

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINE MUNHOZ MEIRA

**Imunização de lambaris (*Astyanax lacustris*) com o gene que codifica o antígeno de imobilização IAG52A de *Ichthyophthirius multifiliis* associado com a citocina IL-8 de *A. lacustris* como adjuvante molecular**

CAROLINE MUNHOZ MEIRA

**Imunização de lambaris (*Astyanax lacustris*) com o gene que codifica o antígeno de imobilização IAG52A de *Ichthyophthirius multifiliis* associado com a citocina IL-8 de *A. lacustris* como adjuvante molecular**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pelo programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia

Coorientador: Dr. Mateus Maldonado Carriero

---

Pirassununga

2022

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

M514i Meira, Caroline Munhoz  
Imunização de lambaris (*Astyanax lacustris*) com o gene que codifica o antígeno de imobilização IAG52A de *Ichthyophthirius multifiliis* associado com a / Caroline Munhoz Meira ; orientador Antonio Augusto Mendes Maia ; coorientador Mateus Maldonado Carriero. -- Pirassununga, 2022.  
80 f.

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

1. Aquicultura. 2. Ictiofiríase. 3. Vacina gênica. 4. Adjuvante. 5. Imunologia. I. Maia, Antonio Augusto Mendes, orient. II. Carriero, Mateus Maldonado, coorient. III. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da imunização de lambaris (*Astyanax altiparanae*) com o antígeno de imobilização IAG52A de *Ichthyophthirius multifiliis* associado com a citocina IL-8 de *A. altiparanae* como adjuvante molecular", protocolada sob o CEUA nº 3960261020 (ID 001606), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia e equipe; Caroline Munhoz Meira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 15/12/2020.

We certify that the proposal "Effect of immunization of lambaris (*Astyanax altiparanae*) with the immobilization antigen IAG52A from *Ichthyophthirius multifiliis* associated with the cytokine IL-8 from *A. altiparanae* as a molecular adjuvant", utilizing 350 Fishes (males and females), protocol number CEUA 3960261020 (ID 001606), under the responsibility of **Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia and team; Caroline Munhoz Meira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 12/15/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [01/2021](#) a [06/2022](#)

Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem: [Animais provenientes de doação espontânea](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [0 a 0 anos](#)

N: [350](#)

Linhagem: [Astyanax altiparanae](#)

Peso: [10 a 30 g](#)

Local do experimento: Os peixes da espécie *A. altiparanae* utilizados nos experimentos propostos neste projeto serão produzidos no Laboratório dos Aquários (Antigo Laboratório de Histologia) que faz parte do Laboratório de Imunologia de Parasitas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) de Pirassununga-SP. Os animais serão obtidos a partir de desovas de animais já existentes, aprovados pelo comitê de ética desta instituição (Processo nº 2403220719). Os animais obtidos, ao atingirem o tamanho esperado, serão transferidos para aquários específicos onde serão mantidos por pelo menos 2 semanas para a devida aclimação de forma a evitar possíveis interferências. Todos os experimentos serão realizados nas dependências do LIP.

Pirassununga, 29 de julho de 2021

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

CAROLINE MUNHOZ MEIRA

**Imunização de lambaris (*Astyanax lacustris*) com o gene que codifica o antígeno de imobilização IAG52A de *Ichthyophthirius multifiliis* associado com a citocina IL-8 de *A. lacustris* como adjuvante molecular**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pelo programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia

Coorientador: Dr. Mateus Maldonado Carriero

Data de aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Nome completo do 1º Examinador – Presidente da Banca Examinadora  
Prof. + titulação (caso tenha) + instituição a que pertence

---

Nome completo do 2º Examinador  
Prof. + titulação (caso tenha) + instituição a que pertence

---

Nome completo do 3º Examinador  
Prof. + titulação (caso tenha) + instituição a que pertence

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos e que me apoiam incondicionalmente em todas as decisões.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, pelas inúmeras bênçãos conquistadas ao longo da graduação e por Ele me dar sabedoria nos momentos de dificuldade.

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia, pela orientação e confiança em mim depositada e por todo aprendizado adquirido ao longo destes anos, que tanto contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

Aos meus pais, Francisleia e Armindo, que são minha base e sempre foram meus maiores incentivadores.

Aos meus familiares, em especial ao meu avô Ronaldo, que sempre me apoiou na realização da ciência.

Ao Dr. Mateus Maldonado Carriero, pela coorientação deste trabalho desde a idealização inicial e por todo suporte prestado.

Ao Dr. Nycolas Levy Pereira que auxiliou na execução do projeto nas mais diversas etapas, apoiando desde a condução dos experimentos até a análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Ricardo Moro, coordenador do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, por todo apoio e solicitude nas diversas fases da execução do projeto.

Ao aluno de graduação Pedro Rihs, que foi amigo e grande colaborador em todas as atividades de pesquisa propostas.

Às alunas Talita, Nathalia e Marisa, do Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica, por todo apoio no manejo dos peixes e por todos os momentos divertidos e cafés compartilhados.

Aos companheiros do Laboratório de Imunologia de Parasitas (LIP), Amanda, Márcia, Tiago e Milena que atuaram como coadjuvantes e colegas em todo meu processo de crescimento no mestrado.

Às minhas amigas e companheiras de república: Mellory, Nataly e Beatriz por serem minha família em Pirassununga e dividirem comigo a jornada da pós-graduação.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado, mas também por me acolher desde a graduação.

À secretaria dos Programas de Pós-graduação da unidade, em especial à Maria Cecília, secretária do Programa de Zootecnia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Mestrado Processo nº 2020/06371-4) pela concessão da bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Mestrado Processo nº 133146/2020-0) pela concessão de bolsa nos meses iniciais da proposta.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos meus grandes amigos de São Carlos e de Pirassununga que estiveram comigo e foram meu suporte ao longo desta trajetória.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)

## RESUMO

MEIRA, C. M. **Imunização de lambaris (*Astyanax lacustris*) com o gene que codifica o antígeno de imobilização IAG52A de *Ichthyophthirius multifiliis* associado com a citocina IL-8 de *A. lacustris* como adjuvante molecular.** 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2022.

O lambari (*Astyanax lacustris*) é um peixe caraciforme de pequeno porte que vem ganhando grande destaque na aquicultura nacional sendo também muito utilizado como modelo em pesquisas, uma vez que possui altas taxas de crescimento, fácil reprodução e rápida maturação sexual. A crescente importância deste peixe faz com que seja cada vez mais necessário desenvolver alternativas para o controle de enfermidades que os acometem, como é o caso da ictiofitiríase, causada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, um parasita que atinge praticamente qualquer espécie de peixe de água doce causando importantes perdas para a indústria de pescados. Apesar disso, não existem tratamentos eficazes para o controle dessa patogenia em produções de larga escala, o que torna essencial a adoção de estratégias preventivas. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da imunização de *A. lacustris* com vacina gênica composta pelo antígeno de imobilização IAG52A de *I. multifiliis* em conjunto com a citocina IL-8 obtida de lambaris como adjuvante molecular. As sequências do IAG52A e da IL-8 foram clonadas no vetor de expressão pcDNA 3.1. A análise da transcrição do gene IAG52A de *I. multifiliis* em lambaris imunizados com o plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A indicou a produção de mRNA na musculatura dos peixes vacinados, e que havia potencial de expressão dessa proteína nos animais. Posteriormente, os peixes foram divididos em cinco grupos, vacinados com PBS, com pcDNA 3.1 sem inserto, com o pcDNA 3.1-IAG52A, com o pcDNA 3.1-IL-8 e com uma associação do pcDNA 3.1-IAG52A + pcDNA 3.1-IL-8. Todos os grupos receberam uma dose de reforço 14 dias após a primeira imunização. Dos peixes vacinados foram coletadas amostras de baço e do rim anterior para a análise da expressão das citocinas inflamatórias, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Os resultados demonstraram que a vacina foi capaz de gerar um aumento da IL-1 $\beta$  no baço nas primeiras 6 h pós segunda dose e após 14 dias. A expressão de IL-8 no baço e no rim não

apresentou diferenças significativas do grupo controle. A análise da TNF $\alpha$  no rim dos animais vacinados demonstrou expressão superior dos grupos vacinados com IAG52A, IAG52-A+IL-8 e MOCK em relação ao controle após 14 dias que pode estar relacionada a componentes do próprio plasmídeo. Para a IFN- $\gamma$ , as diferenças de expressão entre os grupos não permitiram conclusões concretas acerca do mecanismo de regulação da expressão destas nos animais vacinados. A análise histológica foi realizada para visualizar a migração de células inflamatórias para a região de aplicação da vacina, demonstrando que não houve diferença na concentração de leucócitos no período de 12 e 24 h após a vacinação. Entretanto, após 14 dias, os grupos injetados com IAG e com IAG+IL-8, apresentaram uma densidade maior de leucócitos nos sítios de aplicação quando comparados ao controle. Os dados obtidos indicam que a vacina utilizada é transcrita sugerindo que pode estimular parâmetros de resposta imune inata através da expressão de citocinas e da migração leucocitária.

**Palavras-chave:** peixes, ictiofitiríase, vacina gênica, adjuvante, qPCR, histologia

## ABSTRACT

MEIRA, C. M. **Immunization of lambaris (*Astyanax lacustris*) with the gene encoding the immobilization antigen IAG52A of *Ichthyophthirius multifiliis* associated with the cytokine IL-8 from *A. lacustris* as a molecular adjuvant.** 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2022.

The lambari (*Astyanax lacustris*) is a small characiform fish that has been gaining prominence in national aquaculture and is also widely used as a model in research since it has high growth rates, easy reproduction, and rapid sexual maturation. The growing importance of this fish makes it increasingly necessary to develop alternatives for the control of diseases that affect them, such as ichthyophthyriasis, caused by the ciliated protozoan *Ichthyophthirius multifiliis*, a parasite that affects practically any species of freshwater fish, causing significant losses to the fish industry. Despite this, there are no effective treatments to control this pathogen in large-scale production, making adopting preventive strategies essential. Thus, the objective of the present work was to evaluate the effect of immunization of *A. lacustris* with a gene vaccine composed of the immobilization antigen IAG52A of *I. multifiliis* together with the cytokine IL-8 obtained from lambaris as a molecular adjuvant. The IAG52A and IL-8 sequences were cloned into the pcDNA 3.1 expression vector. Transcription analysis of the IAG52A gene of *I. multifiliis* in lambaris immunized with the pcDNA3.1-IAG52A plasmid indicated mRNA production in the vaccinated fish's musculature, and that there was potential for expression of this protein in the animals. Subsequently, the fish were divided into five groups, vaccinated with PBS, with pcDNA 3.1 without insert, with pcDNA 3.1-IAG52A, with pcDNA 3.1-IL-8, and with an association of pcDNA 3.1-IAG52A + pcDNA 3.1-IL-8. All groups received a booster dose 14 days after the first immunization. Spleen and anterior kidney samples were collected from vaccinated fish to analyze the expression of inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  and, IFN $\gamma$ . The results showed that the vaccine was able to generate an increase in IL-1 $\beta$  in the spleen in the first 6 h after the second dose and after 14 days. IL-8 expression in the spleen and kidney did not show significant differences from the control group. The analysis of TNF $\alpha$  in the kidney of vaccinated animals showed higher expression of the groups

vaccinated with IAG52A, IAG52-A+IL-8 and MOCK compared to the control after 14 days, which may be related to components of the plasmid itself. For IFN- $\gamma$ , the differences in expression between the groups did not allow concrete conclusions about the mechanism of regulation of their expression in vaccinated animals. Histological analysis was performed to visualize the migration of inflammatory cells to the vaccine application region, demonstrating that there was no difference in leukocyte concentration between 12 and 24 h after vaccination. However, after 14 days, the groups injected with IAG and with IAG+IL-8, presented a higher density of leukocytes in the application sites when compared to the control. The data obtained indicate that the vaccine used is transcribed, suggesting that it can stimulate innate immune response parameters through the expression of cytokines and leukocyte migration.

**Keywords:** fish, ichthyophyriasis, gene vaccine, adjuvant, qPCR, histology

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico do protozoário <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	22
Figura 2 – Aquários de manutenção dos peixes .....	32
Figura 3 – Coleta de amostras da musculatura dos lambaris imunizados.....	40
Figura 4 – Exemplos de <i>A. lacustris</i> utilizados na imunização.....	42
Figura 5 – Amplificação do isolado brasileiro de <i>I. multifiliis</i> .....	45
Figura 6 – Alinhamento da sequência obtida no GenBank.....	46
Figura 7 – cDNA de IAG52A de <i>I. multifiliis</i> com tradução dos aminoácidos.....	47
Figura 8 – Árvores filogenéticas de <i>Neighbor Joining</i> .....	49
Figura 9 – Domínios da proteína IL-8 de <i>A. lacustris</i> .....	51
Figura 10 – Gráficos de eficiência de amplificação dos <i>primers</i> de qPCR.....	53
Figura 11 – Gel de agarose demonstrando a amplificação do gene IAG52A no tecido muscular de <i>A. lacustris</i> .....	54
Figura 12 – Expressão das citocinas obtidas em amostras de baço de <i>A. lacustris</i> , em vários períodos após a imunização.....	57
Figura 13 – Expressão das citocinas obtidas em amostras de rim anterior de <i>A. lacustris</i> , em vários períodos após a imunização.....	58
Figura 14 – Gráficos das densidades leucocitárias e os cortes histológicos da musculatura dos peixes vacinados 14 dias após a segunda dose.....	60

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

%: Porcentagem.

kg: Quilograma.

cm: Centímetro.

g: Grama.

L: Litro.

°C: Grau Celsius.

mM: Milimolar.

mL: Mililitro.

μm: Micrômetro.

μL: Microlitro.

nM: Nanomolar.

ng: Nanograma.

α: Alfa.

β: Beta.

γ: gama.

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 O lambari-do-rabo-amarelo ( <i>Astyanax lacustris</i> ) .....	19
2.2 O protozoário <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	20
2.3 Panorama do controle da infecção por <i>I. multifiliis</i> .....	23
2.4 Utilização de vacinas gênicas em peixes para proteção contra <i>I. multifiliis</i> .....	25
2.5 Utilização de substâncias adjuvantes .....	26
3 JUSTIFICATIVA .....	29
4 HIPÓTESE .....	30
5 OBJETIVOS .....	30
5.1 Objetivo Geral.....	30
5.2 Objetivos Específicos.....	30
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
6.1 Obtenção dos exemplares de <i>A. lacustris</i> .....	31
6.2 Isolamento dos terontes de <i>I. multifiliis</i> .....	32
6.3 Caracterização do cDNA do gene IAG52A de <i>I. multifiliis</i> .....	33
6.4 Extração do RNA total e síntese do cDNA de <i>A. lacustris</i> .....	34
6.5 Caracterização do cDNA das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ de <i>A. lacustris</i> .....	34
6.6 Caracterização completa do cDNA da citocina IL-8 de <i>A. lacustris</i> .....	36
6.7 Padronização dos <i>primers</i> para as reações de PCR em tempo real (qPCR).....	36
6.8 Construção dos plasmídeos pcDNA 3.1 contendo os genes IAG52A de <i>I. multifiliis</i> e IL-8 de <i>A. lacustris</i> .....	37
6.9 Análise da transcrição do gene IAG52A de <i>I. multifiliis</i> em <i>A. lacustris</i> imunizados com o plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A .....	39
6.10 Imunização de <i>A. lacustris</i> com os plasmídeos codificantes pcDNA3.1-IAG52A e pcDNA3.1- IL8.....	40
6.11 Análise da expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ .....	42
6.12 Análise da migração leucocitária na musculatura injetada com as vacinas contendo os plasmídeos codificantes .....	43
6.13 Análise estatística .....	44

7 RESULTADOS .....	44
7.1 Caracterização do cDNA do gene IAG52A obtido de amostras nacionais e produção do gene sintético de IAG52A .....	44
7.2 Caracterização do cDNA das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ <i>A. lacustris</i> .....	48
7.3 Caracterização da sequência completa de IL-8 de <i>A. lacustris</i> .....	51
7.4. Padronização e cálculo de eficiência dos <i>primers</i> para as reações de qPCR .....	52
7.5 Análise da transcrição do gene IAG52A de <i>I. multifiliis</i> na musculatura de <i>A. lacustris</i> imunizados com o plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A .....	53
7.6 Análise da expressão dos genes das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ .....	54
7.7 Análise histológica das amostras musculares de <i>A. lacustris</i> imunizados com a vacina gênica .....	59
8 DISCUSSÃO .....	61
9 CONCLUSÃO.....	68
11 REFERÊNCIAS.....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Os setores de pesca e aquicultura têm sido cada vez mais reconhecidos como essenciais para a segurança alimentar e nutrição global no século atual. A produção global de animais aquáticos foi estimada em 178 milhões de toneladas em 2020, sendo que a pesca contribuiu com 90 milhões de toneladas (51%) e a aquicultura com 88 milhões de toneladas (49%) (FAO, 2022).

O consumo global de alimentos aquáticos aumentou a uma taxa média anual de 3,0% de 1961 a 2019, ou seja, uma taxa quase duas vezes maior que o crescimento anual da população mundial (1,6%) para o mesmo período. O consumo per capita de alimentos de origem aquática cresceu cerca de 1,4% ao ano, saltando de 9,0 kg (equivalente ao peso vivo) em 1961 para 20,5 kg em 2019. Durante as últimas décadas, o consumo per capita de alimentos aquáticos foi influenciado pelo aumento da oferta, por mudanças nas preferências dos consumidores, pelos avanços na tecnologia e pelo crescimento da renda (FAO, 2022).

A pandemia de COVID-19 teve um impacto negativo profundo na pesca e aquicultura no cenário global, que foi impulsionada por diversos motivos, entre eles as mudanças na demanda do consumidor, a interrupção do mercado e as dificuldades logísticas oriundas das medidas de contenção da pandemia que por vezes impediram ou dificultaram as atividades de pesca e aquicultura, incluindo bloqueios, toques de recolher, distanciamento e restrições portuárias. Apesar disso, o setor segue crescendo, sendo que no Brasil, uma avaliação recente indicou que a produção da aquicultura brasileira em 2021 produziu mais de 800 mil toneladas de peixes (FAO, 2022; PEIXEBR, 2022)

A produção aquícola de peixes de água doce para consumo humano totalizou cerca de 760.000 toneladas em 2019. O aumento estimado na produção de peixes de água doce do Brasil foi de cerca de 25% nos últimos 5 anos. O crescimento do setor é fortemente favorecido pelas condições ambientais e disponibilidade de recursos naturais do país. O território nacional contém aproximadamente 12% de toda a água doce superficial do planeta e mais de 4 milhões de hectares de barragens artificiais e reservatórios de água de diversos tamanhos (VALENTI et al., 2021). Devido a essa grande disponibilidade

de água, o país possui diversificada fauna de peixes de água doce, sendo que na América do Sul, existem cerca de 3.000 espécies conhecidas e o número final pode chegar a 5.000 (BÖHLKE; WEITZMAN; MENEZES, 1978).

