendo a arginase 1 e arginase 2 intensamente estudadas nos mamíferos (DZIK, 2014). Estas duas isoformas da arginase possuem aproximadamente o mesmo tamanho, compartilham mais de 50% de seus resíduos de aminoácidos e possuem cerca de 100% de homologia nas áreas críticas para a função enzimática (CEDERBAUM et al., 2004). Apesar desta semelhança as duas isoformas apresentam funções diferentes e são encontrada em maior concentrações em diferentes órgãos (JOERINK; SAVELKOUL; WIEGERTJES, 2006). A arginase 1 participa do ciclo de ornitina-ureia, visando a desintoxicação de amônia e como um marcador da atividade clássica de macrófago M1, podendo ser encontrada no citosol celular e principalmente expressa no fígado de mamíferos (JOERINK; SAVELKOUL; WIEGERTJES, 2006) e no rim médio, de teleostes o qual consiste em tecido hematopoiético e excretor (ZAPATA, 1979).

Neste estudo foi observado que o gene responsável pela regulação da isoforma da arginase 1 apresentou um padrão de expressão semelhante entre os peixes *P. corruscans* e *P. reticulatum* nos 3 tecidos avaliados, onde pode ser observado um aumento em sua regulação no baço e uma diminuição em sua expressão no fígado e no rim cranial. Com diferença que para *P. corruscans* não se teve variação significativa em nenhum tecido e para o *P. reticulatum* pode ser observado diferença estatística para baço e fígado do grupo imunizado frente grupo controle. O aumento da expressão identificada no baço pode estar relacionado com diversos fatores sendo desde a participação da excreção (ZAPATA, 1979) e na produção de novas células com um papel importante na remodelação de tecidos e cicatrização de lesões (LOKE et al., 2002). Em

contrapartida os baixos níveis de expressão identificado no fígado e rim cranial dos 2 peixes das duas espécies podem estar relacionado com o fato dos peixes poderem excretar amônia diretamente no ambiente aquático, eliminando a necessidade de um ciclo ornitina-ureia, o que condiz com o observado por (JOERINK; SVELKOU; WIEGERTJES, 2006) em seu estudo com carpas (*C. carpio L.*), que também observou baixos níveis de expressão de arginase 1 no fígado. Sugerindo assim que essas pequenas alterações observadas estejam mais relacionadas com algum outro processo biológico não avaliado, e não em resposta à imunização por *I. multifiliis*.

Em relação a isoforma 2 suas funções vão desde a produção de ornitina como precursor de poliaminas, glutamato e biossíntese de prolina (que possuem importante funções na proliferação celular e produção de colágeno para a cura de lesões) (JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996), síntese de ureia para osmoregulação (WITHERS, 1998), participação na regulação da ativação alternativa de macrófagos de peixes (JOERINK; SVELKOU; WIEGERTJES, 2006) e regulação do nível de arginina para síntese de óxido nítrico (NO) (LI, H. et al., 2001). Diferentemente da arginase 1 à regulação da arginase 2 neste experimento apresentou alterações significativas para *P. corruscans* as 6 e 18 horas no baço, as 6 h no fígado e as 6, 18 e 24 horas no rim cranial e para *P. reticulatum* a 6 e 18 horas, indicando assim uma participação na defesa contra *I. multifiliis* de ambos os peixes. O que corrobora com observado por (JOERINK; SVELKOU; WIEGERTJES, 2006) que observou somente aumento da arginase 2 e não da arginase 1 no rim cranial de *C. carpio* infectada com LPS.

Este aumento na regulação da arginase 2 em *P. corruscans* e *P. reticulatum* imunizados com *I. multifiliis* pode estar relacionado com um importante papel desta enzima na ativação alternativa dos macrófagos, que estão envolvidos nas respostas imunes de tipo II (WIEGERTJES; JOERINK, 2004). Além disso a produção da arginase 2 pode estar relacionada ao controle da quantidade de L-arginina uma vez que esta enzima catalisa a hidrólise de L-arginina do espaço extracelular para

L-ornitina e ureia (SEVERIN; EL-MATBOULI, 2007). Em infecções parasitárias, acredita-se que o controle metabólico da L-arginina é extremamente importante, visto que a produção de NO pela enzima iNOS está extremamente relacionado as concentrações de L-arginina, que é um potente mediador de processo inflamatório e possui atividade bactericida (KOPPANG et al., 2007), e quando produzido em excesso, gera um ambiente citotóxico para as próprias células hospedeiras (RIEGER; BARREDA, 2011). Desta forma, o aumento na expressão e atividade da arginase pode favorecer a replicação de fibroblastos e produção de colágeno, necessário para reparo dos tecidos e cura de lesões.

Diversos pesquisadores vêm ao longo dos anos tentando elucidar a expressão gênica da enzima da arginase em peixes como parte da resposta imunológica frente à algum tipo de infecção bacteriológica ou parasitária. De acordo com JOERINK et al. (2006) a carpa comum (*C. carpio*) teve um aumento na expressão do arginase 1 em vez da arginase 2 no rim cranial após a infecção com o protozoário *Trypanosoma carassii*. GONZALEZ et al. (2007) reportaram que lesões cutâneas induziram um aumento da expressão da arginase 2, mas não na expressão do gene da arginase 1 durante as primeiras horas após os primeiros sinais de danos na pele. CHADZINSKA et al. (2008) constataram que a injeção de zósmio (substância derivada da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*) na região peritoneal de carpa comum (*C. carpio*) resultou em um influxo de fagócitos com aumento da expressão gênica de, diversos fatores imunológicos inclusive da arginase 2 (arginase 1 não foi mensurada). Evidenciando assim, que as isoformas 1 e 2 das enzima arginase podem ser expressas de diferentes maneiras nos peixes de acordo com o impulso imunológico aplicado. Esse é o primeiro trabalho que avaliou a expressão das duas isoformas da arginase (arginase 1 e arginase 2) em resposta a imunização do parasita por *I. multifiliis* em *P. corruscans* e *P. reticulatum*. Com isso novos estudos são necessários para a confirmação da participação desta enzima na defesa do hospedeiro frente infecções parasitárias.

A interleucina (IL)-1 β é membro de uma família de citocinas que inclui interleucina-1, receptor da interleucina-1 (IL-1ra), interleucina IL-18 e uma série de outras moléculas (SMITH et al., 2000). Esta família citocinas de interleucina-1 (IL-1) é considerada um importante mediador da inflamação que pode induzir a expressão de uma grande variedade de genes associados a funções durante a infecção (BIRD et al., 2002). Além disso, a IL-1 β possui um importante papel na indução de respostas pró-inflamatória (DINARELLO, C. A., 1997) como um componente essencial do inflammosoma que é produzido por uma variedade de células, principalmente monócitos de sangue e macrófagos tecidual (PLEIC et al., 2014). Devido à capacidade que a interleucina IL-1 β possui de aumentar a atividade dos fagócitos, a proliferação de macrófagos, síntese de lisozima e a migração de leucócitos (DINARELLO, C. A., 1997) ela desempenha um papel fundamental na resposta do hospedeiro à invasão microbiana, injúria tecidual e até mesmo doenças autoimunes (DINARELLO, C. A., 2003). Neste estudo foi observado que a expressão da IL-1 β no pintado *P. corruscans* teve um aumento significativo em sua expressão as 24 h no fígado e 18 e 24 horas no rim cranial. Já para a cachara *P. reticulatum* pode ser observado diferença significativa apenas em relação do grupo imunizado ao grupo controle para todos os órgãos.