O país possui diversas espécies com alto potencial para a produção, seja por crescimento rápido, boa conversão alimentar, adaptabilidade ao cativeiro, fácil reprodução, rusticidade ou por demanda do mercado consumidor (PEIXEBR, 2021). Por este motivo, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que permitam o uso sustentável de recursos de modo a alavancar o setor da aquicultura que, no Brasil, está entre as principais atividades zootécnicas desenvolvidas, com destaque à piscicultura dulcícola, relacionada ao cultivo de peixes de água doce.

A prevenção e o controle de doenças são cruciais para manter uma aquicultura sustentável, tanto econômica quanto ambientalmente. Medidas profiláticas baseadas na estimulação do sistema imunológico dos peixes têm sido uma medida eficaz para atingir esse objetivo. A proposta de produção de uma vacina eficaz em peixes contra a ichtioftiríase, que é considerada uma das doenças mais prejudiciais na cultura de tanques de peixes de água doce e salobra, se alinha com os ideais de profilaxia visando o crescimento racional do setor aquícola no âmbito nacional e mundial.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*)**

Com uma grande área territorial e com extensas bacias hidrográficas, o Brasil apresenta grande potencial aquícola (VICENTE; ELIAS; FONSECA-ALVES, 2014). Dentre as espécies exploradas pela aquicultura nacional, destaca-se o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*), espécie caraciforme de pequeno porte que pode medir de 10-15 cm de comprimento, pesando até 60 g. É uma espécie que vem gerando interesse por parte dos produtores devido à sua rusticidade, rápido crescimento e carne saborosa, sendo altamente cultivada comercialmente para pesca esportiva e para ser utilizada como isca viva na pesca. O lambari possui um rendimento de carcaça de 70 a 85%, fazendo com

que a espécie seja uma opção importante na alimentação como petisco frito e com potencial para comercialização como alimento enlatado (ALMEIDA, 2007; DE MORAES FRANÇA FERREIRA et al., 2014).

Outro aspecto importante está no fato de que por se tratar de uma espécie com alta taxa de sobrevivência, curtas gerações, prole numerosa e ser de fácil manejo em condições de laboratório e de campo, o lambari é apostado como um peixe muito interessante para ser utilizado como modelo em estudos de reprodução, fisiologia e desenvolvimento de protocolos de biotecnologia (ADOLFI et al., 2015; CALCAGNOTTO et al., 1999; DOS SANTOS et al., 2016; GOMES; COSTA; BORELLA, 2013; YASUI et al., 2014).

O lambari-do-rabo-amarelo foi, durante alguns anos, denominado principalmente como *Astyanax altiparanae*. Apesar disso, de acordo com o estudo conduzido por Leucena e Soares (2016), tendo por base coletas realizadas no rio La Plata e rio São Francisco e de sistemas costeiros do Sul do Brasil e do Uruguai, os nomes *Tetragonopterus jacuhiensis* Cope, 1894, *Astyanax asuncionensis* Géry, 1972, e *A. altiparanae* Garutti & Britski, 2000, são sinônimos juniores de *A. lacustris* Lütken, 1875 (DE LUCENA; SOARES, 2016).

## **2.2 O protozoário *Ichthyophthirius multifiliis***

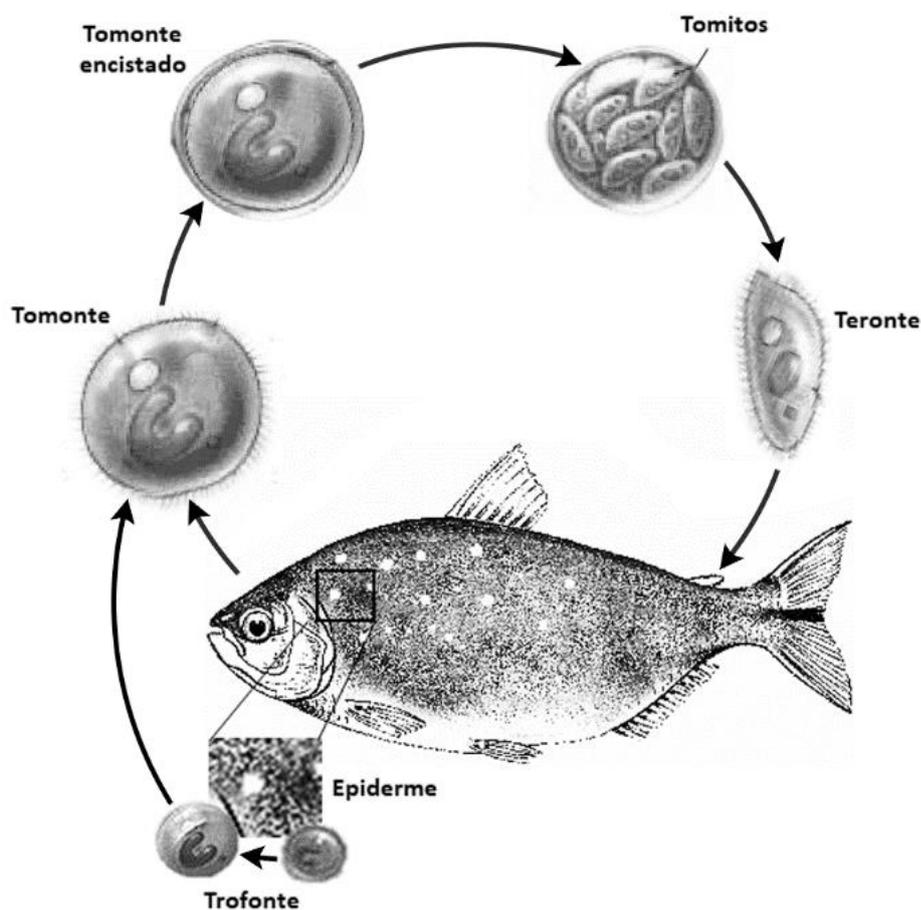
O crescimento da aquicultura em termos de produção e produtividade podem resultar em intensificação dos processos de criação e exposição dos animais a situações cada vez mais estressantes que podem servir de estímulo ao surgimento de surtos epizooticos de doenças (GORISSEN; FLIK, 2016; PICKERING; POTTINGER, 1989; SNIESZKO, 1974). Peixes produzidos em confinamento, com alta densidade e manuseio, incluindo o transporte, podem apresentar maior susceptibilidade a agentes infecciosos devido ao estresse produzido (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009). Fatores agravantes das condições ambientais como níveis de oxigênio, pH, temperatura e amônia, além da qualidade da dieta, também podem resultar em supressão no sistema imunológico dos peixes (TORT, 2011).

É fundamental conhecer e controlar os agentes patogênicos que potencialmente podem causar prejuízos à produção dos peixes, como é o caso

do protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, também conhecido como “Ictio” ou “Ich”, que é um parasita obrigatório considerado um dos patógenos mais comuns em peixes de água doce (WANG; DICKERSON, 2002). A enfermidade ictiofitiríase, ou “doença dos pontos brancos”, causada por esse parasita, possui distribuição geográfica global e é capaz de infectar virtualmente qualquer espécie de peixe podendo causar altos índices de mortalidade. É especialmente prejudicial em animais de pisciculturas que por muitas vezes estão sob condições de estresse elevadas como manipulação constante, baixa oxigenação da água e em alta densidade populacional (DICKERSON, 2006; NIGRELLI; POKORNY; RUGGIERI, 1976).

Em seu ciclo biológico, o *I. multifiliis* inclui vários estágios morfológicamente distintos, onde cada um possui uma função específica. Os trofontes são as formas observadas durante a manifestação clínica da doença e se encontram na camada basal do epitélio da pele e das brânquias. Após um período de crescimento, esses parasitas se soltam do hospedeiro na forma de tomites, que então se encistam no ambiente e passam por múltiplas divisões celulares, liberando finalmente várias formas altamente móveis infectantes chamados terontes. Os terontes aderem à pele do peixe e penetram na epiderme onde se estabelecem como trofontes, completando o ciclo de vida que ocorre totalmente na água (DICKERSON, 2006; YAO et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo biológico do protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*



Fonte: autoria própria

A patogenia do Íctio está relacionada ao desenvolvimento dos trofontes. Nesta fase, o parasita ingere as células do hospedeiro, incluindo debris celulares do próprio epitélio, células do sistema imune que migram para o foco de infecção e células sanguíneas em geral. Em resposta a esse fenômeno, ocorre a hiperplasia do epitélio e de células produtoras de muco. Nesse cenário, a infiltração inflamatória, somada a hiperplasia celular e ao próprio parasita são responsáveis pela formação dos pontos na pele (PÁDUA, S. B., MENEZES-FILHO, R. D., DIAS-NETO, J., JERÔNIMO, G. T., ISHIKAWA, M. M., & MARTINS, 2012). Um dos principais problemas relatados na infecção pelo parasita, está relacionado à formação de úlceras. Os ferimentos são comumente utilizados como rota de entrada de patógenos secundários, oportunistas à

condição de debilidade do hospedeiro frente à ictiofitiríase, como é o caso das bactérias do gênero *Aeromonas*, que levam a um aumento da mortalidade durante a infestações pelo Ictio (XU; SHOEMAKER; KLESIUS, 2012).

### **2.3 Panorama do controle da infecção por *I. multifiliis***

Atualmente, não existem alternativas julgadas eficazes para a prevenção ou tratamento da ictiofitiríase em larga escala. Alguns agentes de amplo espectro como o verde de malaquita podem ser adotados como tratamento para peixes cultivados para fins ornamentais. Até meados dos anos 1990, o tratamento com verde de malaquita era também utilizado em peixes destinados ao consumo humano, sendo uma opção relativamente eficaz, prática e barata contra vários parasitas, porém, devido ao seu potencial carcinogênico e à preocupação do impacto ambiental resultante dos resíduos gerados, a utilização dessa substância em peixes produzidos para consumo humano foi proibida em vários países (MATTHEWS, 2005; VON GERSDORFF JØRGENSEN, 2016; WEN et al., 2017).

Outras opções de tratamento foram testadas, incluindo agentes químicos como formalina e cobre (ROWLAND et al., 2008), clorofilina (WOHLLEBE; RICHTER; HÄDER, 2012), cloramina-T (RINTAMÄKI-KINNUNEN et al., 2005), sulfato de cobre (ROWLAND et al., 2008), ferrato de potássio (VI) (LING et al., 2010) permanganato de potássio (STRAUS; GRIFFIN, 2002), tricaína metanosulfato (MS-222) (XU; SHOEMAKER; KLESIUS, 2008) e bronopol (SHINN et al., 2012), todos com sucesso limitado. Vários produtos naturais obtidos a partir de extratos de plantas como sanguinarina, diidrosanguinarina e diidro queleritrina de *Macleaya cordata* (YAO et al., 2011, 2010), queleritrina e cloroxilonina de *Toddalia asiatica* (SHAN et al., 2014) e cynatratoside-A e cynanversicoside C de *Cynanchum paniculatum* também foram testados e, embora tenham demonstrado certa efetividade no controle do parasita, ainda não estão disponíveis comercialmente em larga escala e são mais efetivos no tratamento de uma infecção já estabelecida do que na prevenção de uma infecção inicial.

Considerando as opções escassas de tratamento pós infecção, são necessárias abordagens prévias relacionadas à prevenção. Atualmente, não existem relatos de espécies de peixes que sejam naturalmente imunes à infecção por *I. multifiliis*, porém, vários trabalhos já demonstraram que peixes que sobrevivem à infecção inicial desenvolvem subsequente imunidade protetiva, indicando que a imunização é uma alternativa viável para impedir a infecção desse parasita em peixes de criação (CLARK; DICKERSON; FINDLY, 1988; DICKERSON, 2006; VON GERSDORFF JØRGENSEN, 2016; WANG; DICKERSON, 2002). A partir dessa constatação, vários pesquisadores vêm tentando esclarecer quais são os mecanismos envolvidos nessa imunidade adquirida contra *I. multifiliis*.

Foi demonstrado que anticorpos de imobilização, encontrados no muco e no soro de peixes infectados com *I. multifiliis* estão envolvidos na proteção contra infecções subsequentes, sendo observados em altos títulos em peixes que já tiveram contato com o parasita (CLARK; DICKERSON; FINDLY, 1988; LING; SIN; LAM, 1993). Esses anticorpos são produzidos em resposta ao contato com uma classe altamente abundante de proteínas de superfície ancoradas com glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) dos parasitas conhecidas como antígenos de imobilização (i-Ag), que foram classificadas dessa forma devido ao fato de que a interação dos anticorpos do hospedeiro com tais proteínas de *I. multifiliis* provoca a interrupção dos movimentos ciliares do parasita, o imobilizando e o tornando vulnerável ao sistema imune do hospedeiro (CLARK et al., 2001; CLARK; DICKERSON; FINDLY, 1988).

Em condições experimentais, peixes já foram imunizados com sucesso através de injeções por via intraperitoneal de terontes vivos, produzindo uma proteção de quase 100% nos animais desafiados com doses letais desses parasitas (BURKART; CLARK; DICKERSON, 1990; XU; KLESIUS, 2013). Além disso, i-Ag nativos de terontes isolados por purificação por afinidade também foram capazes de gerar proteção contra desafios subsequentes, mostrando ser uma opção efetiva de vacina contra *I. multifiliis* (WANG; DICKERSON, 2002). Apesar de tanto as vacinas com terontes vivos ou de i-Ag nativos purificados desses parasitas apresentarem eficácia na imunização de peixes, o grande problema no uso dessas estratégias de vacinação é o fato de que são necessárias grandes quantidades de terontes para as suas preparações. Na

condição de parasitas obrigatórios, os terontes são obtidos apenas a partir de peixes infectados, o que torna essas opções de vacinação extremamente laboriosas, com tempo de produção muito longo e, conseqüentemente, onerosas e impraticáveis em larga escala para imunização de animais de produção (WANG; DICKERSON, 2002). Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de sistemas alternativos para a utilização desses i-Ag na imunização de animais de produção.

#### **2.4 Utilização de vacinas gênicas em peixes para proteção contra *I. multifiliis***

Dois antígenos de imobilização, denominados IAG52A (proteína de ~52 kDa) e IAG52B (proteína de ~55 kDa) de *I. multifiliis*, já foram produzidos de forma recombinante em laboratório com sucesso em *Escherichia coli* (LIN et al., 2002), indicando o potencial para a produção em larga escala dessas proteínas em sistemas heterólogos. Entretanto, estudos tem mostrado que vacinas baseadas em proteínas recombinantes induzem apenas respostas na produção de anticorpos e por um curto período de tempo, enquanto que a utilização de antígenos na forma de vacinas de DNA, por serem produzidos pelas próprias células dos peixes, produzem uma imunização mais duradora, além de induzirem respostas imune tanto celulares quanto humorais (HEPPELL; DAVIS, 2000; TAFALLA; BØGWALD; DALMO, 2013; VON GERSDORFF JØRGENSEN et al., 2012). Em peixes, essa estratégia de imunização via injeções intramusculares de plasmídeos de DNA contendo genes codificantes de antígenos imunogênicos tem se mostrado altamente efetivas, inclusive com melhores resultados em comparação com o que é observado em outros modelos animais, como mamíferos (LORENZEN; LAPATRA, 2005).

De fato, vacinas de DNA mostraram alta eficácia na proteção de peixes contra várias infecções virais (LORENZEN et al., 2002), sendo uma das mais eficazes, a vacina contra o rhabdovirus IHNV responsável por causar a doença necrose hematopoiética infecciosa (IHN) em salmões (SALONIUS et al., 2007). Após o início da utilização dessa vacina de DNA, não houveram relatos de surtos

de IHN nas populações vacinadas, demonstrando a alta eficácia dessa estratégia de vacinação (EVENSEN; LEONG, 2013).

Em relação ao ciliado *I. multifiliis*, vacinas de plasmídeos de DNA codificando os antígenos de imobilização IAG52A e IAG52B foram utilizados na tentativa de imunizar exemplares de *Ictalurus punctatus* (VON GERSDORFF JØRGENSEN et al., 2012). Porém, embora tenha havido expressão das proteínas antigênicas pelas células dos peixes, além de alterações em vários parâmetros de resposta imune, não houve uma proteção significativa dos peixes imunizados em desafios subsequentes. Os autores sugerem que o fato de a imunização ter sido realizada apenas com os i-Ag pode ter sido insuficiente para a produção de uma proteção significativa, sugerindo a necessidade do uso de algum outro agente estimulante da resposta imune dos peixes a fim de aumentar o efeito protetivo dessa estratégia de vacinação.

Mais recentemente, um i-Ag foi utilizado na imunização de exemplares de *goldfish* contra terontes de *I. multifiliis* através da alimentação dos peixes com bactérias *Lactococcus lactis* que seriam capazes de produzir essa proteína de forma recombinante no trato intestinal dos peixes (YAO et al., 2016). Mais uma vez os resultados indicaram que há potencial para a imunização com os i-Ag, porém, ainda são necessários ajustes na combinação entre a proteína imunizante e o melhor adjuvante para conferir uma proteção completa aos peixes vacinados (YAO et al., 2016). Os estudos envolvendo essas proteínas sugerem que utilizadas isoladamente, as mesmas não seriam capazes de estimular uma proteção eficaz nas mucosas, que é o principal sítio de infecção de *I. multifiliis* (VON GERSDORFF JØRGENSEN et al., 2012).

## **2.5 Utilização de substâncias adjuvantes**

O conceito de adjuvante foi proposto no início do século 20, quando em experimentos realizados com toxóides diftéricos e tetânicos purificados, a vacina tradicional não conseguiu produzir uma resposta imune efetiva. O adjuvante é formulado como parte de uma vacina que visa estimular uma resposta imune mais robusta (MCKEE; MARRACK, 2017).

Atualmente, os adjuvantes mais comuns encontrados nas vacinas veterinárias licenciadas são os sais de alumínio e as emulsões oleosas, sendo

os primeiros mais utilizados devido à sua segurança (BOWERSOCK; MARTIN, 1999). Além dos sais, vários outros adjuvantes particulados como o fosfato de cálcio, quitina e outros carboidratos insolúveis e nanopartículas têm sido utilizados em vacinas para humanos (MCKEE; MARRACK, 2017).

Estudos comparativos em humanos e animais demonstraram que o uso dos sais, embora seguro, promoveu respostas imunes muito fracas no uso com vacinas de proteína recombinante. Foi demonstrado uma tendência em camundongos para respostas Th2 em vez de respostas Th1, sendo que a segunda é relacionada à defesa contra protozoários. Além disso, os compostos induzem fracamente a imunidade mediada por células, particularmente as respostas das células T citotóxicas e alguns sais ainda tendem a induzir respostas imunes mediadas por IgE, podendo causar reações alérgicas (GUPTA et al., 1995; GUPTA, 1998).

Considerando que diversos os experimentos vacinais contra *I. multifiliis* chegaram à conclusão de que apenas o uso de vacinas com antígenos do parasita (i-Ag) não é suficiente para se obter uma boa resposta imune, estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas que utilizam a combinação de antígenos com adjuvantes específicos. O objetivo destas pesquisas é aumentar a capacidade imunogênica dessas vacinas, desencadeando respostas mais eficazes, sem a necessidade da introdução de adjuvantes compostos de sais de alumínio ou ainda os oleosos genéricos, sendo este segundo muitas vezes associado à ocorrência de vários efeitos colaterais indesejáveis como formação de granulomas e cistos, além de lesões ulcerativas no local da injeção (CAIPANG; HIRONO; AOKI, 2009; TAFALLA; BØGWALD; DALMO, 2013). Nesse sentido, é fundamental estudar o uso de adjuvantes específicos, que estejam relacionados às respostas aos patógenos dos quais se deseja produzir a vacina, a fim de aumentar as possibilidades de proteção e reduzir efeitos adversos (TAFALLA; BØGWALD; DALMO, 2013).

Um grupo de moléculas com grande potencial para utilização como adjuvantes em vacinas são as citocinas, que são uma família de proteínas de baixo peso molecular envolvidas em vários processos pró- e anti-inflamatórios na resposta imune contra patógenos, incluindo bactérias, vírus e parasitas (WANG et al., 2016a). Em peixes, várias citocinas já se mostraram eficazes como adjuvantes, sendo essenciais para a obtenção de uma resposta imune

satisfatória contra patógenos (JIMENEZ et al., 2006; SANCHEZ; COLL; TAFALLA, 2007; TAFALLA; BØGWALD; DALMO, 2013),

Entre as citocinas mais avaliadas como adjuvantes em mamíferos destaca-se a IL-8, que mostrou resultados promissores no aumento da eficácia de vacinas (BOBANGA; PETROSIUTE; HUANG, 2013; KUTZLER et al., 2016; XIE et al., 2015). Em peixes, um plasmídeo contendo o gene da IL-8 foi co-injetado com um plasmídeo contendo uma glicoproteína do vírus da septicemia hemorrágica viral em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), produzindo um aumento na transcrição de várias citocinas, o que indica uma melhoria na resposta do sistema imune (JIMENEZ et al., 2006; SANCHEZ; COLL; TAFALLA, 2007). A IL-8 recombinante também foi utilizada como adjuvante molecular na vacinação de *I. punctatus* contra *Streptococcus iniae*. Neste caso os efeitos protetivos não foram satisfatórios, mas o adjuvante melhorou a resposta imune tanto humoral quanto celular dos peixes vacinados (WANG et al., 2016a). Entretanto, resultados mais significativos foram obtidos quando foi realizada a imunização de *I. punctatus* contra *S. iniae* utilizando a citocina IL-8 como adjuvante na forma de vacina gênica, produzindo melhorias significativas na proteção dos peixes vacinados em desafios subsequentes em comparação com o grupo controle, indicando que a IL-8 possui grande potencial para utilização como adjuvante molecular em vacinas contra doenças em peixes (WANG et al., 2016b).

Em relação à resposta à infecção por *I. multifiliis*, a IL-8 apresentou um aumento de sua expressão na pele, no rim anterior e no baço de truta arco-íris durante a infecção por esse parasita (SIGH; LINDENSTRØM; BUCHMANN, 2004). Alguns experimentos desenvolvidos em nosso laboratório, também já demonstraram que a infecção com terontes vivos de *I. multifiliis* propiciou um aumento significativo na expressão da IL-8 no baço de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* (MOREIRA, 2007). Esses resultados indicam que a IL-8 está altamente envolvida na resposta imune à infecção por *I. multifiliis* e, portanto, possui potencial para ser utilizada como adjuvante molecular em vacinas contra esse parasita em peixes.

### 3 JUSTIFICATIVA

No que diz respeito à produção de espécies nativas no Brasil, os esforços de pesquisas frequentemente se concentram em aspectos básicos como manejo, reprodução e nutrição (BALDISSEROTTO, 2020; OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008). Apesar de essas informações serem de alta importância para o setor produtivo, com a intensificação da aquicultura, avanços tecnológicos que visem aprimorar o potencial zootécnico de espécies nativas em relação à sua sanidade abordando métodos de tratamento e prevenção de doenças se fazem extremamente necessários.

Embora a ictiofitiríase seja atualmente umas das doenças mais devastadoras na aquicultura mundial, não existem vacinas comercialmente disponíveis ou alternativas efetivas para a prevenção ou tratamento dessa doença em larga escala. Uma vez que tratamentos químicos ainda não possuem eficácia e praticidade satisfatórias no controle de *I. multifiliis*, uma alternativa que vem ganhando destaque é a produção de vacinas para a prevenção da infecção desse parasita (JIANGYAN et al., 1997; XU et al., 2016).

Nesse sentido, estudos prévios já indicaram que há potencial para a imunização nas formas recombinantes dos i-Ag, porém, ainda são necessários ajustes na combinação entre a proteína imunizante e o melhor adjuvante para conferir uma proteção completa aos peixes vacinados (YAO et al., 2016). Alguns artigos já apontam o possível uso de citocinas como adjuvantes moleculares em sistemas de imunização. No Brasil, nosso grupo de pesquisa tem sido pioneiro no trabalho com essas moléculas em *A. lacustris*.

Dessa forma, o presente trabalho fundamenta-se no impacto social e econômico causado pela ictiofitiríase e na necessidade do desenvolvimento de sistemas alternativos para o controle dessa doença. A produção de uma combinação vacina/adjuvante contra *I. multifiliis*, capaz de conferir proteção contra este protozoário em sistemas de criação, é algo que trará enormes benefícios no controle dessa que é considerada como uma das mais devastadoras enfermidades de peixes em pisciculturas.

## 4 HIPÓTESE

A imunização de lambaris (*Astyanax lacustris*) com uma vacina gênica contendo o plasmídeo codificante do antígeno de imobilização IAG52A de *I. multifiliis* em associação com um plasmídeo codificante da citocina IL-8 de *A. lacustris* como adjuvante molecular é capaz de estimular a resposta imune dos peixes vacinados através do aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  no baço e rim anterior dos animais e da promoção de maior migração leucocitária para região da musculatura vacinada.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Preparar uma vacina gênica do antígeno de imobilização IAG52A de *I. multifiliis* em associação com a citocina IL-8 de *A. lacustris* como adjuvante molecular e avaliar os seus efeitos sobre as respostas imunes inatas nesta espécie de peixe.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a sequência de DNA do gene que codifica o antígeno de imobilização IAG52A de um isolado brasileiro de *I. multifiliis* e do gene da IL-8 de *A. lacustris*.
- Clonar as sequências obtidas em plasmídeos pGEM®-T Easy Vector para obtenção de maiores quantidades da sequência pretendida.
- Produzir os plasmídeos pcDNA 3.1 contendo o gene da proteína IAG52A de *I. multifiliis* e o gene da citocina IL-8 de *A. lacustris*.

- Avaliar do efeito da imunização na expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  no baço e rim anterior dos peixes imunizados com os plasmídeos codificantes das proteínas de interesse.
- Avaliar do efeito da imunização com os plasmídeos na migração leucocitária na área de aplicação das injeções através de histologia convencional.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Obtenção dos exemplares de *A. lacustris*

Os exemplares de *A. lacustris* utilizados nos experimentos propostos no projeto inicial foram produzidos no Laboratório experimental para peixes, localizado no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP. Os peixes foram reproduzidos em laboratório e mantidos em condições controladas quanto a ocorrência de patógenos ou outros componentes que pudessem afetar as condições sanitárias dos peixes (CEUA nº 3960261020 - ID 001606).

Os animais foram mantidos em aquários de 40 litros com água da torneira filtrada por filtros de carvão ativado para a remoção de cloro e outros possíveis contaminantes (Figura 2) de acordo com o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do CONCEA. A temperatura foi mantida em aproximadamente 26 °C, controlada através de aquecedores e termostatos. O ambiente foi controlado semanalmente através de análise dos potenciais hidrogeniônico em peagâmetro eletrônico (Corning) e oxigênio dissolvido com oxímetro YSI – 55. A alimentação dos peixes foi realizada nos períodos da manhã e tarde com ração comercial para alevinos até a aparente saciedade.

Figura 2 – Aquários de manutenção dos peixes



Fonte: autoria própria

## 6.2 Isolamento dos terontes de *I. multifiliis*

Para obtenção da forma teronte, um peixe infectado naturalmente com a forma trofonte foi adquirido em *pet shops* locais, foi eutanasiado com overdose do anestésico cloridrato de lidocaína e colocado em um aquário com 10 litros de água da torneira filtrada para liberação dos parasitas. Os trofontes liberados se transformam em tomontes que se aderiram ao fundo do aquário. Para coletar essas formas, foram colocadas 4 placas de petri no fundo do aquário que foram removidas após 5 horas. As placas retiradas com os tomontes foram incubadas na mesma água do aquário a 23°C por 18 a 24 horas para a liberação dos terontes, que foram filtrados em peneiras com poro de 40 µm para remoção dos detritos (XU; KLESIUS, 2013).

Os terontes obtidos foram contados com o auxílio de uma da câmara de Sedgewick-Rafter e então transferidos para microtubos de 1,5 mL. O material foi centrifugado a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o pellet de terontes foi armazenado a -80°C para posterior extração de RNA.

### 6.3 Caracterização do cDNA do gene IAG52A de *I. multifiliis*

O RNA isolado da forma teronte foi extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante. O material foi tratado com a enzima DNase I para garantir a ausência de DNA genômico. A síntese de cDNA foi realizada por reação de transcrição reversa utilizando-se o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. Para a amplificação do gene pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), *primers* abrangendo a sequência completa da região codificante do gene foram desenhados a partir da sequência de um isolado dos EUA disponível no *GenBank* (número de acesso AF324424). As reações foram realizadas seguindo protocolo padrão já estabelecido em nosso laboratório, consistindo de 10-50 ng de cDNA, 2,5 µL de 10X DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, EUA), 0,5 µL de dNTPs (0,2 mM), 0,5 µL de cada *primer* (0,2 µM), 0,25 µL de DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific) e água ultrapura para um volume final de 25 µL. O programa da PCR consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* nas temperaturas específicas por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, precedidos por um passo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos e sucedidos por uma extensão terminal a 72°C por 3 minutos.

Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o tamanho das bandas comparado com o padrão 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 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) com os mesmos *primers* utilizados na amplificação, além de *primers* intermediários mais internos.

#### **6.4 Extração do RNA total e síntese do cDNA de *A. lacustris***

Para extração do RNA total, exemplares *A. lacustris* foram eutanasiados por overdose do anestésico cloridrato de lidocaína seguindo as normas de bioética de acordo com a legislação de utilização de animais para experimentação (Lei Federal Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 e Decreto Federal Nº 6899 de 15 de janeiro de 2009). Fragmentos de baço e rim anterior foram coletados assepticamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

O RNA total dos órgãos coletados dos lambaris foi extraído com o reagente TRIzol® (Life Technologies) segundo instruções do fabricante. Após a extração, a concentração e a pureza do RNA foram determinados pelas medidas da absorbância a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e pela leitura da razão a 260 e 280 nm (A260/A280) respectivamente, e armazenados a -80° C até a utilização. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% onde analisou-se a presença das bandas correspondentes às duas subunidades dos RNAs ribossomais. Os produtos foram tratados com a enzima DNase I.

A síntese de cDNA foi realizada por reação de transcrição reversa utilizando-se o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante a partir de 1 µg de RNA total.

#### **6.5 Caracterização do cDNA das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ de *A. lacustris***

As reações de amplificação e sequenciamento foram realizadas seguindo os mesmos protocolos descritos para a obtenção do antígeno IAG52A de *I. multifiliis* descritos acima, porém, com *primers* desenhados a partir de sequências de genes já descritas para *Astyanax mexicanus*, que é a espécie filogeneticamente mais próxima de *A. lacustris* com sequências disponíveis no *GenBank* [Números de acesso: XM\_022680751 (IL-1 $\beta$ ); XM\_007229283.2 (IL-8), XM\_015602024 (TNF $\alpha$ ) e XM\_049475233 (IFN $\gamma$ )].

Todos os pares de *primers* utilizados foram desenhados utilizando o programa Primer-BLAST (YE et al., 2012). A amplificação dos genes pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada seguindo protocolo padrão já estabelecido em nosso laboratório que consiste em 10-50 ng de cDNA, 22,5 µL de Platinum Supermix (Invitrogen), 0,5 µL de cada *primer* (0,2 µM) e água ultrapura para um volume final de 25 µL. O programa da PCR consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 30 segundos, hibridização dos *primers* nas temperaturas de 52°C para IFN $\gamma$  e 56°C para os demais genes por 60 segundos e extensão a 72° C por 60 segundos, precedidos por um passo de desnaturação inicial a 95° C por 3 minutos e sucedidos por uma extensão terminal a 72° C por 3 minutos.

Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o tamanho das bandas foi comparado com o padrão 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os amplicons foram diretamente purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) ou recuperados do gel com o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ligados ao plasmídeo pGEM®-T Easy Vector (Promega) e transformados em *Escherichia coli* cepa DH5a que foram semeadas em placas LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, 80 µg/mL de X-Gal e 0,5 mM de IPTG. Pelo menos três colônias transformantes foram isoladas e cultivadas overnight em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37°C em agitação de 200 RPM. Após esse período os plasmídeos foram isolados utilizando-se o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) e sequenciados utilizando-se o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, EUA) com os *primers* SP6 e T7 que hibridizam no plasmídeo nas regiões que flanqueiam os genes inseridos.

As sequências foram visualizadas, editadas e alinhadas no programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999) utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), obtendo-se, desta forma, uma sequência consenso para cada amostra. Cada sequência consenso foi então submetida a análise BLASTn para a busca de similaridade no banco de dados do *GenBank* (NCBI). As sequências de aminoácidos deduzidas tiveram sua busca de similaridade através da ferramenta BLASTp, além de uma análise de determinação de

domínios pela ferramenta Conserved Domain Search (CD-Search) no site do NCBI.

Para estimar as relações filogenéticas das sequências de aminoácidos geradas, elas foram comparadas com as sequências mais próximas de acordo com a busca BLASTp. A análise filogenética foi realizada pelo método Neighbor Joining com o modelo de substituição Poisson e 1000 repetições de *bootstrap* no programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

## 6.6 Caracterização completa do cDNA da citocina IL-8 de *A. lacustris*

Para utilização do gene da citocina IL-8 de *A. lacustris* como adjuvante molecular na vacina gênica, a sequência completa do cDNA foi determinada a partir de amplificações pela técnica de 5' e 3' *Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)* utilizando-se os kits *5' and 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Para amplificação da porção 3', foi utilizado um Oligo dT associado a uma região adaptadora que foi incluída no cDNA na síntese da primeira fita. Uma reação de amplificação por PCR foi então realizada utilizando um *primer forward* gene-específico em conjunto com um *primer reverse* complementar à região adaptadora.

Para a amplificação da região 5', a síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando *primers reverse* específicos para cada gene. Posteriormente, foi adicionado uma cauda homopolimérica dC na região 3' desse cDNA utilizando-se a enzima *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)* na presença de dCTP nesse cDNA de fita simples. Após esse processo, cada gene foi amplificado por PCR utilizando-se *primers reverses* específicos em conjunto com um *primer forward* complementar à cauda dC (Oligo dG).

Os produtos obtidos foram purificados, ligados ao plasmídeo pGEM® T-Easy Vector (Promega), transformados em *E. coli* e sequenciados como descrito no item 7.5.

## 6.7 Padronização dos *primers* para as reações de PCR em tempo real (qPCR).

Tendo obtido as sequências parciais dos genes propostos no estudo, foram desenhados *primers forward* e *reverse* específicos para a espécie *A. lacustris* para as análises de expressão gênica. Como genes de referência endógenos foram utilizados o gene  $\beta$ -actina e o gene 18s, cujos *primers* foram desenhados em regiões conservadas da sequência de *A. mexicanus* e submetidos às mesmas padronizações que os demais genes.

Cada par de *primers* foi padronizado a fim de determinar sua concentração ideal garantindo sua máxima eficiência e evitando a formação de estruturas secundárias (dímeros) que poderiam vir a interferir nas reações. A eficiência dos pares de *primers*, tanto dos genes alvos quanto dos controles endógenos, foi calculada a partir de curva padrão realizada com 6 diluições seriadas de 1:1 de cDNA seguindo a fórmula  $E=10^{(-1/\text{slope}) \times 100}$ . Apenas os *primers* que apresentaram eficiências entre 90 e 110% foram aprovados para o uso nas análises de expressão relativa.

As reações de qPCR foram realizadas em duplicata com um volume final de 10  $\mu$ L contendo 5  $\mu$ L de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e volumes correspondentes a concentrações entre 200 e 500 nM de cada *primer* a fim de verificar quais concentrações produziam os melhores valores de eficiência. Quanto ao cDNA, foi realizada uma curva contendo pontos de concentração igual a 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,125 ng, 1,56 ng e 0,78 ng para cada gene, além de água ultrapura para completar o volume final de 10  $\mu$ L. As reações foram realizadas no equipamento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Para verificar a presença de produtos inespecíficos ou possíveis contaminações, reações controle sem cDNA foram realizadas em cada análise de qPCR. Ao final de cada reação, foi realizada uma análise por curva de dissociação (curva de *melting*) para verificar a possível ocorrência de produtos inespecíficos ou dímeros de *primers*.

### **6.8 Construção dos plasmídeos pcDNA 3.1 contendo os genes IAG52A de *I. multifiliis* e IL-8 de *A. lacustris***

A amplificação e sequenciamento do gene que expressa a proteína IAG52A dos isolados brasileiros de *I. multifiliis* foi realizada utilizando-se *primers*

desenhados a partir da sequência disponível no banco de dados *GenBank* (número de acesso AF324424).