Esses resultados se assemelham com observado em outros trabalhos que também avaliaram a expressão do gene responsável pela IL-1 β em peixe imunizados com *I. multifiliis*. Onde MOREIRA et al. (2017) identificaram aumento na expressão na pele de *I. punctatus* as 4 e 24 horas após imunização com terontes. Nesta mesma espécie de peixe XU et al. (2016) e XU et al. (2017) também constatarem um aumento na expressão deste gene no rim cranial as 4 e 24 horas, no fígado as 4, 24, 48 e 240 horas e no baço as 4, 24, 48, 144 e 240 horas, após imunização com o *I. multifiliis*. Possivelmente, este aumento na expressão da IL-1 β ocorreu devido à lesões internas na região peritoneal ocasionado pelo parasita (GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN, 2007) o qual pôde ter estimulado os macrófagos a produzir IL-1, COX-2 e MHC classe II para aumentar a sua

capacidade fagocíticas (HONG et al., 2001). Além disso, o aumento na expressão de IL1- β observado nos peixes imunizados com *I. multifiliis* pode estimular a síntese de outras quimiocinas derivadas de macrófagos que estão envolvidas na regulação da migração de leucócitos (WU et al., 2015).

Assim como IL1- β a IL-8 é considerada uma importante citocinas pró-inflamatória devido a sua atuação nas fases iniciais dos processos inflamatórios (DINARELLO, C. A., 1997). Mais especificamente a IL-8 é considera um quimiocina devido a sua participação nos movimentos quimiotáticos em reações inflamatórias (HERATH et al., 2016). Esta quimiocina é pertencentes a um grupo de pequenas proteínas que possuem de 8-12 KDa contendo um domínio de resíduo CXC conservado (C-cisteína, X-qualquer outro resíduo) proximal ao seu N-terminal (ALLEN; CROWN; HANDEL, 2007). Os membros da família de quimiocinas que CXC geralmente possuem um domínio ELR que possuem um importante papel na atração do neutrófilos (ROSENKILDE; SCHWARTZ, 2004) e em contrapartida as quimiocinas CXC sem o domínio ELR, atraem linfócitos ou monócitos, mas não neutrófilos (WANG, G. L. et al., 2017). Como citado anteriormente em peixes o domínio ELR e substituído por outro domínios nos peixes que acredita que estes também possam participar no recrutamento de linfócito e macrófagos (WANG, G. L. et al., 2017).

Nos peixes pintado (*P. corruscans*) e cachara (*P. reticulatum*) imunizados com o parasita *I. multifiliis* pode ser observado um aumento na expressão do gene responsável pela quimiocina IL-8 e todo os órgãos, porém somente o baço de ambos os peixes tiveram aumentos significativos. Onde para *P. corruscans* ocorreu as somente as 18 h enquanto para *P. reticulatum* ocorreu as 6 e 18 horas após imunização. Esses resultados se assemelham com observado por (OLSEN et al., 2011) que notou um aumento na expressão da IL-8 na brânquia de truta do arco-íris (*O. mykiss*) imunizados com parasita *I. multifiliis*. De acordo com CROSS; MATTHEWS (1993) e HINES, R.

S. ; SPIRA (1974) o aumento da IL-8 teve efeito no recrutamento de neutrófilos para a epiderme de carpa comum (*C. carpio*) infectada por *I. multifiliis*. Demonstrando assim a que a expressão de IL-8 é um importante fator no recrutamento de neutrófilos, mas a localização exata e o tipo de células que expressam IL-8 durante a infecção por *I. multifiliis* ainda precisam ser descobertos.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é considerado uma importante proteína do sistema imunológico inato produzido como transmembranar de tipo II, que é clivada no domínio C-terminal (TACE) extracelular para libertar um peptídeo maduro biologicamente ativo (SECOMBES et al., 2001) com efeito pro-inflamatório, produzida por várias células, incluindo macrófagos / monócitos, linfócitos T e B e células NK (TRACEY; CERAMI, 1993), que é co-expressa com mediadores inflamatórios derivados de macrófagos, tais como IL-8, COX-2 e iNOS em peixes com infecção parasitária e bacteriana (ALVAREZ-PELLITERO, 2008; COVELLO et al., 2009; HARUN; WANG; SECOMBES, 2011; OLADIRAN; BEAUPARLANT; BELOSEVIC, 2011). Em mamíferos se tem evidências de que o TNF- α tem a capacidade de regular as funções imunes através da resposta inflamatória (BAUD; KARIN, 2001). Através da indução, proliferação, diferenciação ou apoptose celular no sistema imunológico dependendo dos tipos de células e dos desafios imunológicos (GOETZ; PLANAS; MACKENZIE, 2004). Em peixes, esta citocina foi encontrada expressa constitutiva na pele e sangue de carpa comum (*C. carpio*) (GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN, 2007). Em contraste HIRONO et al. (2000) não identificou uma expressão constitutiva em diversos tecidos de *Paralychthys olivaceus*. Presumindo assim, que peixes podem expressar diferentes níveis de transcrição de TNF- α (LAING et al., 2001). Em estudos que avaliaram a expressão gênica da citocina TNF- α em peixes infectados com parasita *I. multifiliis* observaram um aumento em sua regulação como descrito por GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN (2007) que relataram um aumento na expressão do gene TNF- α em

carpa (*C. carpio*), enquanto, XU et al. (2016) também identificaram aumento na regulação do gene TNF- α no rim cranial de *I. punctatus* 4 h e 24 h após a imunização com *I. multifiliis*.

Neste experimento as alterações do gene TNF- α observados em *P. corruscans* e *P. reticulatum* também tiveram aumento em suas expressões assim como relatado pelos trabalhos citados. Porém para *P. corruscans* pode ser notado diferenças estatísticas somente do grupo imunizado em relação ao grupo controle para o rim cranial. Em relação ao *P. reticulatum* pode ser observado varrições significativas nos períodos 6h e 18h para baço. O aumento na expressão da TNF- α identificada neste trabalho pode esta relacionado pela ativação dos leucócitos e macrófagos para combater a infecção do *I. multifiliis* como demonstrado por LAING et al. (2001) em truta infectada com LPS.

De acordo com DICKERSON, H.W; DAWE (1995) quando terontes vivos são injetados em peixe, esta forma do parasita pode sobreviver dias até semanas dentro da cavidade peritoneal, ocasionado danos nos tecidos do hospedeiro e assim ativando a resposta imunológica inata (DICKERSON, H. W.; FINDLY, 2014). Além disso, as proteínas de membrana de superfície ancoradas GPI estimulam ainda mais a resposta imunológica (DICKERSON, H. W.; FINDLY, 2014). De acordo com XU; KLESIUS; SHELBY (2004) a imunização de peixes com terontes vivos por injeção intraperitoneal (IP) é, o métodos mais eficazes para induzir uma forte resposta imune contra *I. multifiliis*. Experimentos realizados com várias espécies de peixes apontam respostas imunes bastantes divergentes, indicando assim que a resposta imunológica é variável de acordo com o hospedeiro (XU; KLESIUS; SHELBY, 2004; XU; KLESIUS; SHOEMAKER, 2009; YAO et al., 2010; MARTINS et al., 2011; OLSEN et al., 2011; XU et al., 2016; MOREIRA et al., 2017).

Neste estudo foi observado que em alguns genes tiveram a diminuição da expressão gênica do grupo imunizado em relação ao grupo controle como por exemplo as 12 h para *P. corruscans* e as 18 h para *P. reticulatum*. Este declino na expressão pode esta relacionado com observado por

OLSEN et al. (2011) em um estudo realizado com truta do arco-íris (*O. mykiss*) imunizadas com *I. multifiliis* onde foi observado uma queda na expressão de IL-1b e IL-8, IL-6 na brânquia, o qual o autor relacionou esta queda com uma mudança no padrão de recrutamento de leucócitos para as áreas infectadas.

Além disso, neste estudo pode ser observado um padrão de diferença na expressão dos órgão baço, fígado e rim cranial nos dois peixes pintado (*P. corruscans*) e (*P. reticulatum*). Esta diferença também foi observada nas pesquisas de XU et al. (2016); XU et al. (2017) em *I. punctatus* imunizado com *I. multifiliis* onde o baço, fígado e rim cranial tiveram um padrão de expressão diferente. Esses dados também se assemelham com observado por CARRIEIRO (2016) em *Piaractus mesopotamicus* infectado com *Aeromonas dhakensis*, o qual a diferença observada no balanço entre a expressão dos genes avaliados no fígado e baço foi relacionado com o fato de que as células destes tecido pertencem a linhagens diferentes, sendo assim eles respondem de diferentes maneiras quando estimuladas.

O presente estudo fornece, pela primeira vez, a caracterização e dados da expressão de genes que participam da imunidade inata de *P. corruscans* e *P. reticulatum* imunizados com *I. multifiliis* um dos mais importantes protozoários para criações de peixes ornamental e de piscicultura do mundo. Estes estudos abrem caminhos para novos conhecimentos a respeito da interação parasita-hospedeiro, abrindo perspectivas para o controle do protozoário através de vacinas.

9. CONCLUSÃO

Através das análises realizadas no presente estudo foi possível se obter as seguintes conclusões:

- A manutenção do parasita *I. multifiliis* se mostrou eficiente quando realizada com *P. corruscans* que não nunca tiveram contato previamente com este parasita.
- As sequências parciais do nucleotídeos dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α de *P. corruscans* e *P. reticulatum* possuem grande similaridade entre si e entre às sequências de outros peixes depositada no Genbank.
- As sequências parciais dos aminoácidos dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , TNF- α e da sequência completa (CDS) da IL-8 de *P. corruscans* e *P. reticulatum* possuem grande similaridade entre si e entre às sequências de outros peixes e humanos depositada no Genbank.
- Os peixes *P. corruscans* e *P. reticulatum* possuem padrão diferente na expressão dos genes arginase 1, arginase 2, IL1- β , IL-8 e TNF- α quando imunizados com *I. multifiliis*.
- O rim cranial do *P. corruscans* foi o tecido que se mostrou mais envolvido na resposta contra o parasita *I. multifiliis*.
- O baço de *P. reticulatum* foi o tecido que se mostrou mais envolvido na resposta contra o parasita *I. multifiliis*.

10. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. **Basic Immunology**: Saunders 2008, v.3

AHMADIVAND, S.; SOLTANI, M.; BEHDANI, M.; EVENSEN, O.; ALIRAHIMI, E.; HASSANZADEH, R.; SOLTANI, E. Oral DNA vaccines based on CS-TPP nanoparticles and alginate microparticles confer high protection against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection in trout. **Developmental and Comparative Immunology**, v., n., p., 2017.

AIHUA, L.; BUCHMANN, K. Temperature- and salinity-dependent development of a Nordic strain of *Ichthyophthirius multifiliis* from rainbow trout. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, n. 6, p. 273-276, 2001.

ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine: Receptor structure, interactions, and antagonism. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n., p. 787-820, 2007.

ALVAREZ-PELLITERO, P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 126, n. 3-4, p. 171-198, 2008.

ASH, D. E. Structure and function of arginases. **J Nutr**, v. 134, n. 10 Suppl, p. 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S, 2004.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 9, p. 372-377, 2001.

BAUER, O. N. [Immunity of fish to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet infection]. **Dokl Akad Nauk SSSR**, v. 93, n. 2, p. 377-379, 1953.

BECK, G.; HABICHT, G. S. Immunity and the invertebrates. **Sci Am**, v. 275, n. 5, p. 60-63, 66, 1996.

BIGNOTTO, T. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; MANIGLIA, T. C.; BONI, T. A.; LUCIO, L. C.; GOMES, V. N.; PRIOLI, R. A.; OLIVEIRA, A. V.; JULIO, H. F.; PRIOLI, L. M. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Parana River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 681-689, 2009.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system Brazilian studies. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 86, n. 3, p. 1483-1495, 2014.

BIRD, S.; ZOU, J.; WANG, T.; MUNDAY, B.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, C. J. Evolution of interleukin-1beta. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 6, p. 483-502, 2002.

BOWDEN, T. J.; COOK, P.; ROMBOUT, J. H. W. M. Development and function of the thymus in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, n. 5, p. 413-427, 2005.

BRABO, M. F.; PEREIRA, L. F. S.; SANTANA, J. V. M.; CAMPELO, D. A. V.; VERAS, G. C. Current scenario of fish production in the world, Brazil and Pará State: emphasis on aquaculture. **Acta Fish. Aquat. Res.**, v. 4, n. 2, p. 50-58, 2016.

BRESSAN, F. F.; DOS SANTOS MIRANDA, M.; PERECIN, F.; DE BEM, T. H.; PEREIRA, F. T.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M.; ALVES, D.; STRAUSS, B.; BAJGELMAN, M.; KRIEGER, J. E.; BINELLI, M.; MEIRELLES, F. V. Improved production of genetically modified fetuses with homogeneous transgene expression after transgene integration site analysis and recloning in cattle. **Cell Reprogram**, v. 13, n. 1, p. 29-36, 2011.

BROMAGE, E. S.; KAATTARI, I. M.; ZWOLLO, P.; KAATTARI, S. L. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. **J Immunol**, v. 173, n. 12, p. 7317-7323, 2004.

BUCHMANN, K.; BRESCIANI, J. Parasitic infections in pond-reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Denmark. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 28, n. 2, p. 125-138, 1997.

BUCHMANN, K.; NIELSEN, M. E. Chemoattraction of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) theronts to host molecules. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 9, p. 1415-1423, 1999.

BUCHMANN, K.; SIGH, J.; NIELSEN, C. V.; DALGAARD, M. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. **Vet Parasitol**, v. 100, n. 1-2, p. 105-116, 2001.

BITRAGO-SUAREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes : Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p. 1-38, 2007.

BUONOCORE, F.; MAZZINI, M.; FORLENZA, M.; RANDELLI, E.; SECOMBES, C. J.; ZOU, J.; SCAPIGLIATI, G. Expression in *Escherichia coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin 1beta, a possible immunoadjuvant in aquaculture. **Mar Biotechnol (NY)**, v. 6, n. 1, p. 53-59, 2004.

BUONOCORE, F.; RANDELLI, E.; CASANI, D.; COSTANTINI, S.; FACCHIANO, A.; SCAPIGLIATI, G.; STET, R. J. M. Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II beta chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 4, p. 853-866, 2007.

BURKART, M. A.; CLARK, T. G.; DICKERSON, H. W. Immunization of Channel Catfish, *Ictalurus-Punctatus Rafinesque*, against *Ichthyophthirius-Multifiliis* (Fouquet) - Killed Versus Live Vaccines. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, n. 5, p. 401-410, 1990.

BYON, J. Y.; OHIRA, T.; HIRONO, I.; AOKI, T. Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, n. 2, p. 135-147, 2005.

CAMACHO, P. M. **Developing strategies for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (CILIOPHORA)**. University of Stirling, University of Stirling, 2010.

CAMPOS, J. L. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: Baldisserotto, B. e Gomes, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2010, p.335-361.

CANELLA, M. F.; ROCHHI-CANELLA, I. Biologie des Ophryoglenina (ciliés hyménostermes, histophages). **Annals of the University of Ferrara**, v. 2, n., p. 1-510, 1976.

CARNEIRO, F. C. P.; SCHORER, M.; MIKOS, D. J. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiás (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n., p. 99-102, 2005.

CARRIEIRO, M. M. **Caracterização e análise de expressão dos genes das enzimas Arginase 1, Arginase 2 e Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) de *Piaractus mesopotamicus* em resposta à infecção por *Aeromonas dhakensis***. Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Campinas, São Carlos, 2016. 102 p.

CARVALHO, D. C. A.; C., S. D.; B., M. A.; D., S.; PIMENTA, D. A. A. O. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n., p. 215-219, 2008.