Para isso, o RNA total de terontes de *I. multifiliis* foi isolado utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada por reação de transcrição reversa utilizando-se o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. A amplificação dos genes pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada seguindo protocolo padrão já estabelecido em nosso laboratório, consistindo de 10-50 ng de cDNA, 22,5 µL de Platinum Supermix (Invitrogen) e 0,5 µL de cada *primer* (0,2 µM). O programa da PCR consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, precedidos por um passo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos e sucedidos por uma extensão terminal a 72°C por 3 minutos.

Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o tamanho das bandas foi comparado com o padrão 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os amplicons foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), ligados ao plasmídeo pGEM®-T Easy Vector (Promega) pelo método de clonagem T-A e transformados em *E. coli* cepa DH5a que foram semeadas em placas LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, 80 µg/mL de XGal e 0,5 mM de IPTG. Cinco colônias transformantes foram isoladas e cultivadas overnight em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37°C em agitação de 200 RPM. Após esse período os plasmídeos foram isolados utilizando-se o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) e sequenciados utilizando-se o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, EUA) com os mesmos *primers* utilizados na amplificação.

A expressão de proteínas de *I. multifiliis* em sistemas heterólogos apresenta um grande desafio devido à diferença na codificação dos aminoácidos que os ciliados possuem em relação a outros eucariotos. Em ciliados, os códons UAA e UAG codificam o aminoácido glutamina, enquanto que nos eucariotos e em bactérias são códons de terminação (PRESCOTT, 1994). Dessa forma, o gene IAG52A de *I. multifiliis* não pode ser utilizado diretamente para imunização

como vacina gênica devido à presença de vários códons de terminação/glutamina, o que provocaria a interrupção prematura da tradução das proteínas nos peixes vacinados. Para superar esse problema, a sequência obtida de IAG52A foi modificada e otimizada para expressão em lambaris onde os códons UAA e UGA foram modificados para CAA e CAG, que são os códons universais para glutamina em eucariotos. Além disso, a sequência foi submetida à otimização de códons de acordo com a frequência de tRNAs de cada aminoácido, utilizando como referência a sequência de *Astyanax mexicanus*, que é a sequência filogeneticamente mais próxima com tais dados disponíveis. Após a realização das modificações necessárias na sequência do gene IAG52A, ele foi produzido de forma sintética pela empresa FastBio e ligado ao plasmídeo de expressão em eucariotos pcDNA3.1 utilizando as enzimas de restrição *BamHI* na região 5' e *EcoRI* na região 3'. Para aumentar a eficiência da transcrição e tradução pelos peixes inoculados com essas vacinas gênicas, a sequência consenso de Kozak (AGAAACATG) (KOZAK, 1991) também foi adicionada na região 5' produzindo o plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A.

Para o gene IL-8 de *A. lacustris*, após a caracterização completa do cDNA, novos *primers* foram desenhados para amplificação das regiões codificantes completas e para introdução de sítios de restrição das enzimas *BamHI* nas pontas 5' e *EcoRI* nas pontas 3' dos genes, além da sequência Kozak na região 5'.

A amplificação e clonagem da região codificante da proteína IL-8 se iniciou no plasmídeo de multiplicação pGEM®-T Easy Vector (Promega) que foi transformado em *Escherichia coli* cepa DH5a, seguindo o protocolo descrito no item 7.5. Após essa etapa de multiplicação, os fragmentos foram digeridos com as enzimas *BamHI* e *EcoRI* e ligados no plasmídeo de expressão pcDNA3.1, para formar o plasmídeo pcDNA3.1-IL8, que foi utilizado como adjuvante molecular na vacina gênica.

## **6.9 Análise da transcrição do gene IAG52A de *I. multifiliis* em *A. lacustris* imunizados com o plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A**

Para verificar a transcrição do mRNA do antígeno IAG52A de *I. multifiliis* *in vivo*, 5 exemplares de lambari foram injetados por via intramuscular com 20 µg de plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A diluídos em 0,1 mL de água ultrapura na região dorsal direita utilizando uma seringa de insulina. Cinco peixes controle foram injetados com solução salina de NaCl 0,9% estéril.

Após 24h, os peixes foram eutanasiados por overdose do anestésico cloridrato de lidocaína e amostras da musculatura foram assepticamente coletadas tanto no local da injeção e quanto na musculatura do lado oposto ao injetado, para verificar a dispersão dos plasmídeos (Figura 3). O RNA das amostras foi extraído, tratado com DNase e convertido em cDNA como descrito no item 7.4. Para testar a eficiência da transcrição, as amostras foram submetidas à amplificação do gene IAG52A em PCR convencional utilizando *primers* específicos. O gene β-actina também foi amplificado como controle endógeno da reação.

Figura 3 – Coleta de amostras da musculatura dos lambaris imunizados



Fonte: autoria própria.

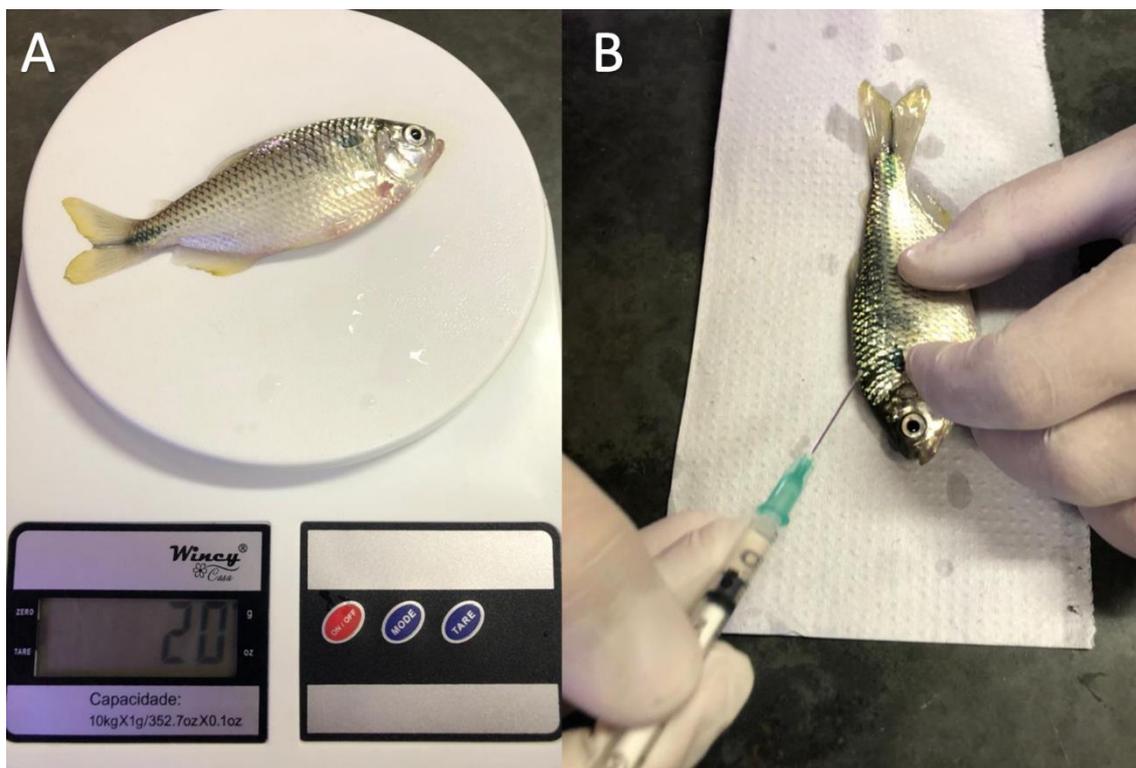
#### **6.10 Imunização de *A. lacustris* com os plasmídeos codificantes pcDNA3.1-IAG52A e pcDNA3.1- IL8**

Para a imunização de *A. lacustris* com os plasmídeos codificantes pcDNA3.1-IAG52A e pcDNA3.1- IL8, cem (100) exemplares de lambari pesando

de 10 a 30 g (Figura 4A), foram mantidos em aquários de 40 L de água filtrada sem cloro com aeração constante por duas semanas para a aclimação. Para a imunização, 75 desses peixes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (15 peixes cada) e imunizados por injeção intramuscular na região dorsal (Figura 4B) da seguinte forma:

- I. Peixes controle injetados com 0,2 mL de PBS estéril
- II. Peixes controle injetados com 20 µg do plasmídeo pcDNA3.1 (plasmídeo mock não contendo nenhum dos genes)
- III. Peixes imunizados com 20 µg do plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A diluídos em 0,1 mL de PBS estéril (plasmídeo contendo gene que expressa o antígeno vacinal)
- IV. Peixes imunizados com 20 µg do plasmídeo pcDNA3.1-IL-8 diluídos em 0,1 mL de PBS estéril (plasmídeo contendo o gene que expressa a interleucina adotada como adjuvante)
- V. Peixes imunizados com 20 µg do plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A + 20 µg do plasmídeo pcDNA3.1-IL-8 diluídos em 0,1 mL de PBS estéril (plasmídeo contendo gene que expressa o antígeno vacinal e plasmídeo contendo o gene que expressa a interleucina adotada como adjuvante)

Todos os grupos receberam uma dose de reforço utilizando-se a mesma metodologia 14 dias após a primeira imunização (WANG et al., 2016b). Transcorridas 6 horas a partir da segunda imunização (14 dias), 5 peixes de cada grupo foram eutanasiados com overdose do anestésico cloridrato de lidocaína para coleta de fragmentos de rim cranial e baço para análises de expressão das citocinas inflamatórias. O mesmo procedimento ocorreu após 24 horas da imunização. Após 14 dias da segunda imunização, os mesmos órgãos de mais 5 animais foram coletados. Em todas coletas, amostras de músculo no formato de pequenos cubos de aproximadamente 0,5x 0,5 x 0,5 cm foram retiradas do local de aplicação das vacinas para as análises histológicas.

Figura 4 – Exemplos de *A. lacustris* utilizados na imunização

Legenda: A – Morfometria dos espécimes de lambari utilizadas para a construção de grupos vacinais homogêneos (10-30g). B – Aplicação da vacina na região dorsal dos lambaris.

Fonte: autoria própria

### 6.11 Análise da expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$

A determinação dos níveis de expressão dos genes em estudo foi realizada pela técnica de PCR em tempo real quantitativo (qPCR). Como controle endógeno para as análises de expressão relativa, foi utilizado o gene constitutivo  $\beta$ -actina e o gene 18s. A padronização é fundamental para determinar a concentração ideal dos *primers* garantindo sua máxima eficiência e evitando formação de estruturas secundárias (dímeros) que possam interferir nas reações.

As reações de qPCR para a expressão dos genes foram realizadas em duplicata com um volume final de 10  $\mu$ L contendo 5  $\mu$ L de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 50-200 nM de cada *primer*, 10-50 ng de

cDNA e água ultrapura para completar o volume final de 10 µL. As reações foram realizadas no equipamento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). 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. Os dados relativos aos ciclos em que as amostras alcançaram o *Threshold* (Ct) foram coletados no passo de hibridização/extensão. Os dados dos Cts nas reações de qPCR dos genes alvo serão normalizados ( $\Delta$ Ct) pela média geométrica dos Cts dos genes de referência endógenos ( $\beta$ -actina e 18s). Os dados normalizados foram utilizados para calcular a expressão relativa pelo método  $2^{-\Delta Ct}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

## **6.12 Análise da migração leucocitária na musculatura injetada com as vacinas contendo os plasmídeos codificantes**

A migração de leucócitos para a área de aplicação das vacinas foi verificada por meio de amostras para análise histológica obtidas do tecido muscular de todos os peixes dos grupos experimentais e em todos os períodos de coleta realizados para as análises de expressão no rim anterior e no baço. A principal ação da IL-8 é o grande estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente neutrófilos, determinando ainda um aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais. Dessa forma, a análise pretendia verificar essa possível variação de células nos grupos que receberam a IL-8. Para isso, foram retiradas amostras de tecido muscular no exato local onde foi realizada a inoculação.

A secção muscular tinha o formato de pequenos cubos com aproximadamente 0,5 x 0,5 x 0,5 cm, que foram retirados do local de inoculação e fixados em solução de formol tamponado (PBS contendo 10% de formaldeído) por 24 h e, logo em seguida, armazenados em solução de etanol 70%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções com crescentes

concentrações de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Cortes semisseriais de 4 µm foram realizados com espaçamento de 50 µm e corados com hematoxilina e eosina (H&E).

Microfotografias foram capturadas utilizando microscópio de luz acoplado ao um computador equipado com o programa Axivision 4.1 no aumento 40x. Três imagens de cada amostra foram analisadas e cada uma tinha uma área quadrada de 273 µm do lado selecionado, onde os leucócitos presentes foram contados. Uma média foi obtida através da contagem do número de leucócitos de cada foto dividido pelo número de fotos. A densidade de leucócitos por mm<sup>3</sup> de músculo foi então calculada dividindo-se o número médio de leucócitos pelo fator de transformação (Ft). Ft, por sua vez, foi determinado utilizando as dimensões da foto (lado do quadrado de 276 µm), a espessura dos cortes (4 µm), seguindo a seguinte equação:

$$Ft = \text{Lado do Quadrado } (\mu\text{m})^3 / \text{Espessura do Corte } (\mu\text{m}) / 109.$$

### 6.13 Análise estatística

As variáveis quantitativas dos experimentos deste projeto foram analisadas utilizando-se o programa SAS® University Edition. Os dados foram submetidos à análise de normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (PROC UNIVARIATAE) e então submetidos à Análise de Variância (ANOVA). Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises estatísticas o nível de significância considerado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 7 RESULTADOS

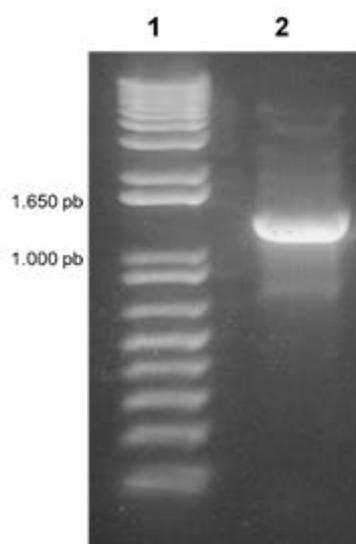
### 7.1 Caracterização do cDNA do gene IAG52A obtido de amostras nacionais e produção do gene sintético de IAG52A

Para a caracterização do cDNA de um isolado brasileiro de *I. multifiliis*, um exemplar de lambari naturalmente infectado por *I. multifiliis* obtido de um pet

shop do município de Pirassununga-SP foi submetido à raspagem das formas trofóntes da pele e mucosas com o auxílio de uma lamínula de microscopia. A lamínula contendo os parasitas foi em seguida lavada em água limpa e a amostra incubada em BOD a 23°C por aproximadamente 48 h até a eclosão das formas teróntes infectantes.

O RNA desses teróntes foi extraído e convertido em cDNA como descrito na metodologia. Para verificar a existência de alguma diferença entre a sequência do gene IAG52A do isolado brasileiro de *I. multifiliis* e o isolado cuja sequência está depositada no GenBank, os *primers* IAG52AF e IAG52AR foram desenhados para amplificar a sequência codificante completa desse gene. Para essa obtenção completa do cDNA foi realizada a técnica RACE para as regiões 3' e 5'. A reação de PCR gerou um produto com tamanho bem próximo ao esperado de 1.407 pares de base (pb) (Figura 5).

Figura 5 – Amplificação do isolado brasileiro de *I. multifiliis*.



Legenda: Gel de agarose 1,5%. 1: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 2: Produto da amplificação por PCR do gene IAG52A de *I. multifiliis*.

Fonte: autoria própria.

O produto foi então purificado do gel, ligado ao plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega), transformado em *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  e sequenciado. Foi obtida uma sequência de 1.407 nucleotídeos que, a partir da busca *BLASTn*, apresentou 100% de identidade com a sequência já depositada no *GenBank* de

um isolado de *I. multifiliis* dos Estados Unidos da América (Número de acesso: AF324424.1) (Figura 6).

Figura 6 – Alinhamento da sequência obtida no *GenBank*.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Ichthyophthirius multifiliis immobilization antigen isoform (IAG52A) gene, complete cds</a>	2599	2599	100%	0.0	100%	<a href="#">AF324424.1</a>

Legenda: Resultado da comparação da sequência de nucleotídeos obtida na amplificação do gene IAG52A de um isolado brasileiro de *I. multifiliis* com as sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank* pela busca BLASTn mostrando uma identidade de 100% com a sequência do isolado norte americano.

Fonte: autoria própria.

A sequência obtida foi então modificada nas posições em que ocorriam os códons UAA e UAG, que ciliados como *I. multifiliis* codificam o aminoácido glutamina enquanto outros eucariotos e bactérias reconhecem como códons de parada. Estes códons foram substituídos por CAA e CAG que, em eucariotos, são os códons universais para glutamina. Foram realizadas 18 modificações de códons, sendo 16 de UAA para CAA e 2 de UAG para CAG (Figura 7). Após as modificações a sequência foi enviada para a produção do gene sintético por uma empresa prestadora de serviços genômicos.