CARVALHO-COSTA, L. F.; PIORSKI, N. M.; WILLIS, S. C.; GALETTI, P. M.; ORTI, G. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, n. 1, p. 177-194, 2011.

CECCARELLI, P. S.; FIGUEIRA, L. B.; FERRAZ DE LIMA, C. L. B.; OLIVEIRA, C. A. Observações sobre a ocorrência de parasitos no CEPTA entre 1983 e 1990. **Bol.Tec. CEPTA**, v. 3, n., p. 43-54., 1990.

CEDERBAUM, S. D.; YU, H.; GRODY, W. W.; KERN, R. M.; YOO, P.; IYER, R. K. Arginases I and II: do their functions overlap? **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 81, n., p. S38-S44, 2004.

CHADZINSKA, M.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; PLYTYCZ, B.; KEMENADE, B. M. L. V. V. In vivo kinetics of cytokine expression during peritonitis in carp: Evidence for innate and alternative macrophage polarization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 5, p. 509-518, 2008.

CHEN, L. C.; CHEN, J. Y.; HOUR, A. L.; SHIAU, C. Y.; HUI, C. F.; WU, J. L. Molecular cloning and functional analysis of zebrafish (*Danio rerio*) chemokine genes. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 151, n. 4, p. 400-409, 2008.

CHEN, L. Q.; HE, C. B.; BAOPRASERTKUL, P.; XU, P.; LI, P.; SERAPION, J.; WALDBIESER, G.; WOLTERS, W.; LIU, Z. J. Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, n. 2, p. 135-142, 2005.

CLARK, T. G.; DICKERSON, H. W.; FINDLY, R. C. Immune-Response of Channel Catfish to Ciliary Antigens of *Ichthyophthirius-Multifiliis*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 12, n. 3, p. 581-594, 1988.

CLARK, T. G.; GAO, Y.; GAERTIG, J.; WANG, X.; CHENG, G. The I-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI-anchored proteins. **J Eukaryot Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 332-337, 2001.

COVELLO, J. M.; BIRD, S.; MORRISON, R. N.; BATTAGLENE, S. C.; SECOMBES, C. J.; NOWAK, B. F. Cloning and expression analysis of three striped trumpeter (*Latris lineata*) pro-inflammatory cytokines, TNF-alpha, IL-1beta and IL-8, in response to infection by the ectoparasitic, *Chondracanthus goldsmidi*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 26, n. 5, p. 773-786, 2009.

CROSS, M. L.; MATTHEWS, R. A. Localized Leukocyte Response to Ichthyophthirius-Multifiliis Establishment in Immune Carp Cyprinus-Carpio L. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 38, n. 3-4, p. 341-358, 1993.

DA SILVA, E. R.; CASTILHO, T. M.; PIOKER, F. C.; SILVA, C. H. T. D.; FLOETER-WINTER, L. M. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase and its protein structure prediction. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 727-737, 2002.

DASH, P.; PATEL, S.; DIXIT, A.; GARG, L. C.; SAHOO, P. K. Four pro-inflammatory cytokines of rohu (Labeo rohita) during early developmental stages, their tissue distribution and expression by leucocytes upon in-vitro stimulation. **Fish Shellfish Immunol**, v. 47, n. 2, p. 913-922, 2015.

DASHU, N.; LIEN-SIANG, L. Studies on the morphology and life cycle of Ichthyophthirius multifiliis and its control, with a description of a new species. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 2, n., p. 213-215, 1960.

DE CARVALHO, D. C.; SEERIG, A. S.; BRASIL, B. D. A. F.; CREPALDI, D. V.; DE OLIVERIA, D. A. A. Molecular identification of the hybrid between the catfish species Pseudoplatystoma corruscans and Pseudoplatystoma reticulatum using a set of eight microsatellite markers. **Journal of Fish Biology**, v. 83, n. 3, p. 671-676, 2013.

DICKERSON, H.; CLARK, T. Ichthyophthirius multifiliis: a model of cutaneous infection and immunity in fishes. **Immunological Reviews**, v. 166, n., p. 377-384, 1998.

DICKERSON, H. W.; CLARK, T. G.; LEFF, A. A. Serotypic Variation among Isolates of Ichthyophthirius-Multifiliis Based on Immobilization. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 816-820, 1993.

DICKERSON, H. W.; DAWE, D. L. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In: (Ed.). **Fish diseases and disorders**. CAB International, Wallingford: Woo, P.T.K. , 1995, p.181-227.

DICKERSON, H. W.; CLARK, T. G. Immune response of fishes to ciliates. **Annu Rev Fish Dis**, v. 6, n., p. 107-120, 1996.

DICKERSON, H. W. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (phylum Ciliophora). In: (Ed.). **Fish Diseases and Disorders**. CAB International, Wallingford, UK: Woo, P.T.K., 2006. v.1, p.116-153. .

DICKERSON, H. W.; FINDLY, R. C. Immunity to Ichthyophthirius infections in fish: a synopsis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 43, n. 2, p. 290-229, 2014.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, n. 4, p. 253-265, 1997.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 family (IL-1F1, F2). In: Thomson, A. e Lotze, M. (Ed.). **The cytokine handbook**. London: Elsevier Science, 2003, p.643-668.

DO PRADO, F. D.; HASHIMOTO, D. T.; MENDONCA, F. F.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 12, p. 1890-1894, 2011.

DZIK, J. M. Evolutionary roots of arginase expression and regulation. **Front Immunol**, v. 5, n., p. 544, 2014.

EIRAS, J. C.; SEGNER, H.; WAHLI, T.; KAPOOR, G. B. **Fish diseases** Enfield, Jersey, Plymouth, 2008, v.2

EISENSTEIN, T. K.; HUANG, D.; MEISSLER, J. J.; ALRAMADI, B. Macrophage Nitric-Oxide Mediates Immunosuppression in Infectious Inflammation. **Immunobiology**, v. 191, n. 4-5, p. 493-502, 1994.

EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia Culture**. ambridge, MA, USA: CAB International Publishing, 2006
EWING, M. S.; KOCAN, K. M.; EWING, S. A. Ichthyophthirius-Multifiliis - Morphology of the Cyst Wall. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 102, n. 2, p. 122-128, 1983.

EWING, M. S.; KOCAN, K. M. Ichthyophthirius-Multifiliis (Ciliophora) Development in Gill Epithelium. **Journal of Protozoology**, v. 33, n. 3, p. 369-374, 1986.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**: secondary title. ROME: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**: secondary title: Contributing to food security and nutrition for all. Rome.200 pp, 2016.

GHAYUR, T.; BANERJEE, S.; HUGUNIN, M.; BUTLER, D.; HERZOG, L.; CARTER, A.; QUINTAL, L.; SEKUT, L.; TALANIAN, R.; PASKIND, M.; WONG, W.; KAMEN, R.; TRACEY, D.; ALLEN, H. Caspase-1

processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. **Nature**, v. 386, n. 6625, p. 619-623, 1997.

GOETZ, F. W.; PLANAS, J. V.; MACKENZIE, S. Tumor necrosis factors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 487-497, 2004.

GOLOSOVA, O.; HENDERSON, R.; VASKIN, Y.; GABRIELIAN, A.; GREKHOV, G.; NAGARAJAN, V.; OLER, A. J.; NONES, M. Q.; HURT, D.; FURSOV, M.; HUYEN, Y. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. **Peerj**, v. 2, n., p., 2014.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo, 2011

GONZALEZ, S. F.; HUISING, M. O.; STAKAUSKAS, R.; FORLENZA, M.; LIDY VERBURG-VAN KEMENADE, B. M.; BUCHMANN, K.; NIELSEN, M. E.; WIEGERTJES, G. F. Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: inflammatory responses to injury mimicking infection with ectoparasites. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 3, p. 244-254, 2007.