Figura 7 – cDNA de IAG52A de *I. multifiliis* com tradução dos aminoácidos

1	ATG AAA AAT AAT ATT TTA GTA ATA TTG ATT ATT TCA TTA TTT ATC	45
1	M K N N I L V I L I I S L F I	15
46	AAT TAA ATT AAA TCT GCT AAT TGT CCT GTT GGA ACT GAA ACT AAC	90
16	N * I K S A N C P V G T E T N	30
91	ACA GCC GGA TAA GTT GAT GAT CTA GGA ACT CCT GCA AAT TGT GTT	135
31	T A G * V D D L G T P A N C V	45
136	AAT TGT TAG AAA AAC TTT TAT TAT AAT AAT GCT GCT GCT TTC GTT	180
46	N C * K N F Y Y N N A A A F V	60
181	CCT GGT GCT AGT ACG TGT ACA CCT TGT CCA TAA AAA AAA GAT GCT	225
61	F G A S T C T P C P * K K D A	75
226	GGT GCT TAA CCA AAT CCA CCT GCT ACT GCT AAT TTA GTC ACA TAA	270
76	G A * P N P P A T A N L V T *	90
271	TGT AAC GTT AAA TGC CCT GCT GGT ACC GCA ATT GCA GGT GGA GCA	315
91	C N V K C P A G T A I A G G A	105
316	ACA GAT TAT GCA GCA ATA ATC ACA GAA TGT GTT AAT TGT AGA ATT	360
106	T D Y A A I I T E C V N C R I	120
361	AAT TTT TAT AAT GAA AAT GCT CCA AAT TTT AAT GCA GGT GCT AGT	405
121	N F Y N E N A P N F N A G A S	135
406	ACA TGC ACA GCT TGT CCG GTA AAC AGA GTT GGT GGT GCA TTG ACT	450
136	T C T A C P V N R V G G A L T	150
451	GCT GGT AAT GCC GCT ACC ATA GTC GCA TAA TGT AAC GTC GCA TGT	495
151	A G N A A T I V A * C N V A C	165
496	CCT ACT GGT ACT GCA CTT GAT GAT GGA GTA ACT ACT GAT TAT GTT	540
166	P T G T A L D D G V T T D Y V	180
541	AGA TCA TTC ACA GAA TGT GTT AAA TGT AGA CTT AAC TTT TAC TAT	585
181	R S F T E C V K C R L N F Y Y	195
586	AAT GGT AAT AAT GGT AAT ACT CCT TTC AAT CCA GGT AAA AGT TAA	630
196	N G N N G N T P F N P G K S *	210
631	TGC ACA CCT TGT CCG GCA ATT AAA CCT GCT AAT GTT GCT TAA GCT	675
211	C T P C P A I K P A N V A * A	225
676	ACT TTA GGT AAT GAT GCT ACA ATA ACC GCA TAA TGT AAC GTT GCA	720
226	T L G N D A T I T A * C N V A	240
721	TGC CCT GAT GGT ACT ATA AGT GCT GCT GGA GTA AAT AAT TGG GTA	765
241	C P D G T I S A A G V N N W V	255
766	GCA CAA AAC ACT GAA TGT ACT AAT TGT GCT CCT AAC TTT TAC AAT	810
256	A Q N T E C T N C A P N F Y N	270
811	AAT AAT GCT CCT AAT TTC AAT CCA GGT AAT AGT ACA TGC CTA CCT	855
271	N N A P N F N P G N S T C L P	285
856	TGC CCA GCA AAT AAA GAT TAT GGT GCT GAA GCC ACT GCA GGT GGT	900
286	C P A N K D Y G A E A T A G G	300
901	GCC GCT ACT TTA GCC AAA TAA TGT AAT ATT GCA TGC CCT GAT GGT	945
301	A A T L A K * C N I A C P D G	315
946	ACT GCA ATT GCT AGT GGA GCA ACT AAT TAT GTA ATA TTA TAA ACA	990
316	T A I A S G A T N Y V I L * T	330
991	GAA TGT CTA AAT TGT GCT GCT AAC TTT TAT TTT GAT GGT AAT AAT	1035
331	E C L N C A A N F Y F D G N N	345
1036	TTC TAG GCA GGA AGT AGT AGA TGC AAA GCA TGT CCA GCA AAT AAA	1080
346	F * A G S S R C K A C P A N K	360
1081	GTT TAA GGC GCT GTA GCA ACT GCA GGT GGT ACT GCT ACT TTA ATT	1125
361	V * G A V A T A G G T A T L I	375
1126	GCA TAA TGT GCC CTT GAA TGC CCT GCT GGT ACT GTA CTC ACC GAT	1170
376	A * C A L E C P A G T V L T D	390
1171	GGA ACA ACA TCT ACT TAT AAA TAA GCA GCA TCT GAA TGT GTT AAA	1215
391	G T T S T Y K * A A S E C V K	405
1216	TGT GCT GGC AAC TTT TAT ACT ACA AAA TAA ACT GAT TGG GTA GCA	1260
406	C A A N F Y T T K * T D W V A	420
1261	GGT ATT GAT ACA TGT ACT AGT TGT AAT AAA AAA TTA ACT TCT GGC	1305
421	G I D T C T S C N K K L T S G	435
1306	GCT GAA GCT AAT TTA CCT GAA TCT GCT AAA AAA AAT ATA TAA TGT	1350
436	A E A N L P E S A K K N I * C	450
1351	GAT TTC GCT AAT TTT TTA TCA ATT TCC TTA TTA TTG ATT TCT TAT	1395
451	D F A N F L S I S L L L I S Y	465
1396	TAT TTA TTA TGA	1407
466	Y L L * *	469

Legenda: Sequência do cDNA de IAG52A de *I. multifiliis* indicando posições em que os códons foram modificados. UAG e UAA são tidos na sequência de DNA complementar como TAG e TAA, respectivamente.

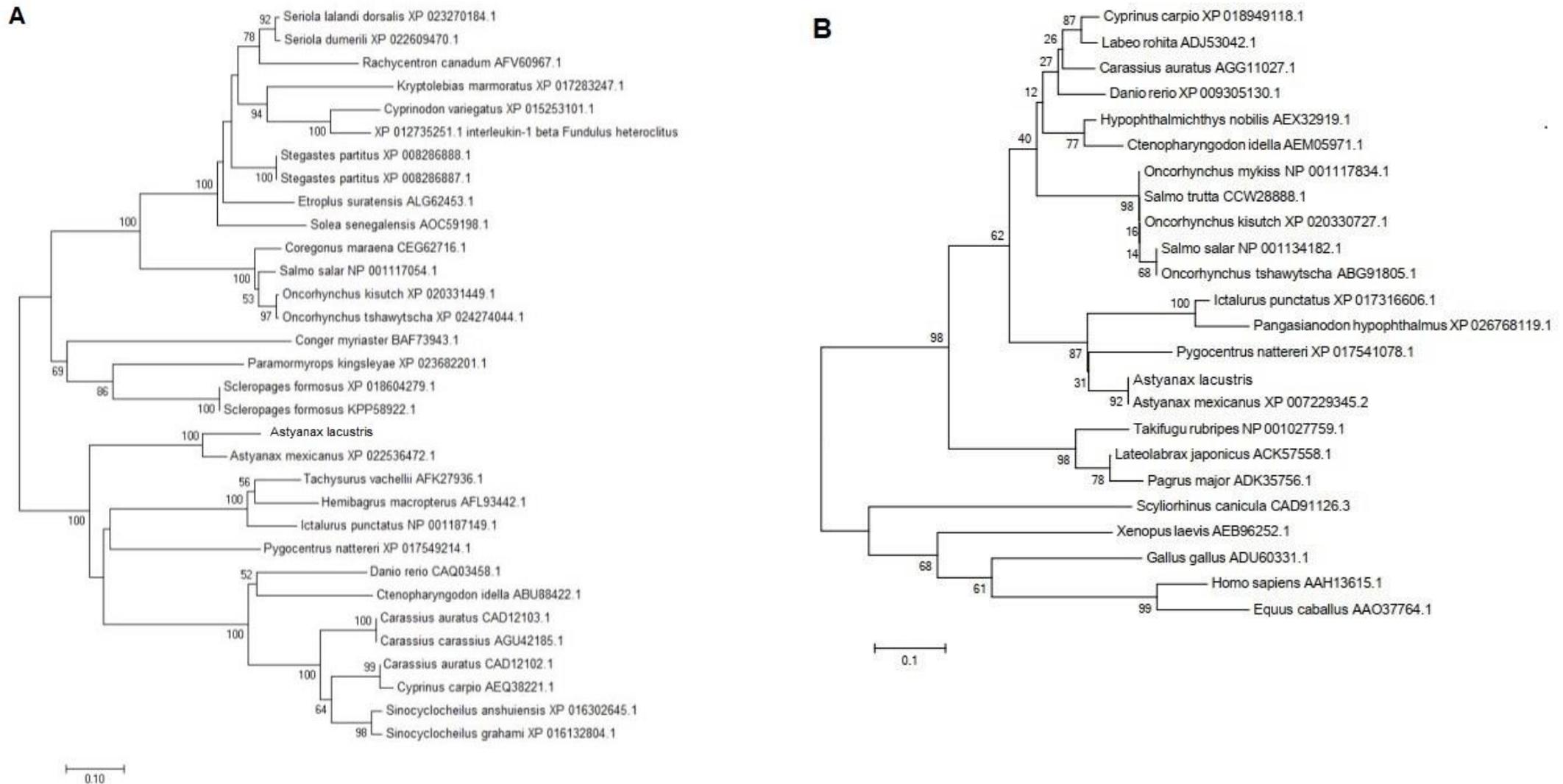
Fonte: autoria própria

## **7.2 Caracterização do cDNA das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ *A. lacustris***

Os genes da IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  lambari foram caracterizados. As ampliações parciais dos genes das citocinas geraram fragmentos de 717, 153, 234 e 255, nucleotídeos para os genes IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  respectivamente. As análises *BLASTn* para as sequências de nucleotídeos de todos os genes analisados apresentaram alta similaridade em relação aos fragmentos dos mesmos genes depositados para outras espécies, em especial para as sequências preditas do peixe *A. mexicanus*. Quando comparado com as sequências de nucleotídeos da IL-1 $\beta$ , houve uma identidade de 94% com *A. mexicanus*. Para o gene da IL-8, esta identidade foi de 96,2 %. Na sequência de nucleotídeos do fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), a identidade com a espécie *A. mexicanus* foi de 94,5%. Também em relação aos nucleotídeos, análise *BLASTn* para a sequência da citocina IFN $\gamma$ , encontrou 98,05% de correspondência com a espécie *A. mexicanus*. As sequências deduzidas de proteínas da IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  geraram, respectivamente, 239, 51, 78 e 85 aminoácidos. As proteínas foram utilizadas na análise *BLASTp* que demonstrou a presença de domínios específicos característicos de cada uma dessas proteínas.

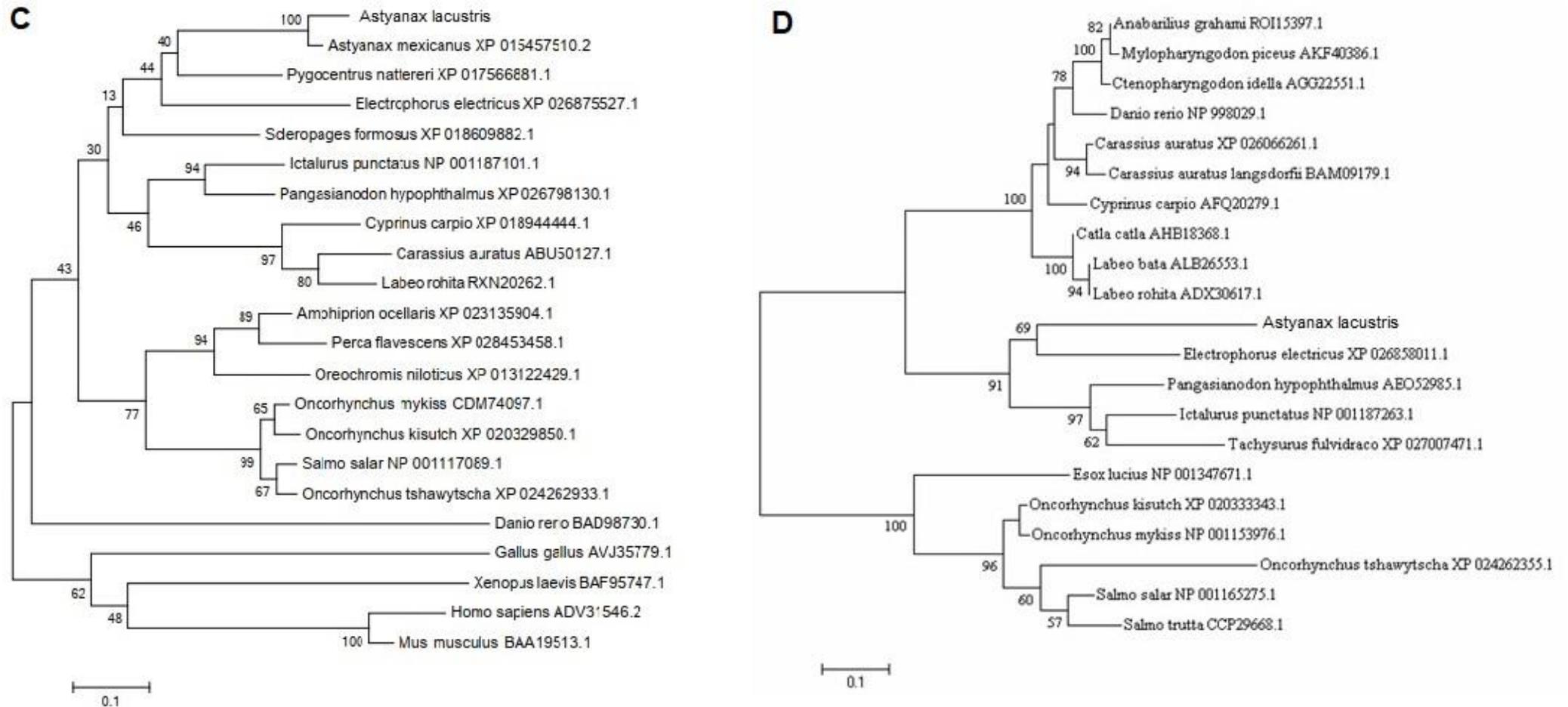
A análise filogenética das citocinas também foi realizada com as sequências de aminoácidos obtidas em comparação com as sequências mais próximas destas depositadas no banco de dados do *GenBank* (Figura 8A, 8B, 8C, 8D)

Figura 8 – Árvores filogenéticas de Neighbor Joining



Legenda: Árvore filogenética Neighbor Joining comparando a sequência de aminoácidos de *A. lacustris* com as sequências das espécies mais próximas de acordo com a pesquisa BLAST. Números acima dos ramos indicam os níveis de confiabilidade obtidos nas análises de *bootstrap*. Valores inferiores a 50 foram omitidos. **A** - Análise dos aminoácidos da IL-1 $\beta$ . **B** - Análise dos aminoácidos da IL-8.

Fonte: autoria própria.



Legenda: Árvore filogenética Neighbor Joining comparando a sequência de aminoácidos de *A. lacustris* com as sequências das espécies mais próximas de acordo com a pesquisa BLAST. Números acima dos ramos indicam os níveis de confiabilidade obtidos nas análises de *bootstrap*. Valores inferiores a 50 foram omitidos. **C** - Análise dos aminoácidos da TNFα. **D** - Análise dos aminoácidos da IFNγ.

Fonte: autoria própria.

### 7.3 Caracterização da sequência completa de IL-8 de *A. lacustris*

De posse da sequência parcial do gene da citocina IL-8 de *A. lacustris* que foi utilizado como adjuvante molecular na vacina gênica, a caracterização completa do cDNA do gene IL-8 de *A. lacustris* foi realizada através da técnica RACE para as regiões 3' e 5'. Como essa técnica se baseia na ligação de adaptadores nas pontas do cDNA e amplificação utilizando apenas um dos *primers* específicos para o gene alvo, a eficiência de amplificação pode ser baixa e muitas vezes há amplificação de fragmentos inespecíficos.

Após diversas tentativas com diferentes *primers*, o cDNA completo desse gene foi obtido com sucesso apresentando 878 nucleotídeos (nt) subdivididos em uma região não traduzida 5' (5' UTR) de 242 nt, uma região 3' UTR de 348 nt e uma região codificante de 288 nt, que quando traduzida gerou uma proteína de 96 aminoácidos.

Essa sequência de aminoácidos foi analisada pela ferramenta Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015) onde foi observado a presença de um peptídeo sinal entre os aminoácidos 1-20 e o domínio SCY, caracterizado pela presença de 4 cisteínas conservadas envolvidas pela formação de 2 pontes dissulfeto responsáveis pela manutenção da estrutura terciária da proteína e que é específico de proteínas da família de quimiocinas CXC (Figura 9).

Figura 9 – Domínios da proteína IL-8 de *A. lacustris*



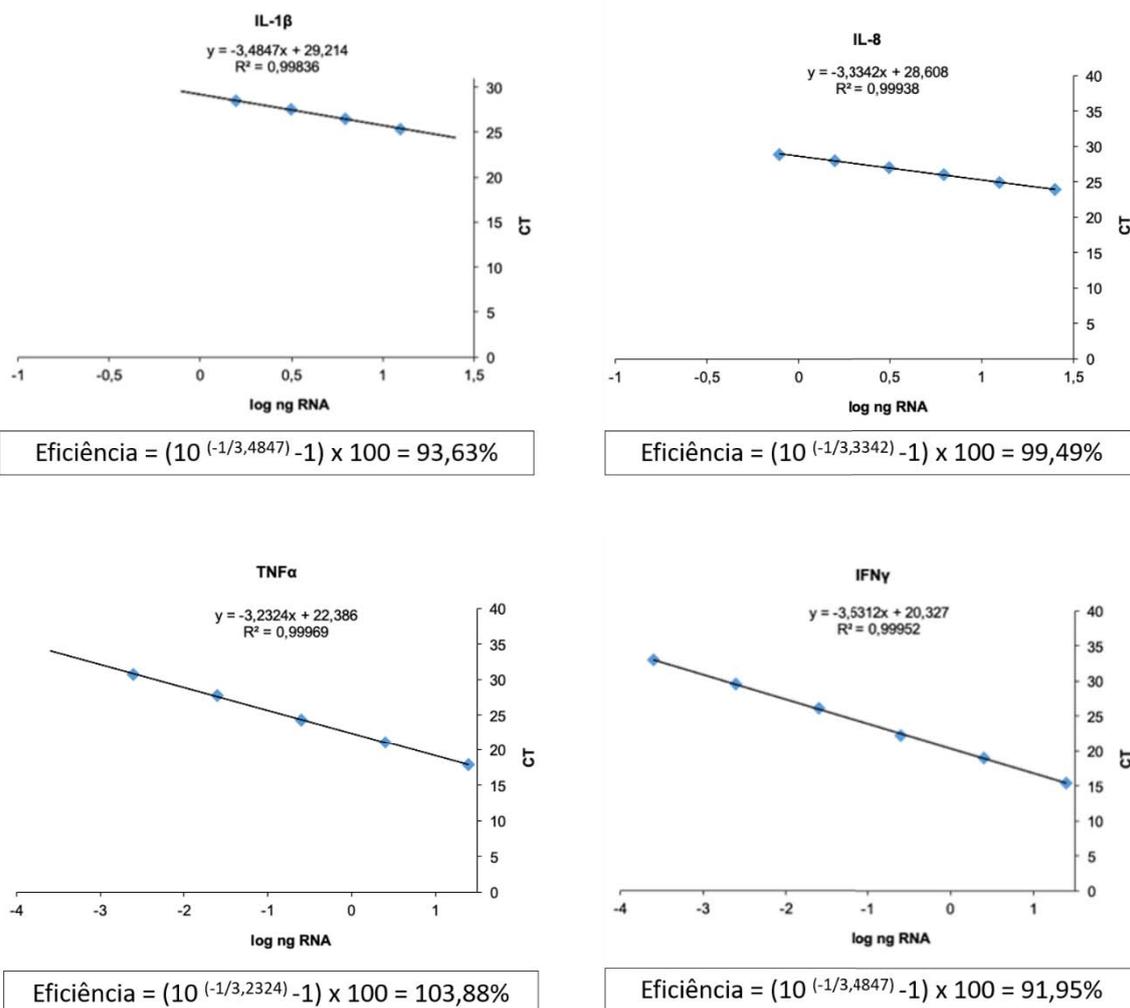
Legenda: Análise dos domínios da sequência de aminoácidos da proteína IL-8 de *A. lacustris* pela ferramenta SMART. Retângulo vermelho representa o peptídeo sinal e SCY indica o domínio de quimiocinas CXC.