GONZALEZ, S. F.; BUCHMANN, K.; NIELSEN, M. E. Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: inflammatory responses caused by the ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 22, n. 6, p. 641-650, 2007.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GRASSO, V.; PADILLA, D.; BRAVO, J.; ROMAN, L.; ROSARIO, I.; ACOSTA, B.; VEGA, B.; EL AAMRI, F.; ESCUELA, O.; RAMOS-VIVAS, J.; ACOSTA, F. Immunization of sea bream (*Sparus aurata*) juveniles against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* by short bath: Effect on some pro-inflammatory molecules and the Mx gene expression. **Fish Shellfish Immunol**, v. 46, n. 2, p. 292-296, 2015.

GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. Molecular characterization of novel interferon gamma receptor 1 isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) and goldfish (*Carassius auratus* L.). **Mol Immunol**, v. 46, n. 15, p. 3050-3059, 2009.

HAAS, W.; HABERL, B.; HOFMANN, M.; KERSCHENSTEINER, S.; KETZER, U. *Ichthyophthirius multifiliis* invasive stages find their fish hosts with complex behavior patterns and in response to different chemical signals. **European Journal of Protistology**, v. 35, n., p. 129-135, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symp**, v. 41, n., p. 95-98, 1999.

HANSON, T. R.; SHAIK, S.; COBLE, K. H.; EDWARDS, S.; MILLER, J. C. Identifying risk factors affecting weather-and disease-related losses in the U.S. farm-raised catfish industry. **Agric. Resour. Econ. Rev**, v. 37, n., p. 27-40, 2008.

HARUN, N. O.; WANG, T. H.; SECOMBES, C. J. Gene expression profiling in naive and vaccinated rainbow trout after *Yersinia ruckeri* infection: Insights into the mechanisms of protection seen in vaccinated fish. **Vaccine**, v. 29, n. 26, p. 4388-4399, 2011.

HASHIMOTO, D. T.; DO PRADO, F. D.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 876-884, 2013.

HEINECKE, R. D.; BUCHMANN, K. Inflammatory response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) larvae against *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 2, p. 521-528, 2013.

HERATH, H. M.; ELVITIGALA, D. A.; GODAHEWA, G. I.; UMASUTHAN, N.; WHANG, I.; NOH, J. K.; LEE, J. Molecular characterization and comparative expression analysis of two teleostean pro-inflammatory cytokines, IL-1beta and IL-8, from *Sebastes schlegelii*. **Gene**, v. 575, n. 2 Pt 3, p. 732-742, 2016.

HINES, R. S.; SPIRA, D. T. *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. I. Course of infection. **Journal of Fish Biology**, v. 5, n., p. 385-392, 1973.

HINES, R. S.; SPIRA, D. T. *Ichthyophthiriasis* in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. III. **Pathology. Journal of Fish Biology**, v. 6, n., p. 189-196, 1974.

HIRD, F. J. R. The Importance of Arginine in Evolution. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 85, n. 2, p. 285-288, 1986.

HIRONO, I.; NAM, B. H.; KUROBE, T.; AOKI, T. Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **J Immunol**, v. 165, n. 8, p. 4423-4427, 2000.

HOFFMAN, G. L. **Parasites of North American Fishes**. Berkeley: University of California Press, 1970

HOGQUIST, K. A.; NETT, M. A.; UNANUE, E. R.; CHAPLIN, D. D. Interleukin-1 Is Processed and Released during Apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 19, p. 8485-8489, 1991.

HONG, S.; ZOU, J.; CRAMPE, M.; PEDDIE, S.; SCAPIGLIATI, G.; BOLS, N.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, C. J. The production and bioactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 beta. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 81, n. 1-2, p. 1-14, 2001.

HOWARD, A. D.; KOSTURA, M. J.; THORNBERRY, N.; DING, G. J. F.; LIMJUCO, G.; WEIDNER, J.; SALLEY, J. P.; HOGQUIST, K. A.; CHAPLIN, D. D.; MUMFORD, R. A.; SCHMIDT, J. A.; TOCCI, M. J. IL-1-Converting Enzyme Requires Aspartic-Acid Residues for Processing of the IL-1-Beta Precursor at 2 Distinct Sites and Does Not Cleave 31-Kda IL-1-Alpha. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 9, p. 2964-2969, 1991.

HUISING, M. O.; STOLTE, E.; FLIK, G.; SAVELKOUL, H. F. J.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L. CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, n. 10, p. 875-888, 2003.

INOUE, Y.; HARUTA, C.; USUI, K.; MORITOMO, T.; NAKANISHI, T. Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA. **Fish Shellfish Immunol**, v. 14, n. 3, p. 275-281, 2003.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 114, n. 1, p. 107-132, 1996.

JOERINK, M.; SAVELKOUL, H. F.; WIEGERTJES, G. F. Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Mol Immunol**, v. 43, n. 8, p. 1116-1128, 2006.

JOERINK, M.; FORLENZA, M.; RIBEIRO, C. M.; DE VRIES, B. J.; SAVELKOUL, H. F.; WIEGERTJES, G. F. Differential macrophage polarisation during parasitic infections in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Shellfish Immunol**, v. 21, n. 5, p. 561-571, 2006.

JORGENSEN, T. R.; LARSEN, T. B.; BUCHMANN, K. Parasite infections in recirculated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. **Aquaculture**, v. 289, n. 1-2, p. 91-94, 2009.

KAJUNGIRO, R. A.; XUE, L.; AYNEALEM, M. Molecular cloning and expression patterns of two tumor necrosis factor alpha genes in crucian carp (*Carassius carassius*). **Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 120-129, 2015.

KENDRICK, A. A.; HOLLIDAY, M. J.; ISERN, N. G.; ZHANG, F. L.; CAMILLONI, C.; HUYNH, C.; VENDRUSCOLO, M.; ARMSTRONG, G.; EISENMESSER, E. Z. The dynamics of interleukin-8 and its interaction with human CXC receptor 1 peptide. **Protein Science**, v. 23, n. 4, p. 464-480, 2014.

KIM, H. J.; YASUIKE, M.; KONDO, H.; HIRONO, I.; AOKI, T. Molecular characterization and gene expression of a CXC chemokine gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 23, n. 6, p. 1275-1284, 2007.

KOPPANG, E. O.; FISCHER, U.; SATOH, M.; JIRILLO, E. Inflammation in fish as seen from a morphological point of view with special reference to the vascular compartment. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 36, p. 3649-3655, 2007.

KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L.; BRUM, J. A. Surubim: produção intensiva no Projeto Pacu Ltda. e Agroepeixe Ltda. **Panor. Aquiculture**, v. 49, n., p. 25-32, 1998.

KUM, C.; SEKKIN, S. The Immune System Drugs in Fish: Immune Function, Immunoassay, Drugs. In: Aral, F. (Ed.). **Recent Advances in Fish Farms**, 2011, LAING, K. J.; WANG, T.; ZOU, J.; HOLLAND, J.; HONG, S.; BOLS, N.; HIRONO, I.; AOKI, T.; SECOMBES, C. J. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α . **Eur J Biochem**, v. 268, n. 5, p. 1315-1322, 2001.

LAING, K. J.; ZOU, J. J.; WANG, T. H.; BOLS, N.; HIRONO, I.; AOKI, T.; SECOMBES, C. J. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, n. 5, p. 433-444, 2002.

LEE, E. Y.; PARK, H. H.; KIM, Y. T.; CHOI, T. J. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Gene**, v. 274, n. 1-2, p. 237-243, 2001.

LI, H.; MEININGER, C. J.; HAWKER, J. R.; HAYNES, T. E.; KEPKA-LENHART, D.; MISTRY, S. K.; MORRIS, S. M.; WU, G. Y. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 1, p. E75-E82, 2001.

LI, H. Y.; CAI, Y.; XIE, P.; LI, G. Y.; HAO, L.; XIONG, Q. Identification and Expression Profiles of IL-8 in Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) in Response to Microcystin-LR. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 3, p. 537-545, 2013.

LINDENSTROM, T.; BUCHMANN, K.; SECOMBES, C. J. Gyrodactylus derjavini infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin. **Fish Shellfish Immunol**, v. 15, n. 2, p. 107-115, 2003.

LING, K. H.; SIN, Y. M.; LAM, T. J. A New Approach to Controlling Ichthyophthiriasis in a Closed Culture System of Fresh-Water Ornamental Fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 14, n. 5, p. 595-598, 1991.

LING, K. H.; SIN, Y. M.; LAM, T. J. Protection of Goldfish against Some Common Ectoparasitic Protozoans Using Ichthyophthirius-Multifiliis and Tetrahymena-Pyriformis for Vaccination. **Aquaculture**, v. 116, n. 4, p. 303-314, 1993.

LOKE, P.; NAIR, M. G.; PARKINSON, J.; GUILIANO, D.; BLAXTER, M.; ALLEN, J. E. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. **BMC Immunol**, v. 3, n., p. 7, 2002.

LOM, J.; CERKASOVOVA, A. Host-Finding in Invasive Stages of Ichthyophthirius-Multifiliis. **Journal of Protozoology**, v. 21, n. 3, p. 457-457, 1974.

LOM, J.; ROHDE, K.; DYKOVA, I. Studies on Protozoan Parasites of Australian Fishes .1. New Species of the Genera Coccoxyma Leger Et Hesse, 1907, Ortholinea Shulman, 1962 and Kudoa Meglitsch, 1947 (Myxozoa, Myxosporea). **Folia Parasitologica**, v. 39, n. 4, p. 289-306, 1992.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. Ciliates (phylum Ciliophora Doflein, 1901). In: Lom, J. e Dyková, I. (Ed.). **Protozoan Parasites of Fishes, Serie: Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences**. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1992. v.26, p.237-288.

LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, N. W. Family Pimelodidae. In: Reis, R. E., Kullander, S. O., *et al* (Ed.). **Check List of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p.432-446.

LYNN, D. H.; CORLISS, J. O. Ciliophora. In: Harrison, F. W. e Corliss, J. O. (Ed.). **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. New York: Wiley-Liss., 1991. v.1, p.333-469.

MACCOLL, E.; THERKELSEN, M. D.; SHERPA, T.; ELLERBROCK, H.; JOHNSTON, L. A.; JARIWALA, R. H.; CHANG, W.; GURTOWSKI, J.; SCHATZ, M. C.; MOZAMMAL HOSSAIN, M.; CASSIDY-HANLEY, D. M.; CLARK, T. G.; CHANG, W. J. Molecular genetic diversity and characterization of conjugation genes in the fish parasite Ichthyophthirius multifiliis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 86, n., p. 1-7, 2015.

MACLENNAN, R. F. Growth in the ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 2, n. 91, p. 1-13, 1942.

MAKI, J. L. **Ichthyophthirius multifiliis Infection and Elements of Mucosal Immunity in the Channel Catfish, (*Ictalurus punctatus*)**. The University of Georgia, 2002. 144 p.

MANNING, M. J.; NAKANISHI, T. The specific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G. e Nakanishi, T. (Ed.). **The fish immune system. Organism, pathogen and environment**. San Diego: Academic Press, 1996, p.103-205.

MARQUES, D. K. S. Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. Embrapa. **Embrapa Pantanal, Corumbá**. v., n., p., 2002.

MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; BOZZO, F. R.; PAIVA, A. M. F. C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of São Paulo, Brazil. **Acta Sci**, v. 24, n. 4, p. 981-985, 2002.

MARTINS, M. L.; XU, D. H.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 31, n. 6, p. 774-780, 2011.

MATTHEWS, R. A.; MATTHEWS, B. F.; EKLESS, L. M. *Ichthyophthirius multifiliis*: Observations on the life-cycle and indications of a possible sexual phase. **Folia Parasitologica**, v. 43, n. 3, p. 203-208, 1996.

MATTHEWS, R. A. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and *Ichthyophthiriosis* in Freshwater Teleosts. **Adv Parasitol**, v. 59, n., p. 159-241, 2005.

MOREIRA, G. S.; SHOEMAKER, C. A.; ZHANG, D.; XU, D. H. Expression of immune genes in skin of channel catfish immunized with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasite Immunol**, v. 39, n. 1, p., 2017.

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura - Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil**: secondary title: Brasília: República Federativa do Brasil., 2011.

MUKAIDA, N.; HARADA, A.; MATSUSHIMA, K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 9, n. 1, p. 9-23, 1998.

NAJAKSHIN, A. M.; MECHETINA, L. V.; ALABYEV, B. Y.; TARANIN, A. V. Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary divergence of chemokines. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 2, p. 375-382, 1999.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8841-8848, 2000.

NETT, M. A.; CERRETTI, D. P.; BERSON, D. R.; SEAVITT, J.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; BLACK, R. A.; CHAPLIN, D. D. Molecular cloning of the murine IL-1 beta converting enzyme cDNA. **J Immunol**, v. 149, n. 10, p. 3254-3259, 1992.

NGUYEN-CHI, M.; LAPLACE-BUILHE, B.; TRAVNICKOVA, J.; LUZ-CRAWFORD, P.; TEJEDOR, G.; PHAN, Q. T.; DUROUX-RICHARD, I.; LEVRAUD, J. P.; KISSA, K.; LUTFALLA, G.; JORGENSEN, C.; DJOUAD, F. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. **Elife**, v. 4, n., p., 2015.

NOBLE, A. C.; SUMMERFELT, S. T. Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 6, n., p. 65-92, 1996.

NOEL, W.; RAES, G.; HASSANZADEH GHASSABEH, G.; DE BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 3, p. 126-133, 2004.

OEHLERS, S. H. B.; FLORES, M. V.; HALL, C. J.; O'TOOLE, R.; SWIFT, S.; CROSIER, K. E.; CROSIER, P. S. Expression of zebrafish cxcl8 (interleukin-8) and its receptors during development and in response to immune stimulation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 3, p. 352-359, 2010.

OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M.; TEAM, U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, n. 8, p. 1166-1167, 2012.

OLADIRAN, A.; BEAUPARLANT, D.; BELOSEVIC, M. The expression analysis of inflammatory and antimicrobial genes in the goldfish (*Carassius auratus* L.) infected with *Trypanosoma carassii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 4, p. 606-613, 2011.

OLSEN, M. M.; KANIA, P. W.; HEINECKE, R. D.; SKJOEDT, K.; RASMUSSEN, K. J.; BUCHMANN, K. Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to *Ichthyophthirius*

multifiliis infections: Molecular and immunohistochemical studies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 3, p. 859-869, 2011.

PAPERNA, I. Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, n. 155-194, p., 1991.

PLEIC, I. L.; SECOMBES, C. J.; BIRD, S.; MLADINEO, I. Characterization of three pro-inflammatory cytokines, TNF alpha 1, TNF alpha 2 and IL-1 beta, in cage-reared Atlantic. bluefin tuna *Thunnus thynnus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, n. 1, p. 98-112, 2014.

POE, W. E.; WILSON, R. P. Absorption of Malachite Green by Channel Catfish. **Progressive Fish-Culturist**, v. 45, n. 4, p. 228-229, 1983.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; ALVES, A. L.; ALMEIDA, R. B. C.; SENHORINI, J. A.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piaucu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 195-202, 2008.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; PRADO, F. D.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 3, p. 643-647, 2013.

PRESS, C. M.; DANNEVIG, B. H.; LANDSVERK, T. Immune and Enzyme-Histochemical Phenotypes of Lymphoid and Nonlymphoid Cells within the Spleen and Head Kidney of Atlantic Salmon (*Salmo-Salar* L). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, n. 2, p. 79-93, 1994.