Fonte: autoria própria

Além disso, análise realizada com a ferramenta NetPhos 3.1 (BLUM; GAMMELTOFT; BRUNAK, 1999) para previsão de sítios de fosforilação indicou a presença de 9 resíduos possivelmente fosforilados, sendo 6 serinas nas posições 9, 22, 35, 39, 48 e 96, e 3 treoninas nas posições 16, 61 e 66.

#### **7.4. Padronização e cálculo de eficiência dos *primers* para as reações de qPCR**

A partir das sequências de nucleotídeos obtidas foram desenhados os *primers* específicos para quantificação da expressão dos genes por qPCR. A padronização dos *primers* é um processo fundamental onde são determinadas as variáveis ótimas para cada reação como concentração de amostra e do *primer* e temperatura ideal para hibridização de cada par de *primer* para uma melhor eficiência nas reações. Esse processo foi realizado para os *primers* dos genes IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Para os genes de referência endógenos ( $\beta$ -actina e 18s), a padronização foi feita em estudos anteriores. As eficiências foram consideradas satisfatórias quando apresentaram valores entre 90% e 110% sendo que para quatro genes foram obtidos valores dentro deste intervalo (Figura 10).

Figura 10 – Gráficos de eficiência de amplificação dos *primers* de qPCR

Legenda: Gráficos de eficiência de amplificação dos *primers* de qPCR obtidos a partir de curvas padrão com diluições seriadas de amostras 1:1. Os dados dos ciclos em que a amplificação cruzou o limiar de detecção (Ct) estão apresentados em relação ao log da concentração de RNA (em ng) utilizado para a obtenção de cada Ct. O cálculo de eficiência apresentado foi realizado utilizando-se a fórmula  $E=10^{(-1/\text{slope})} \times 100$ .

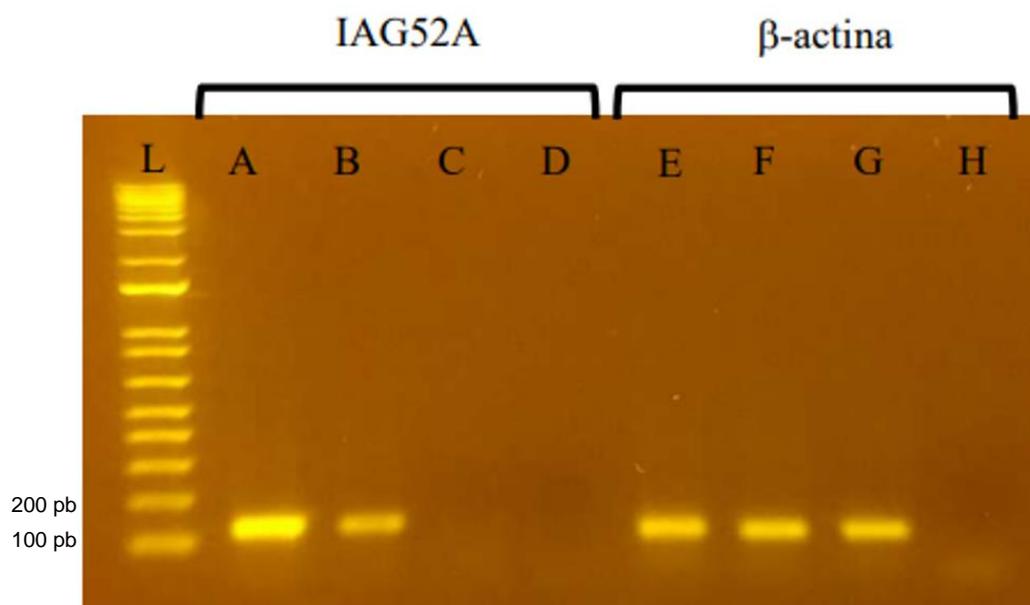
Fonte: autoria própria.

### 7.5 Análise da transcrição do gene IAG52A de *I. multifiliis* na musculatura de *A. lacustris* imunizados com o plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A

Com o objetivo de avaliar se o plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A estava sendo transcrito no tecido muscular do hospedeiro, amostras do músculo de exemplares de *A. lacustris* foram obtidas no local da imunização. As amostras de músculo coletadas tanto do lado direito quanto do esquerdo da região dorsal

dos peixes inoculados apresentaram amplificação utilizando-se *primers* que foram desenhados especificamente para o gene IAG52A de *I. multifiliis* modificado visando a amplificação de um curto trecho da sequência codificante total. As amplificações geraram produtos do tamanho esperado para os *primers* utilizados (aproximadamente 130 pb) (Figura 11).

Figura 11 – Gel de agarose demonstrando a amplificação do gene IAG52A no tecido muscular de *A. lacustris*



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para análise de amplificação dos genes IAG52A de *I. multifiliis* e *b-actina* em amostras de músculo de lambari. (L) Padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (A e E) músculo dorsal direito de peixe injetado com plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A; (B e F) músculo dorsal esquerdo de peixe injetado com plasmídeo pcDNA3.1-IAG52A; (C e G) músculo dorsal direito de peixe controle injetado com solução salina NaCl 0,9%; (D e H) controles negativos das reações.

Fonte: autoria própria

## 7.6 Análise da expressão dos genes das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$

A determinação dos níveis de expressão dos genes em estudo foi realizada pela técnica de RT-qPCR. Como controle endógeno para as análises de expressão relativa, foi utilizado o gene constitutivo  $\beta$ -actina e o gene 18s. Foram realizadas coletas do baço e rim anterior de 5 animais às 6h, às 24h e aos 14 dias após a segunda dose da vacina. Os perfis de expressão de citocinas

encontrados no baço e no rim cranial podem ser observados nas Figuras 12 e 13.

A expressão de IL-1 $\beta$  no baço foi significativamente maior no grupo IAG+IL-8 após 6 h ( $P = 0,0085$ ) e nos grupos IAG e IAG+IL-8 após 14 dias ( $P = 0,0256$ ), quando comparados com o grupo controle. No rim cranial, a expressão de IL-1 $\beta$  não apresentou diferença significativa após 6 e 24 h ( $P > 0,05$ ), porém houve um aumento nos peixes injetados com IAG e IAG+IL-8 quando comparados aos grupos controle, MOCK, e IL-8 ( $P = 0,0242$ ).

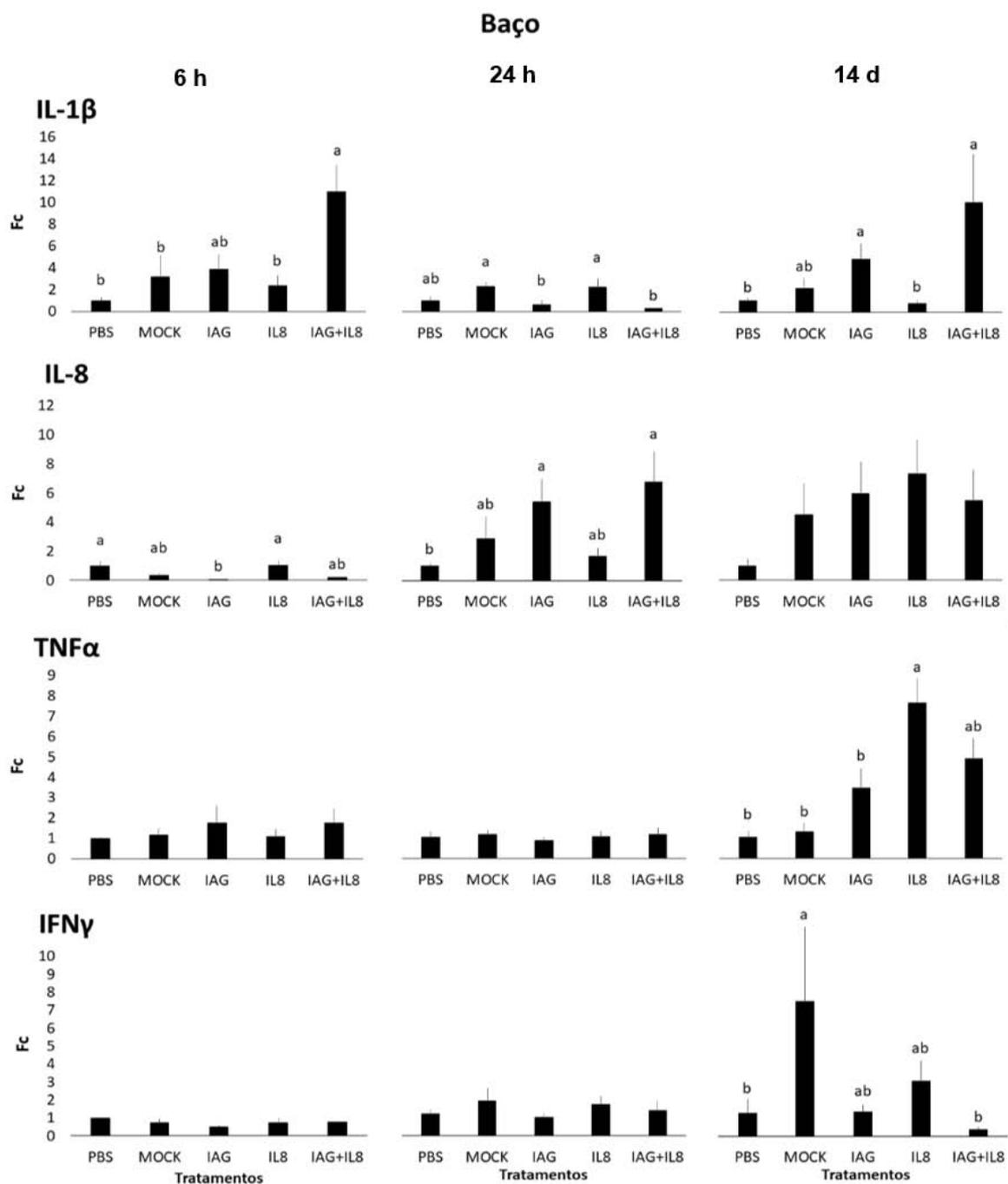
A expressão de IL-8 no baço não apresentou diferenças significativas entre grupos após 6 h. Após 24 h, os grupos IAG e IAG+IL-8 apresentaram expressões maiores que o grupo controle, porém não se diferiram significativamente dos demais grupos ( $P = 0,0436$ ). Nenhuma diferença estatística foi observada na expressão de IL-8 no baço 14 dias após a aplicação ( $P > 0,05$ ). Em contrapartida, no rim cranial, as amostragens de 6 e 24 h após a aplicação não resultou em diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Após 14 dias, pode-se observar uma variação nos grupos que receberam as diferentes composições vacinais entre si porém, nenhum dos grupos diferiu-se significativamente do grupo controle ( $P = 0,0002$ ).

No baço, não foi possível observar diferenças significativas na expressão de TNF $\alpha$  após 6 e 24 h ( $P > 0,05$ ). Em contrapartida, após 14 dias, a expressão de TNF $\alpha$  apresentou uma *up-regulation* no grupo IL-8 quando comparada com os grupos controle, MOCK e IAG ( $P = 0,0003$ ). No rim cranial, após 6 h e após 24 h, nenhuma diferença entre os grupos foi detectada ( $P > 0,05$ ). Após 14 dias, o grupo IAG apresentou um aumento na expressão de TNF $\alpha$  quando comparado aos grupos controle e IL-8, porém este aumento não foi suficiente para diferir-se dos grupos MOCK e IAG+IL-8 ( $P = 0,0136$ ).

A expressão de IFN $\gamma$  não apresentou diferença significativa nas amostras de baço nos após 6 e 24 h ( $P > 0,05$ ). Após 14 dias, o grupo MOCK apresentou dados com grande variação. Apesar disso, a expressão deste grupo que recebeu o plasmídeo sem inserto foi consideravelmente maior que a dos demais grupos, diferindo-se significativamente dos animais controle PBS ( $P = 0,0291$ ). No rim

cranial, a expressão de IFN $\gamma$ , após 6 h, foi diminuída nos grupos MOCK, IL-8 e IAG+IL-8 quando comparados com o grupo controle, e o grupo injetado apenas com IAG apresentou expressão similar aos demais grupos ( $P = 0,0078$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada na amostragem de 24 h ( $P > 0,05$ ). Após 14 dias, pode-se notar uma maior expressão de IFN $\gamma$  no grupo IAG quando comparado aos grupos MOCK e IL-8, no entanto, nenhum grupo diferiu-se do controle ( $P = 0,0226$ ).

Figura 12 – Expressão das citocinas obtidas em amostras de baço de *A. lacustris*, em vários períodos após a imunização.



Legenda: Expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  no baço de *A. lacustris* injetados com PBS estéril, plasmídeo MOCK sem inserto, plasmídeo contendo IAG52A, plasmídeo contendo IL-8 e plasmídeo contendo IAG52A+IL-8. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos nas análises de  $2^{-\Delta Ct}$  (Fc = fold change). Letras diferentes indicam médias diferentes de acordo com teste de múltiplo alcance de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

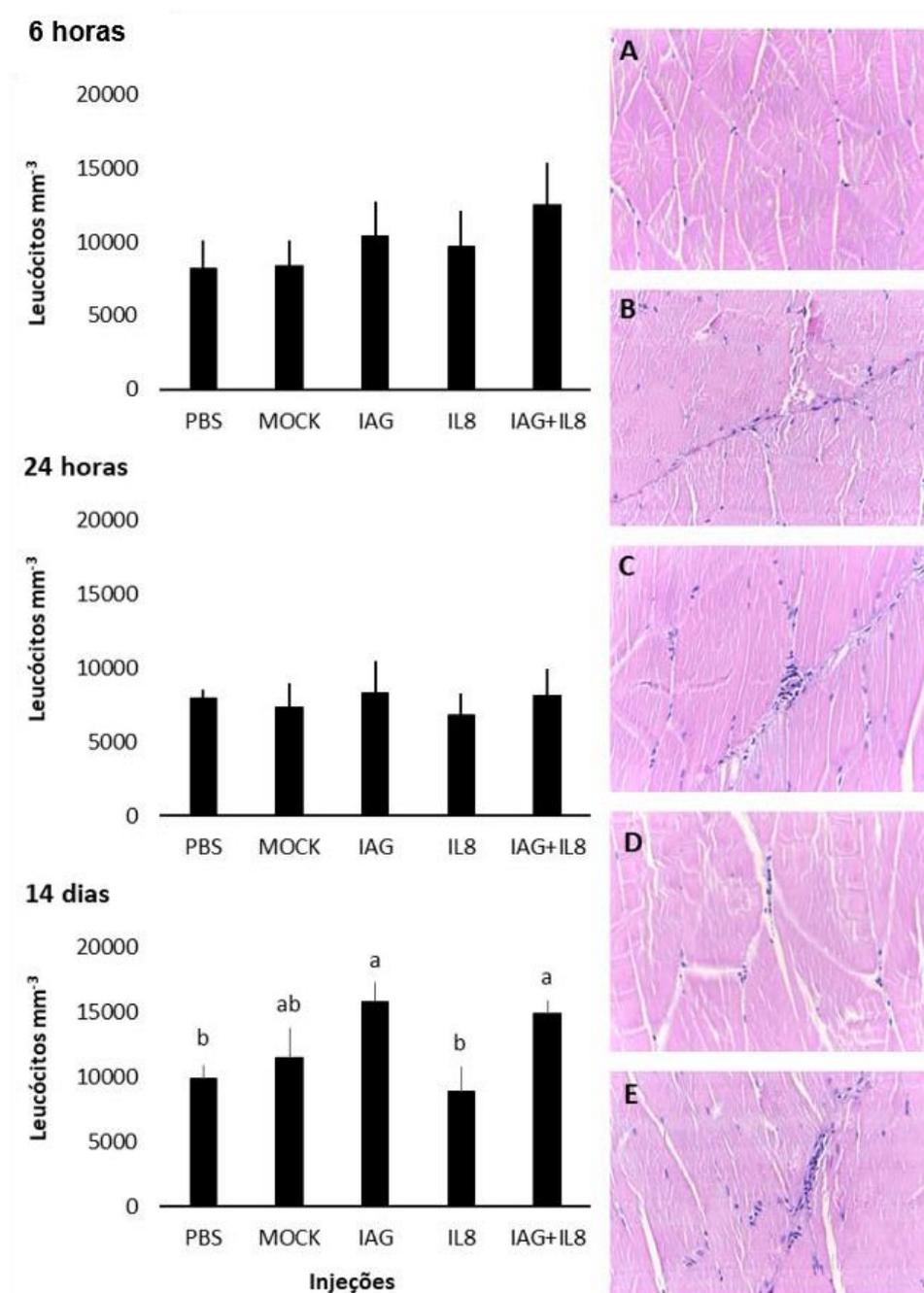
Fonte: autoria própria.



### **7.7 Análise histológica das amostras musculares de *A. lacustris* imunizados com a vacina gênica**

A análise histológica das amostras de músculo onde foram inoculadas as vacinas, teve como objetivo quantificar os leucócitos no sítio de inoculação dos plasmídeos vacinais. Os resultados demonstraram que não houve diferença na concentração leucocitária entre os tecidos dos grupos imunizados e dos grupos controle (Figura 14) após 6 e 24 h da segunda dose ( $P > 0,05$ ). No entanto, após 14 dias, foi possível observar uma densidade maior de leucócitos nos sítios de aplicação nos grupos que receberam IAG e com IAG+IL-8 quando comparados ao controle ( $P = 0,0008$ ). Após 14 dias, os peixes que receberam MOCK não se diferiram estatisticamente do grupo controle, assim como os peixes que receberam apenas a vacina composta por IL-8 que apresentaram a mesma densidade de leucócitos do grupo controle.

Figura 14 – Gráficos das densidades leucocitárias e os cortes histológicos da musculatura dos peixes vacinados 14 dias após a segunda dose



Legenda: Gráficos representando as densidades médias de leucócitos por mm<sup>3</sup> de músculo na área de aplicação das injeções dos 5 tratamentos, determinadas após 6 h, 24 h e 14 dias da aplicação das injeções. Letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com teste multiparâmetro de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ). As imagens A, B, C, D e E representam o corte histológico da musculatura dos peixes na região vacinada que foram injetados com PBS estéril, plasmídeo MOCK sem inserto, plasmídeo contendo IAG52A, plasmídeo contendo IL-8 e plasmídeo contendo IAG52A+IL-8, respectivamente, coletados 14 dias após a vacinação.

Fonte: autoria própria

## 8 DISCUSSÃO

Na a caracterização do cDNA de um isolado brasileiro de *I. multifilis*, a sequência de nucleotídeos obtida demonstrou 100% de identidade com a sequência já depositada no *GenBank*. Esses resultados indicaram que as metodologias já estabelecidas para a utilização desse i-Ag, desenvolvidas a partir da sequência do isolado norte americano, possuem potencial para serem aplicadas no isolado brasileiro. Cabe ressaltar que o antígeno de imobilização selecionado nesta proposta (IAG52A), assim como o IAG52B, são tidos na literatura como os principais candidatos à produção de agentes vacinais contra a ictioftíriase, tendo sido utilizados em outros estudos na tentativa de imunizar exemplares de *Ictalurus punctatus* (VON GERSDORFF JØRGENSEN et al., 2012).

Na etapa de caracterização e análise dos nucleotídeos pela ferramenta *BLASTn* para as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  de *A. lacustris*, conforme o esperado, foi demonstrada uma alta similaridade das sequências em relação aos fragmentos dos mesmos genes depositadas para o peixe *A. mexicanus*. A sequência de nucleotídeos da citocina IFN $\gamma$  analisada pelo *BLASTn* não apresentou homologia com sequências obtidas de outras espécies de peixes próximas além de *A. mexicanus*. Possivelmente isso se deve por se tratar de uma sequência muito curta ou com diferenças muito significativas das demais depositadas no *GenBank*. Entretanto, a tradução do gene da IFN $\gamma$  em aminoácidos e a análise *BLASTp* gerou correspondência com sequências de IFN $\gamma$  de outras espécies de peixes, sendo *A. mexicanus* a espécie mais próxima também nessa análise (98,82%), seguido por *Colossoma macropomum* (68,24%), possibilitando a confirmação de que o fragmento amplificado de *A. lacustris* se tratava de fato desse gene.

Todas as proteínas obtidas e submetidas à análise *BLASTp* no NCBI, que possibilita a visualização de domínios, demonstraram domínios específicos para estas sequências de aminoácidos, indicando que suas funções são similares às de outras espécies já descritas na literatura. Esse resultado é importante para poder guiar a utilização das proteínas como marcadores no estudo.

Na análise filogenética, o agrupamento dos clados confirmaram com alto valor de confiabilidade (*bootstrap* = 100) que a espécie cuja sequência possui maiores semelhanças com as sequências caracterizadas para o peixe *A. lacustris* é a *A. mexicanus*. Essa organização só não foi observada para o gene da IFN $\gamma$  devido à ausência da sequência deste gene para o *A. mexicanus* na análise BLAST. Além disso, a organização filogenética dos genes demonstrou que o segundo peixe mais próximo foi o *Pygocentrus nattereri*, também um peixe da ordem Characiforme, de água doce, com distribuição ampla nas Américas. O peixe não caraciforme mais próximo das sequências caracterizadas foi a espécie *Ictalurus punctatus*, um siluriforme encontrado principalmente na América do Norte.

Antes da realização dos ensaios vacinais propriamente ditos, foi fundamental a execução de uma etapa que pudesse verificar a capacidade do *A. lacustris* em transcrever, de forma heteróloga, o gene IAG52A de *I. multifilis*. Após a inoculação dos animais e a coleta de amostras de músculo tanto do lado direito quanto do esquerdo da região dorsal dos peixes inoculados, e a reação de PCR específico para o gene IAG52A, foi verificado que a intensidade da banda cuja amplificação ocorreu do lado onde houve a injeção do plasmídeo foi consideravelmente maior em relação ao lado oposto. Esse resultado era esperado de acordo com o sítio de aplicação. Apesar disso, a presença de bandas amplificadas a partir de amostras da musculatura de ambos os lados, indicam que após 24h da inoculação do plasmídeo já é possível observar sua dispersão por outras partes do tecido do lambari.

As vacinas de DNA plasmidial oferecem uma série de vantagens importantes sobre as modalidades de vacinas tradicionais. A vacinação com DNA leva ao processamento e apresentação do antígeno em associação com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I e classe II (MHC I e MHC II). Foi demonstrado que a imunização intramuscular com vacinas de DNA resulta na transfecção de células *in vivo* no local da inoculação e que isso induz respostas imunes humoral e celular (BAROUCH; LETVIN; SEDER, 2004; ULMER et al., 1993) . Dentre as respostas desencadeadas, também recebe destaque o aumento de citocinas. As citocinas são conhecidas por

estarem envolvidas em respostas inflamatórias nos estágios iniciais das infecções (SECOMBES; HARDIE; DANIELS, 1996) possuindo grande importância para que as células do sistema imunológico comuniquem entre si, além de servirem de comunicação entre as demais células do organismo com as células do sistema imune, afetando assim sua motilidade, quimiotaxia, atividade fagocitária e citotoxicidade (FRANKENSTEIN; ALON; COHEN, 2006).

Em relação aos dados das análises de expressão, a citocina IL-1 $\beta$ , conhecida como um pirógeno endógeno por induzir febre em mamíferos durante as infecções, é uma das principais responsáveis pela atividade pró inflamatória nos tecidos invadidos, participando também na apresentação de antígenos (HUISING et al., 2004). No presente experimento, principalmente após 14 dias da aplicação da segunda dose, pode-se observar que a expressão de IL-1 $\beta$  foi maior no grupo injetado com IAG+IL-8 quando comparado com os outros grupos, indicando que a combinação dos dois genes vacinais no plasmídeo pode potencializar sua interação com o sistema imune dos peixes. Estudos descrevem que nos primeiros 15 minutos após a detecção de agente invasores, ocorre um aumento dos níveis de RNA mensageiro da citocina IL-1 $\beta$  e que, no entanto, devido a mecanismos de feedback negativo regido pela síntese de um repressor do processo de transcrição, vão diminuindo após o período de quatro horas, evitando processos inflamatórios excessivos e controlando a resposta imune (DINARELLO, 1996). Tais resultados podem explicar a diferença entre amostragens observada na expressão geral de IL-1 $\beta$  no baço, sendo um aumento da expressão global após 6 h, seguida de uma diminuição após 24 h e retornando a uma maior expressão global após 14 dias.

Na resposta imune inata dos peixes à ictiofitiríase, um estudo realizado em carpas, avaliando as principais respostas inflamatórias causadas por Ich, relatou que os níveis de expressão do gene IL-1 $\beta$  atingiram um aumento máximo de 150 vezes na pele 36 horas após a infecção e permaneceram significativamente elevados (18 vezes maior) quando comparado com os controles não infectados (GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN, 2007). Esses dados são importantes na medida em que é objetivado um aumento de IL-1 $\beta$  para combater esse tipo de infecção parasitária.

Para a expressão do gene da IL-8 no baço, as coletas realizadas 6 horas após a vacinação demonstraram uma diminuição de expressão nos grupos inoculados apenas com a IAG52A. Após 24 horas, os grupos que receberam IAG52A e IAG52A + IL-8, também no baço, tiveram um aumento da expressão que se diferiu do grupo controle PBS mas não do grupo vacinado com o plasmídeo MOCK. Esses resultados, podem indicar que este efeito seja procedente de algum componente do plasmídeo capaz de estimular a expressão do gene.

Nas demais análises para o gene da IL-8 não foram percebidas variações de expressão nos grupos vacinados em relação aos grupos controle. Uma possível explicação do efeito da vacinação na expressão desse gene pode estar relacionada ao fato de que os peixes receberam a IL-8 na musculatura. Estudos indicam que em grande parte das infecções parasitárias, a resposta imune demonstra diferenças significativas de expressão gênica apenas no sítio alvo do parasita e não nos tecidos linfo-hemopoiéticos como é o caso dos órgãos analisados. Para as interleucinas, a resposta imune local é significativamente importante na infecção provocada por diversos parasitas (PÉREZ-CORDÓN et al., 2014). O aumento da IL-8 na vacina gênica seria importante na medida em que essa citocina é quimiotática, sendo capaz de promover o recrutamento de células imunes e aumento de outras citocinas que atuam no processo inflamatório.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que participa na inflamação sistêmica e na regulação das células do sistema imune, produzido principalmente por macrófagos ativados. É possível observar um aumento na expressão desta citocina no baço de peixes que receberam IL-8 após 14 dias pós vacinação. Esse dado pode ser justificado pelo fato de que o TNF- $\alpha$  já se mostrou bioativo em diferentes linhagens celulares tendo um *feedback* positivo que acompanha o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como é o caso da IL-8 (HONG et al., 2013). No rim, as coletas realizadas nas primeiras horas pós segunda dose demonstraram que nenhum dos grupos vacinados diferiu significativamente do grupo controle injetado apenas com PBS. Por outro lado, aos 14 dias, grupos vacinados com IAG52A e IAG52-A+IL-8 tiveram expressão superior ao grupo

controle. As diferenças de expressão entre os órgãos podem ser relacionadas com as populações distintas de células dos mesmos, sendo que no rim anterior há uma menor população de linfócitos quando comparado ao baço (PRESS; EVENSEN, 1999).

Sigh e colaboradores observaram uma regulação positiva de TNF- $\alpha$  em truta arco-íris 6 dias após a infecção com *I. multifiliis* (SIGH; LINDENSTRØM; BUCHMANN, 2004). Em carpas, essa citocina, juntamente com a IL-1 $\beta$ , está relacionada com a indução do óxido nítrico (NO), composto tóxico para parasitas, por meio da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (GONZALEZ; BUCHMANN; NIELSEN, 2007). Dessa forma, o aumento da expressão de TNF- $\alpha$ , como ocorreu em alguns grupos do experimento, é extremamente desejável na vacinação proposta contra o protozoário Ich.

A produção e atividade do IFN $\gamma$  é regulada por diferentes moléculas, que são críticas para os efeitos mediados por esta citocina. Após uma infecção, as células apresentadoras de antígenos (APCs) secretam interleucina-12 (IL-12), IL-18 e IL-1 $\beta$ , que são os principais promotores da síntese de IFN $\gamma$  (PEREIRO; FIGUERAS; NOVOA, 2019). No caso da vacinação, variações na expressão desta citocina como o aumento da expressão do grupo MOCK aos 14 dias em relação ao controle no baço, ou a diminuição dos grupos IAG52A, IL-8 e IAG52-A+IL-8 às 6h no rim, puderam ser estatisticamente notadas. Apesar disso, as variações não tornaram passível uma inferência acerca do mecanismo biológico que pautasse tais resultados. O gene da IFN $\gamma$ , a exemplo de outras análises já realizadas em nosso laboratório, possui expressão muito baixa, com valores de Ct próximos de 35, que dificulta as análises de expressão.

Além disso, na análise de expressão gênica da IFN $\gamma$ , constatou-se uma amplificação inespecífica, ou seja, embora os *primers* para as reações de qPCR tenham sido desenhados em uma região conservada do gene, houve uma ligação indesejável em outra região do cDNA utilizado. Não é descartada a possibilidade de que este achado tenha interferência nas análises de expressão gênica realizadas para a IFN $\gamma$ . Tal fenômeno pode ser constatado pela presença de dois picos na curva de dissociação dos produtos da reação, também denominada curva de *melting*. Estudos adicionais foram realizados para elucidar

melhor o porquê desta ocorrência sendo que os resultados preliminares obtidos indicaram a existência de uma segunda forma da  $IFN\gamma$  contendo um intron em sua caracterização. Este fenômeno é chamado de “splicing incompleto”, sendo pouco observado e ainda não compreendido completamente, sugerido que ocorra quando há alguma falha na remoção dos introns na etapa de processamento do mRNA e que geralmente leva a uma alteração no funcionamento do gene em que isso ocorre.

O não reconhecimento dos transgenes pelo sistema imune inato e adaptativo é um dos principais entraves para o desenvolvimento e produção de vacinas de gênicas. Isso acarreta no desenvolvimento de respostas inflamatórias insuficientes, resultando na não interação dos antígenos com células T e B e na não formação de memória contra o agente infeccioso (HØLVOLD; MYHR; DALMO, 2014). Por isso, atenção especial tem sido dada para à utilização de adjuvantes como componentes de vacinas de DNA, resultados promissores têm sido reportados com o uso da interleucina 8 (IL-8) (JIMENEZ et al., 2006; SIN et al., 2000; WANG et al., 2016a).

A mensuração da migração celular para o sítio de aplicação vacinal é uma ferramenta importante para a determinação da interação entre o antígeno vacinal, o adjuvante utilizado e os sistemas imune inato e adaptativo do hospedeiro (HØLVOLD; MYHR; DALMO, 2014). No presente estudo, após 14 d de experimento, foi possível observar que todas as composições vacinais contendo o gene do IAG52A resultaram em uma maior migração de células para o sítio de aplicação quando comparada aos grupos controle e MOCK, não sendo afetado, portanto, pela adição de IL-8 como adjuvante. Ainda, apesar de a IL-8 ser conhecida por desencadear a quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos para o sítio inflamatório em peixes (CHU et al., 2014; OMAIMA HARUN et al., 2008; WANG et al., 2016b), não foi observada diferença na densidade leucocitária no sítio de aplicação entre do grupo injetado com IL-8 em relação ao grupo controle. Tal resultado indica que a antígeno utilizado na forma de vacina gênica apresenta antigenicidade suficiente para recrutar e, possivelmente, interagir com leucócitos apresentadores de antígenos e linfócitos T e B, independente do adjuvante utilizado.

Em algumas análises, os dados obtidos para os grupos vacinados com os plasmídeos contendo as proteínas de interesse em relação aos grupos vacinados com o plasmídeo sem inserto, não se diferem estatisticamente. Estes dados podem levantar hipóteses de que as respostas imunológicas sejam estimuladas por componentes do próprio plasmídeo. Para elucidar melhor estas questões, podem ser necessárias avaliações das respostas de linfócitos T, como por exemplo a expressão de genes CD8a, CD8b, TCR, MHC-I e MHC-II.

Os parâmetros de respostas imunes adaptativas como testes de detecção e quantificação de anticorpos ou ainda a avaliação da expressão de genes como os de cadeia pesada de IgM também são de extrema relevância para garantir a eficácia vacinal. Uma opção para a mensuração dos níveis de anticorpos gerados é realizar a determinação do perfil de imunoglobulinas IgM pela técnica de ELISA no soro dos peixes imunizados com a vacina gênica. Esta metodologia já é bastante difundida e aplicada em ensaios vacinais e deve ser utilizada futuramente para aumentar a consistência dos dados referentes expressão gênica e migração leucocitária nos peixes vacinados.

Outra possibilidade que pode levantada, considerando que a avaliação da expressão das proteínas é feita de forma indireta através do mRNA, é de que as proteínas vacinais não estivessem sendo efetivamente produzidas. Embora a análise da transcrição do antígeno IAG52A na musculatura dos peixes tenha sido realizada, um estudo adicional deverá envolver a detecção destas proteínas por *Western Blot*. O principal desafio desta proposta envolve a diferenciação das proteínas IL-8 produzidas mediante estímulo vacinal das proteínas endógenas dos peixes.

Para comprovar a eficácia vacinal, é fundamental que o ensaio de infecção experimental seja realizado onde os peixes vacinados sejam expostos ao patógeno. A eficiência só poderá ser predita com ensaios que relacionem o custo-benefício da vacina. A morbidade é avaliada pela presença de sinais clínicos e de trofontes na pele e mucosas. Além disso a taxa de sobrevivência relativa (TSR) também deverá ser avaliada a fim de verificar o efeito protetivo do imunógeno utilizado.

## 9 CONCLUSÃO

Os dados obtidos possuem consistência para demonstrar que a vacina contendo o IAG é capaz de ser transcrita, gerando mRNA na musculatura vacinada e em regiões adjacentes, evidenciando sua capacidade de dispersão e, principalmente, o potencial da preparação vacinal ter de gerar o antígeno proteico do *I. multifiliis* que poderá ativar respostas imunes de proteção nos peixes imunizados. A vacinação com o gene que codifica o antígeno IAG52A de *I. multifiliis* pode estimular a expressão de importantes citocinas pró inflamatórias, como é o caso da IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . O antígeno também foi capaz de estimular, 14 dias após a segunda dose, a migração leucocitária para a região de inoculação vacinal. Os resultados não permitem concluir que o uso da IL-8 como adjuvante molecular foi capaz de potencializar a resposta imune dos animais vacinados.

Os dados obtidos nas análises moleculares e histológicas não descartam a possibilidade de uma resposta imune dos peixes aos componentes do próprio plasmídeo. O lambari (*A. lacustris*) representa um bom modelo experimental para o estudo do sistema imunológico em peixes pela facilidade de manutenção em condições de laboratório. Outros testes contendo diferentes substâncias adjuvantes também podem ser propostos. Mais estudos deverão ser feitos, principalmente relacionando os efeitos da vacina na imunidade adaptativa, para que este tipo de vacina gênica de DNA, que representa uma inovação principalmente no setor aquícola, possa ter sua eficácia garantida e, em um futuro, seu uso difundido.

## 11 REFERÊNCIAS

ADOLFI, Mateus C.; CARREIRA, Ana C. O.; JESUS, Lázaro W. O.; BOGERD, Jan; FUNES, Rejane M.; SCHARTL, Manfred; SOGAYAR, Mari C.; BORELLA, Maria I. Molecular cloning and expression analysis of dmrt1 and sox9 during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *astyanax altiparanae*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1186/1477-7827-13-2.

ALMEIDA, Rodrigo Braz De Castilho. *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação. **Tese de doutorado**, [S. l.], 2007.

BALDISSEROTTO, Bernardo. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil (3ª edição revista, atualizada e ampliada)**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.32379/9786557160008.

BAROUCH, Dan H.; LETVIN, Norman L.; SEDER, Robert A. **The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses**. **Immunological Reviews**, 2004. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00200.x.