PRESS, C. M.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 309-318, 1999.

RAUTA, P. R.; NAYAK, B.; DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. **Immunology Letters**, v. 148, n. 1, p. 23-33, 2012.

RESENDE, E. K.; CATELLA, A. C.; NASCIMENTO, F. L.; PALMEIRAS, S. S.; PEREIRA, R. A. C.; LIMA, M. S.; ALMEIDA, V. L. L. **Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul. Brasil: Boletim de Pesquisa 02, Mato Grosso do Sul, 1996**
 RIEGER, A. M.; BARREDA, D. R. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1238-1245, 2011.

RINTAMAKIKINNUNEN, P.; VALTONEN, E. T. Epizootiology of protozoans in farmed salmonids at northern latitudes. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 89-99, 1997.

ROCA, F. J.; MULERO, I.; LOPEZ-MUNOZ, A.; SEPULCRE, M. P.; RENSHAW, S. A.; MESEGUER, J.; MULERO, V. Evolution of the inflammatory response in vertebrates: Fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 5071-5081, 2008.

ROGERS, W. A.; GAINES, J. L. **Lesions of protozoan diseases in fish**: secondary title. Madison, Wisconsin: University of Wisconsin Press., 1975, 117–141 p.

ROQUE, M.; DE PUYTORAC, P.; LOM, J. L. L'architecture buccale et la stomatogéne se d'Ichthyophthirius multifiliis Fouquet, 1876. **Protistologica**, v. 3, n., p. 77-90, 1967.

ROSENKILDE, M. M.; SCHWARTZ, T. W. The chemokine system - a major regulator of angiogenesis in health and disease. **Apmis**, v. 112, n. 7-8, p. 481-495, 2004.

SACHEFER, A. S. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidea: Loricariidae). In: Malabarba, L. R., Reis, R. E., *et al* (Ed.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998, p.375-400.
SAHA, N. R.; BEI, J. X.; SUETAKE, H.; ARAKI, K.; KAI, W.; KIKUCHI, K.; LIN, H. R.; SUZUKI, Y. Description of a fugu CXC chemokine and two CXC receptor genes, and characterization of the effects of different stimulators on their expression. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 6, p. 1324-1332, 2007.

SAKAMAKI, K.; SATOU, Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 4, p. 727-753, 2009.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, v. 177, n., p. 195-203, 2000.

SCHALCH, S. H. C.; BELO, M. A. A. A.; SOARES, V. E.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Brachiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Sci. Anim. Sci.**, v. 27, n. 2, p. 297-302, 2005.

SCRIBNER, K. T.; PAGE, K. S.; BARTRON, M. L. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n. 3, p. 293-323, 2000.

SEBRAE. **Aquicultura no Brasil - Série estudos mercadológicos**: secondary title, 2015.

SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G. e Nakanishi, T. (Ed.). **The fish immune system. Organism, pathogen and environment**. San Diego: Academic Press, 1996, p.63–101.

SECOMBES, C. J.; WANG, T.; HONG, S.; PEDDIE, S.; CRAMPE, M.; LAING, K. J.; CUNNINGHAM, C.; ZOU, J. Cytokines and innate immunity of fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 713-723, 2001.

SEPPOLA, M.; LARSEN, A. N.; STEIRO, K.; ROBERTSEN, B.; JENSEN, I. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 beta, IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Molecular Immunology**, v. 45, n. 4, p. 887-897, 2008.

SEVERIN, V. I. C.; EL-MATBOULI, M. Relative quantification of immune-regulatory genes in two rainbow trout strains, *Oncorhynchus mykiss*, after exposure to *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 1019-1027, 2007.

SHAN, X. F.; MENG, Q. F.; KANG, Y. H.; BIAN, Y.; GAO, Y. H.; WANG, W. L.; QIAN, A. D. Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). **Vet Parasitol**, v. 199, n. 3-4, p. 250-254, 2014.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W. Z.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SODING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n., p., 2011.

SIGH, J.; BUCHMANN, K. Comparison of immobilization assays and enzyme linked immunosorbent assays for detection of rainbow trout antibody-titres against *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, n. 1, p. 49-51, 2001.

SIGH, J.; LINDENSTROM, T.; BUCHMANN, K. The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 7, p. 409-417, 2004a.

SIGH, J.; LINDENSTROM, T.; BUCHMANN, K. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 17, n. 1, p. 75-86, 2004b.

SMITH, D. E.; RENSHAW, B. R.; KETCHEM, R. R.; KUBIN, M.; GARKA, K. E.; SIMS, J. E. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 1169-1175, 2000.

SOMMERSET, I.; KROSSOY, B.; BIERING, E.; FROST, P. Vaccines for fish in aquaculture. **Expert Rev Vaccines**, v. 4, n. 1, p. 89-101, 2005.

SRIVASTAVA, S.; RATHA, B. K. Unusual hepatic mitochondrial arginase in an Indian air-breathing teleost, *Heteropneustes fossilis*: Purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 164, n. 2, p. 133-141, 2013.

STRAUS, D. L.; MEINELT, T. Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1237-1241, 2009.

SUN, H. Y.; NOE, J.; BARBER, J.; COYNE, R. S.; CASSIDY-HANLEY, D.; CLARK, T. G.; FINDLY, R. C.; DICKERSON, H. W. Endosymbiotic Bacteria in the Parasitic Ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7445-7452, 2009.

SUZUKI, J. On the reproduction of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet in relation to water temperature. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 3, n. 265-272, p., 1935.

SWENNES, A. G.; NOE, J. G.; FINDLY, R. C.; DICKERSON, H. W. Differences in virulence between two serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 69, n. 2-3, p. 227-232, 2006.

SWENNES, A. G.; FINDLY, R. C.; DICKERSON, H. W. Cross-immunity and antibody responses to different immobilisation serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 6, p. 589-597, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; LEMOS, J. R.; MARTINS, M. L. Parasitic fauna of eight species of ornamental freshwater fish species from the middle Negro River in the Brazilian Amazon Region. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 2, p. 103-107, 2010.

THORNBERRY, N. A.; BULL, H. G.; CALAYCAY, J. R.; CHAPMAN, K. T.; HOWARD, A. D.; KOSTURA, M. J.; MILLER, D. K.; MOLINEAUX, S. M.; WEIDNER, J. R.; AUNINS, J.; ELLISTON, K. O.; AYALA, J. M.; CASANO, F. J.; CHIN, J.; DING, G. J. F.; EGGER, L. A.; GAFFNEY, E. P.; LIMJUCO, G.; PALYHA, O. C.; RAJU, S. M.; ROLANDO, A. M.; SALLEY, J. P.; YAMIN, T. T.; LEE, T. D.; SHIVELY, J. E.; MACCROSS, M.; MUMFORD, R. A.; SCHMIDT, J. A.; TOCCI, M. J. A Novel Heterodimeric Cysteine Protease Is Required for Interleukin-1-Beta Processing in Monocytes. **Nature**, v. 356, n. 6372, p. 768-774, 1992.

TIEMAN, D. M.; GOODWIN, A. E. Treatments for ich infestations in channel catfish evaluated under static and flow-through water conditions. **North American Journal of Aquaculture**, v. 63, n. 4, p. 293-299, 2001.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor-Necrosis-Factor, Other Cytokines and Disease. **Annual Review of Cell Biology**, v. 9, n., p. 317-343, 1993.

VAINI, J. O.; GRISOLIA, A. B.; DO PRADO, F. D.; PORTO-FORESTI, F. Genetic identification of interspecific hybrid of Neotropical catfish species (*Pseudoplatystoma corruscans* vs. *Pseudoplatystoma reticulatum*) in rivers of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 3, p. 635-641, 2014.