BLOM, Nikolaj; GAMMELTOFT, Steen; BRUNAK, Søren. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 294, n. 5, 1999. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3310.

BOBANGA, Iuliana; PETROSIUTE, Agne; HUANG, Alex. Chemokines as Cancer Vaccine Adjuvants. **Vaccines**, [S. l.], 2013. DOI: 10.3390/vaccines1040444.

BÖHLKE, James E.; WEITZMAN, Stanley H.; MENEZES, Naercio A. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazonica**, [S. l.], v. 8, n. 4, 1978. DOI: 10.1590/1809-43921978084657.

BOWERSOCK, Terry L.; MARTIN, Stephen. Vaccine delivery to animals. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 38, n. 2, 1999. DOI: 10.1016/S0169-409X(99)00015-0.

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**, [S. l.], 1990. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1990.tb00799.x.

CAIPANG, Christopher Marlowe A.; HIRONO, Ikuo; AOKI, Takashi. Modulation of the early immune response against viruses by a teleostean interferon regulatory factor-1 (IRF-1). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [S. l.], 2009. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.11.022.

CALCAGNOTTO, Daniela; DE ALMEIDA-TOLEDO, Lurdes F.; BERNARDINO, Geraldo; DE ALMEIDA TOLEDO-FILHO, Silvio. Biochemical genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in Brazil. **Aquaculture**, [S. l.], 1999. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00005-8.

CHU, Chang Qing; LU, Xin Jiang; LI, Chang Hong; CHEN, Jiong. Molecular characterization of a CXCL8-like protein from ayu and its effect on chemotaxis of neutrophils and monocytes/macrophages. **Gene**, [S. l.], v. 548, n. 1, 2014. DOI: 10.1016/j.gene.2014.07.006.

CLARK, Theodore G.; DICKERSON, Harry W.; FINDLY, R. Craig. Immune response of channel catfish to ciliary antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], 1988. DOI: 10.1016/0145-305X(88)90074-2.

CLARK, Theodore G.; GAO, Yan; GAERTIG, Jacek; WANG, Xuting; CHENG, Georgina. The I-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI-anchored proteins. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S. l.], 2001. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2001.tb00322.x.

DE LUCENA, Carlos Alberto S.; SOARES, Helena Gouvea. **Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay.** **Zootaxa**, 2016. DOI: 10.11646/zootaxa.4072.1.5.

DE MORAES FRANÇA FERREIRA, Pollyanna; DA SILVA NASCIMENTO, Lidiane; COELHO DIAS, Devlynn; DA VEIGA MOREIRA, Diogo Magalhães; LÚCIA SALARO, Ana; DUCA DE FREITAS, Mariella Bontempo; SOUZA CARNEIRO, Antonio Policarpo; SAMPAIO ZUANON, Jener Alexandre. Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1111/jwas.12094.

DICKERSON, Harry W. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (phylum Ciliophora). *In: Fish Diseases and Disorders*. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1079/9780851990156.0116.

DINARELLO, Charles A. **Biologic basis for interleukin-1 in disease**. **Blood**, 1996. DOI: 10.1182/blood.v87.6.2095.bloodjournal8762095.

DOS SANTOS, Matheus Pereira; YASUI, George Shigueki; XAVIER, Pedro Luiz Porfírio; DE MACEDO ADAMOV, Nadya Soares; DO NASCIMENTO, Nivaldo Ferreira; FUJIMOTO, Takafumi; SENHORINI, José Augusto; NAKAGHI, Laura Satiko Okada. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1017/S0967199416000101.

EVENSEN, Øystein; LEONG, Jo Ann C. DNA vaccines against viral diseases of farmed fish. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 35, n. 6, 2013. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.10.021.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation**. Rome, Italy. DOI: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. Disponível em: [https://www.fao.org/3/ca9229en/online/ca9229en.html#chapter-1\\_1](https://www.fao.org/3/ca9229en/online/ca9229en.html#chapter-1_1).

FRANKENSTEIN, Ziv; ALON, Uri; COHEN, Irun R. **The immune-body cytokine network defines a social architecture of cell interactions**. **Biology Direct**, 2006. DOI: 10.1186/1745-6150-1-32.

GOMES, C. C.; COSTA, F. G.; BORELLA, M. I. Distribution of GnRH in the

brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000).

**Micron**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1016/j.micron.2013.07.008.

GONZALEZ, Santiago F.; BUCHMANN, Kurt; NIELSEN, Michael E. Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: Inflammatory responses caused by the ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 22, n. 6, 2007. DOI: 10.1016/j.fsi.2006.08.011.

GORISSEN, Marnix; FLIK, Gert. The Endocrinology of the Stress Response in Fish: An Adaptation-Physiological View. *In: Fish Physiology*. [s.l: s.n.]. v. 35. DOI: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00003-5.

GUPTA, R. K.; ROST, B. E.; RELYVELD, E.; SIBER, G. R. **Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. Pharmaceutical biotechnology**, 1995. DOI: 10.1007/978-1-4615-1823-5\_8.

GUPTA, Rajesh K. **Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Advanced Drug Delivery Reviews**, 1998. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00008-8.

HALL, T. A. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [S. l.], v. 41, 1999.

HEPPELL, Joël; DAVIS, Heather L. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 43, n. 1, 2000. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00075-2.

HØLVOLD, Linn B.; MYHR, Anne I.; DALMO, Roy A. Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 45, n. 1, 2014. DOI: 10.1186/1297-9716-45-21.

HONG, Suhee; LI, Ronggai; XU, Qiaoqing; SECOMBES, Chris J.; WANG, Tiehui. Two Types of TNF- $\alpha$  Exist in Teleost Fish: Phylogeny, Expression, and Bioactivity Analysis of Type-II TNF- $\alpha$ 3 in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 191, n. 12, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1301584.

HUISING, Mark O.; STET, René J. M.; SAVELKOUL, Huub F. J.; VERBURG-

VAN KEMENADE, B. M. Lid. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 28, n. 5, 2004. DOI: 10.1016/j.dci.2003.09.005.

JIANGYAN, He; ZHAN, Yin; GUOLIANG, Xu; GONG, Zhiyuan; LAM, Toong Jin; SIN, Yoke Min. Protection of goldfish against *Ichthyophthirius multifiliis* by immunization with a recombinant vaccine. **Aquaculture**, [S. l.], 1997. DOI: 10.1016/S0044-8486(97)00074-4.

JIMENEZ, N.; COLL, J.; SALGUERO, F. J.; TAFALLA, C. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Vaccine**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.061.

KOZAK, M. **Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation**. **Journal of Biological Chemistry**, 1991. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)54860-2.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 33, n. 7, 2016. DOI: 10.1093/MOLBEV/MSW054.

KUTZLER, M. A. et al. Chemokine-adjuvanted electroporated DNA vaccine induces substantial protection from simian immunodeficiency virus vaginal challenge. **Mucosal Immunology**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1038/mi.2015.31.

LETUNIC, Ivica; DOERKS, Tobias; BORK, Peer. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 43, n. D1, 2015. DOI: 10.1093/nar/gku949.

LIN, Yuankai; CHENG, Georgina; WANG, Xuting; CLARK, Theodore G. The use of synthetic genes for the expression of ciliate proteins in heterologous systems. **Gene**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1016/S0378-1119(02)00433-X.

LING, Fei; WANG, Jian Guo; LIU, Qian Fu; LI, Ming; YE, Ling Tong; GONG, Xiao Ning. Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate(VI) treatment. **Veterinary**

**Parasitology**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.11.009.

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**, [S. l.], 1993. DOI: 10.1016/0044-8486(93)90415-U.

LORENZEN, N.; LAPATRA, S. E. **DNA vaccines for aquacultured fish. OIE Revue Scientifique et Technique**, 2005. DOI: 10.20506/rst.24.1.1565.

LORENZEN, N.; LORENZEN, E.; EINER-JENSEN, K.; LAPATRA, S. E. DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *In: FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY 2002, Anais [...].* [s.l.: s.n.] DOI: 10.1006/fsim.2002.0422.

MATTHEWS, R. A. **Ichthyophthirius multifiliis fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. Advances in Parasitology**, 2005. DOI: 10.1016/S0065-308X(05)59003-1.

MCKEE, Amy S.; MARRACK, Philippa. **Old and new adjuvants. Current Opinion in Immunology**, 2017. DOI: 10.1016/j.coi.2017.06.005.

MOREIRA, Gabriel Sassarão Alves. **Identificação e expressão gênica das enzimas arginase 1, arginase 2, e citocinas pró-inflamatórias em Pseudoplatystoma corruscans e Pseudoplatystoma reticulatum, imunizados com Ichthyophthirius multifiliis.** 2007. [S. l.], 2007. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-23112017-145109/pt-br.php>.

NIGRELLI, R. F.; POKORNY, K. S.; RUGGIERI, G. D. Notes on *Ichthyophthirius multifiliis*, a ciliate parasitic on fresh-water fishes, with some remarks on possible physiological races and species. **Transactions of the American Microscopical Society**, [S. l.], 1976. DOI: 10.2307/3225383.

OBA, Eliane Tie; MARIANO, Wagner dos Santos; SANTOS, Laila Romagueira Bichara. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. *In: Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo.* [s.l.: s.n.].

OMAIMA HARUN, Nor; ZOU, Jun; ZHANG, Yang An; NIE, Pin; SECOMBES, Chris J. The biological effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant interleukin-8. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 32, n. 6, 2008. DOI: 10.1016/j.dci.2007.10.005.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: O desafio é crescer**. [s.l: s.n.].

PÁDUA, S. B., MENEZES-FILHO, R. D., DIAS-NETO, J., JERÔNIMO, G. T., ISHIKAWA, M. M., & MARTINS, M. L. Ictiofitiríase: conhecendo a doença para elaborar estratégias de controle. **Panorama da Aquicultura**, [S. l.], v. 22, n. 131, p. 22–31, 2012.

PEIXEBR. Anuário Brasileiro da Piscicultura - Peixe BR 2021. **Peixe BR - Associação Brasileira da Piscicultura**, [S. l.], p. 138, 2021. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario2021/>.

PEIXEBR. Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR 2022. **Peixe BR - Associação Brasileira da Piscicultura**, [S. l.], p. 136, 2022. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>.

PEREIRO, Patricia; FIGUERAS, Antonio; NOVOA, Beatriz. **Insights into teleost interferon-gamma biology: An update. Fish and Shellfish Immunology**, 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.04.002.

PÉREZ-CORDÓN, Gregorio; ESTENSORO, Itziar; BENEDITO-PALOS, Laura; CALDUCH-GINER, Josep Alvar; SITJÀ-BOBADILLA, Ariadna; PÉREZ-SÁNCHEZ, Jaume. Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish-parasite model. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 37, n. 2, 2014. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.01.022.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. **Fish Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 7, n. 1–6, 1989. DOI: 10.1007/BF00004714.

PRESCOTT, David M. **The DNA of ciliated protozoa. Microbiological Reviews**, 1994. DOI: 10.1128/mmbr.58.2.233-267.1994.

- PRESS, C. Mc L.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 9, n. 4, 1999. DOI: 10.1006/fsim.1998.0181.
- RINTAMÄKI-KINNUNEN, Päivi; RAHKONEN, Mika; MANNERMAA-KERÄNEN, Anna Liisa; SUOMALAINEN, Lotta Riina; MYKRÄ, Heikki; VALTONEN, E. Tellervo. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], 2005. DOI: 10.3354/dao064069.
- ROWLAND, Stuart J.; MIFSUD, Charlie; NIXON, Mark; READ, Philip; LANDOS, Matthew. Use of formalin and copper to control ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). **Aquaculture Research**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2008.02061.x.
- SALONIUS, Kira; SIMARD, Nathalie; HARLAND, Richard; ULMER, Jeffrey B. The road to licensure of a DNA vaccine. **Current Opinion in Investigational Drugs**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 635–641, 2007.
- SANCHEZ, E.; COLL, J.; TAFALLA, C. Expression of inducible CC chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) DNA vaccine and interleukin 8. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], 2007. DOI: 10.1016/j.dci.2006.12.008.
- SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
- SECOMBES, C. J.; HARDIE, L. J.; DANIELS, G. Cytokines in fish: An update. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], 1996. DOI: 10.1006/fsim.1996.0030.
- SHAN, Xiao feng; MENG, Qing feng; KANG, Yuan huan; BIAN, Yu; GAO, Yun hang; WANG, Wei li; QIAN, Ai dong. Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). **Veterinary Parasitology**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.10.021.
- SHINN, Andrew P.; PICÓN-CAMACHO, Sara M.; BRON, James E.; CONWAY,

Denny; YOON, Gil Ha; GUO, Fu Ci; TAYLOR, Nicholas G. H. The anti-protozoal activity of bronopol on the key life-stages of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora). **Veterinary Parasitology**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.11.025.

SIGH, J.; LINDENSTRØM, T.; BUCHMANN, K. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], 2004. DOI: 10.1016/j.fsi.2003.12.005.

SIN, Jeong-Im; KIM, Jong J.; PACHUK, Catherine; SATISHCHANDRAN, C.; WEINER, David B. DNA Vaccines Encoding Interleukin-8 and RANTES Enhance Antigen-Specific Th1-Type CD4 + T-Cell-Mediated Protective Immunity against Herpes Simplex Virus Type 2 In Vivo . **Journal of Virology**, [S. l.], v. 74, n. 23, 2000. DOI: 10.1128/jvi.74.23.11173-11180.2000.

SNIESZKO, S. F. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. **Journal of Fish Biology**, [S. l.], v. 6, n. 2, 1974. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x.

STRAUS, David L.; GRIFFIN, Billy R. Efficacy of potassium permanganate in treating ichthyophthiriasis in channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1577/1548-8667(2002)014<0145:EOPFIT>2.0.CO;2.

TAFALLA, Carolina; BØGWALD, Jarl; DALMO, Roy A. **Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives**. **Fish and Shellfish Immunology**, 2013. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.02.029.

THOMPSON, Julie D.; HIGGINS, Desmond G.; GIBSON, Toby J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 22, n. 22, 1994. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673.

TORT, Lluís. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and**

**Comparative Immunology**, [S. l.], v. 35, n. 12, 2011. DOI: 10.1016/j.dci.2011.07.002.

ULMER, Jeffrey B. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, [S. l.], v. 259, n. 5102, 1993. DOI: 10.1126/science.8456302.

VALENTI, Wagner C.; BARROS, Helenice P.; MORAES-VALENTI, Patricia; BUENO, Guilherme W.; CAVALLI, Ronaldo O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, [S. l.], v. 19, 2021. DOI: 10.1016/j.aqrep.2021.100611.

VICENTE, Igor S. T.; ELIAS, Fabiana; FONSECA-ALVES, Carlos. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 37, n. 4, 2014.

VON GERSDORFF JØRGENSEN, Louise. Infection and immunity against Ichthyophthirius multifiliis in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.08.042.

VON GERSDORFF JØRGENSEN, Louise; SIGH, Jens; KANIA, Per Walter; HOLTEN-ANDERSEN, Lars; BUCHMANN, Kurt; CLARK, Theodore; RASMUSSEN, Jesper Skou; EINER-JENSEN, Katja; LORENZEN, Niels. Approaches towards DNA Vaccination against a Skin Ciliate Parasite in Fish. **PLoS ONE**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0048129.

WANG, Erlong et al. Molecular cloning, expression and the adjuvant effects of interleukin-8 of channel catfish (*Ictalurus Punctatus*) against *Streptococcus iniae*. **Scientific Reports**, [S. l.], 2016. a. DOI: 10.1038/srep29310.

WANG, Erlong et al. Interleukin-8 holds promise to serve as a molecular adjuvant in DNA vaccination model against *Streptococcus iniae* infection in fish. **Oncotarget**, [S. l.], 2016. b. DOI: 10.18632/oncotarget.13728.

WANG, Xuting; DICKERSON, Harry W. Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1128/CDLI.9.1.176-181.2002.

WEN, Ji Hong; WANG, Yan Li; LIU, Yu Hua; ZHANG, Ji Yuan; LI, Ze Hong. Activity of two extracts of *Cynanchum paniculatum* against *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomonts. **Parasitology**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1017/S003118201600144X.

WOHLLEBE, S.; RICHTER, P.; HÄDER, D. P. Chlorophyllin for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). **Parasitology Research**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1007/s00436-012-2893-y.

XIE, Xinmei; WANG, Lin; YANG, Wenliang; YU, Ruishuang; LI, Qingli; PANG, Xiaobin. Co-administration of antigen with chemokine MCP-3 or MDC/CCL22 enhances DNA vaccine potency. **Investigational New Drugs**, [S. l.], v. 33, n. 4, 2015. DOI: 10.1007/s10637-015-0250-6.

XU, De Hai; KLESIUS, Phillip H. Comparison of serum antibody responses and host protection against parasite *Ichthyophthirius multifiliis* between channel catfish and channel × blue hybrid catfish. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.01.022.

XU, De Hai; SHOEMAKER, Craig A.; KLESIUS, Phillip H. Effect of tricaine methanesulfonate on survival and reproduction of the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology Research**, [S. l.], 2008. DOI: 10.1007/s00436-008-1044-y.

XU, De Hai; SHOEMAKER, Craig A.; KLESIUS, Phillip H. *Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02518.x.

XU, De Hai; ZHANG, Qi Zhong; SHOEMAKER, Craig A.; ZHANG, Dunhua; MOREIRA, Gabriel S. A. Molecular immune response of channel catfish immunized with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.03.166.

YAO, Jia Yun; SHEN, Jin Yu; LI, Xi Lian; XU, Yang; HAO, Gui Jie; PAN, Xiao Yi; WANG, Gao Xue; YIN, Wen Lin. Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Parasitology Research**, [S. l.], 2010. DOI:

10.1007/s00436-010-1966-z.

YAO, Jia Yun; YUAN, Xue Mei; XU, Yang; YIN, Wen Lin; LIN, Ling Yun; PAN, Xiao Yi; YANG, Gui Lian; WANG, Chun Feng; SHEN, Jin Yu. Live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing immobilization antigen (i-Ag) for protection against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.09.037.

YAO, Jia yun; ZHOU, Zhi ming; LI, Xi lian; YIN, Wen lin; RU, Hong shun; PAN, Xiao yi; HAO, Gui jie; XU, Yang; SHEN, Jin yu. Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*). **Veterinary Parasitology**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.07.021.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: An approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1017/S1751731114002511.

YE, Jian; COULOURIS, George; ZARETSKAYA, Irena; CUTCUTACHE, Ioana; ROZEN, Steve; MADDEN, Thomas L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, [S. l.], v. 13, 2012. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.