VALTONEN, E. T.; KOSKIVAARA, M. Relationships between the parasites of some wild and cultured fishes in two lakes and a fish farm in central Finland. **International Journal of Parasitology**, v. 24, n., p. 109-118, 1994.

VILLELA, L. C. V. **CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DA CACHARA (*Pseudoplatystoma reticulatum*) E HÍBRIDOS COM PINTADO (*P. corruscans*) COM TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA, 2015. 147 p.

VINCENDEAU, P.; GOBERT, A. P.; DAULOUEDE, S.; MOYNET, D.; MOSSALAYI, M. D. Arginases in parasitic diseases. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 1, p. 9-12, 2003.

VON GERSDORFF JORGENSEN, L. The dynamics of neutrophils in zebrafish (*Danio rerio*) during infection with the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 55, n., p. 159-164, 2016.

WAHLI, T.; MEIER, W.; SCHMITT, M. Affinity of *Ichthyophthirius-Multifiliis* Theronts to Light and or Fish. **Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie**, v. 7, n. 4, p. 244-248, 1991.

WANG, G. L.; WANG, M. C.; ZHANG, X. W.; CHANG, M. X.; XIE, H. X.; NIE, P. Molecular cloning, biological effect, and tissue distribution of interleukin-8 protein in mandarin fish (*Siniperca chuasti*) upon *Flavobacterium columnare* infection. **Fish Shellfish Immunol**, v. 66, n., p. 112-119, 2017.

WANG, T. T.; SONG, X. H.; BAO, G. M.; ZHAO, L. X.; YU, X.; ZHAO, J. Molecular characterization, expression analysis, and biological effects of interleukin-8 in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 5, p. 1421-1432, 2013.

WANG, X. T.; DICKERSON, H. W. Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 176-181, 2002.

WANG, Y.; WANG, E.; HE, Y.; WANG, K.; YANG, Q.; WANG, J.; GENG, Y.; CHEN, D.; HUANG, X.; OUYANG, P.; LAI, W.; SHI, C. Identification and screening of effective protective antigens for channel catfish against *Streptococcus iniae*. **Oncotarget**, v., n., p., 2017.

WEI, J. Z.; LI, H.; YU, H. Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 91-101, 2013.

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 6, p. 1127-1151, 2007.

WIEGERTJES, G. F.; JOERINK, M. Macrophage polarization in the immune response to parasites. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 24, n. 1, p. 5-10, 2004.

WITHERS, P. C. Urea: Diverse functions of a 'waste' product. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 25, n. 9, p. 722-727, 1998.

WOO, P. T. K. **Fish Diseases and Disorders. Protozoan and Metazoan Infections**. CAB International, 2006, v.1

WRIGHT, A. D. G.; COLORNI, A. Taxonomic re-assignment of *Cryptocaryon irritans*, a marine fish parasite. **European Journal of Protistology**, v. 37, n. 4, p. 375-378, 2002.

WU, J.; SHI, Y. H.; ZHANG, X. H.; LI, C. H.; LI, M. Y.; CHEN, J. Molecular characterization of an IL-1 β gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its effect on fish defense against *Vibrio alginolyticus* infection. **Dongwuxue Yanjiu**, v. 36, n. 3, p. 133-141, 2015.

WURTSBAUGH, W. A.; TAPIA, R. A. Mass Mortality of Fishes in Lake Titicaca (Peru Bolivia) Associated with the Protozoan Parasite *Ichthyophthirius-Multifiliis*. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 117, n. 2, p. 213-217, 1988.

XU, D. H.; KLESIUS, P. H. Protective effect of cutaneous antibody produced by channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet on cohabited non-immune catfish. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 5, p. 287-291, 2003.

XU, D. H.; KLESIUS, P. H.; SHELBY, R. A. Immune responses and host protection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against *Ichthyophthirius multifiliis* after immunization with live theronts and sonicated trophonts. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 3, p. 135-141, 2004.

XU, D. H.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Cutaneous antibodies from channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) may induce apoptosis of Ich theronts. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, n. 4, p. 213-220, 2005.

XU, D. H.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Protective immunity of Nile tilapia against *Ichthyophthirius multifiliis* post-immunization with live theronts and sonicated trophonts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 124-127, 2008.

XU, D. H.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 26, n. 4, p. 614-618, 2009.

XU, D. H.; KLESIUS, P. H. Comparison of serum antibody responses and host protection against parasite *Ichthyophthirius multifiliis* between channel catfish and channel x blue hybrid catfish. **Fish Shellfish Immunol**, v. 34, n. 5, p. 1356-1359, 2013.

XU, D. H.; ZHANG, Q. Z.; SHOEMAKER, C. A.; ZHANG, D.; MOREIRA, G. S. Molecular immune response of channel catfish immunized with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 54, n., p. 86-92, 2016.

XU, D. H.; MOREIRA, G. S. A.; SHOEMAKER, C. A.; ZHANG, D.; BECK, B. H. Expression of immune genes in systemic and mucosal immune tissues of channel catfish vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 66, n., p. 540-547, 2017.

YAO, J. Y.; SHEN, J. Y.; LI, X. L.; XU, Y.; HAO, G. J.; PAN, X. Y.; WANG, G. X.; YIN, W. L. Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Parasitol Res**, v. 107, n. 5, p. 1035-1042, 2010.

YAO, J. Y.; ZHOU, Z. M.; LI, X. L.; YIN, W. L.; RU, H. S.; PAN, X. Y.; HAO, G. J.; XU, Y.; SHEN, J. Y. Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*). **Vet Parasitol**, v. 183, n. 1-2, p. 8-13, 2011.

YASUMARU, F. A. **Influência do ácido caprílico suplementado na ração de juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* no controle de *Ichthyophthirius multifiliis***. Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2007. 41 p.

YEH, R. F.; LIM, L. P.; BURGE, C. B. Computational inference of homologous gene structures in the human genome. **Genome Res**, v. 11, n. 5, p. 803-816, 2001.

YU, H.; IYER, R. K.; KERN, R. M.; RODRIGUEZ, W. I.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Expression of arginase isozymes in mouse brain. **J Neurosci Res**, v. 66, n. 3, p. 406-422, 2001.

ZAMECKA, E.; POREMBSKA, Z. Five forms of arginase in human tissues. **Biochem Med Metab Biol**, v. 39, n. 3, p. 258-266, 1988.

ZAPATA, A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 3, n. 1, p. 55-65, 1979.

ZHANG, X. L.; LU, Y. S.; JIAN, J. C.; WU, Z. H. Cloning and expression analysis of recombination activating genes (RAG1/2) in red snapper (*Lutjanus sanguineus*). **Fish Shellfish Immunol**, v. 32, n. 4, p. 534-543, 2012.

ZWOLLO, P.; COLE, S.; BROMAGE, E.; KAATTARI, S. B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. **J Immunol**, v. 174, n. 11, p. 6608-6616, 2005.

ZWOLLO, P.; HAINES, A.; ROSATO, P.; GUMULAK-SMITH, J. Molecular and cellular analysis of B-cell populations in the rainbow trout using Pax5 and immunoglobulin markers. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1482-1496, 2008.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

CONCLUSÃO DE PARECER ÉTICO

Processo USP: 14.1.391.74.9

Projeto: Taxonomia, Morfologia, Biologia e Patogenia de Parasitas e bactérias que infectam peixes capturados em pisciculturas e rios brasileiros.

Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo do conteúdo sobre a solicitação enviada e parecer gerado.

Recomendação do Comitê de Ética:

- ☒ Aprovação.
- ☐ Não aprovado.
- ☐ Considerado em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados.
- ☐ Retirado de pauta.

Pirassununga, 28 de maio de 2014.

Notifique-se o interessado.

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins - Presidente do CEP/FZEA

Via do Parecer retirada pelo interessado:

Nome/Assinatura: _____

Data: _____