

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**EFICÁCIA DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ANTÍGENOS E  
ADJUVANTES NA INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM  
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Tatiana Rohde Pavan**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2014**

**EFICÁCIA DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ANTÍGENOS E ADJUVANTES NA  
INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

**Tatiana Rohde Pavan**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

**Orientador: Prof. Luiz Carlos Kreutz**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2014**

---

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

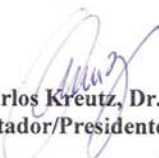
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**Eficácia de diferentes combinações de antígenos e adjuvantes na indução da resposta imune humoral em jundiás (*Rhamdia quelen*).**

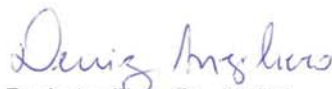
Elaborada por  
**Tatiana Rohde Pavan**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestra em Bioexperimentação**

**Comissão Examinadora**

  
**Luiz Carlos Kreutz, Dr., UPF  
(Orientador/Presidente)**

  
**Rafael Frandóloso, Dr., UPF**

  
**Deniz Anziliero, Dr., UFSM**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2014**

CIP – Catalogação na Publicação

---

P337ePavan, Tatiana Rohde

Eficácia de diferentes combinações de antígenos e adjuvantes na indução da resposta imune humoral em Jundiás (*Rhamdia quelen*)/ Tatiana Rohde Pavan. – 2014.

60 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof. Luiz Carlos Kreutz.

Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Universidade de Passo Fundo, 2014.

1.Jundiá (Peixe). 2.Reações antígeno-anticorpo. 3. Pesquisa. I.Kreutz, Luiz Carlos, orientador. II.Título.

CDU: 597(81)

---

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2112

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e colaboração de inúmeras pessoas. Durante esses dois anos, tenho apenas motivos para agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram como um incentivo, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. Serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização de conclusão deste importante trabalho.

Em primeiro lugar, e mais importante de tudo, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz por ter acreditado no meu potencial, de uma forma que nem eu imaginava ser capaz de corresponder. Sempre disponível, e disposto a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado, para absorver todo e qualquer conhecimento possível. Prof. Kreutz não foi apenas um orientador, mas um conselheiro, e amigo. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por sempre ter sido essa referência profissional para o meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Rafael Frandoloso que com ensinamentos e amizade me ajudou ativamente ou passivamente neste trabalho. Você também é referência para mim.

Aos estagiários Cristian O. Nied e Márcia Bortoluzzi, sem suas intermináveis horas de trabalho no laboratório, esse trabalho não seria possível. Obrigada por terem abdicado das horas de folga para estarem me ajudando com os experimentos.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia HV-UPF, pela disponibilidade, simpatia e gentileza.

Aos colegas e amigos de mestrado, pelos momentos divididos juntos, especialmente à Lilian Andriva e Monique Lorenson, que se tornaram verdadeiras amigas e tornaram mais leve o meu trabalho. Aos poucos nos tornamos amigas, obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias. Foi bom poder contar com vocês.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, pelos ensinamentos, incentivos e dedicação.

Ao pessoal do setor de Piscicultura do CEPAGRO-UPF, pela inestimável colaboração.

Ao pessoal do Biotério pela colaboração e ajuda com os animais.

A realização desse trabalho somente foi possível com o apoio financeiro do CNPq e pela concessão de bolsa da CAPES.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho ao meu orientador, minha família e meu noivo, pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

**EPÍGRAFE**

A ciência sem a religião é manca, a religião sem a ciência é cega!

*Albert Einstein*

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
<b>3. CAPÍTULO 1. Inactivated <i>Parapoxvirus ovis</i> as inductor of immunity in silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>)</b> .....	24
Abstract.....	25
1 Introduction.....	26
2. Material and methods.....	27
3. Results and discussion .....	29
Acknowledgements.....	32
References.....	33
<b>4. CAPÍTULO 2. Eficácia de diferentes adjuvantes na indução de resposta imune humoral em jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>)</b> .....	40
1. Resumo.....	41
2. Introdução.....	42
3. Material e métodos.....	44
4. Resultados e discussão.....	47
Agradecimentos.....	50
Referências.....	51
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	60
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	61



## LISTA DE FIGURAS

### 3. CAPÍTULO 1

- FIGURE 1. Respiratory burst activity measured on blood cells collected from silver catfish 24 h after inoculation with PBS or PPVO. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. (n = 15) and were compared using t-test. There were no significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups..... 37
- FIGURE 2. Antibody production in silver catfish. Fish were inoculated with phosphate buffered saline (PBS; group I), PPVO (group II), BSA (group III), BSA + PPVO (group IV) or BSA + FIA (group V). Serum samples were collected 35 days p.i. and antibody titers measured by ELISA. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. (n = 15) and were compared using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. Significant differences ( $p < 0.05$ ) amongst groups are indicated by asterisk..... 39

### 4. CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 Resposta imune de jundiás inoculados com bacterina de *Aeromonas hydrophila*. O soro de jundiás foi coletado anteriormente à inoculação e 42 dias pós-inoculação (p.i.) e testado para a presença de anticorpos aglutinantes anti-*A. hydrophila*. Todos os peixes foram inoculados com bacterina de *Aeromonas hydrophila* associada com PBS ou diferentes adjuvantes: grupo 1: *A. hyd* + PBS; grupo 2 *A. hyd* + Hidróxido de alumínio; grupo 3: *A. hyd* + montanide; grupo 4: *A. hyd* + adjuvante incompleto de Freund; grupo 5: *A. hyd* + CpG A/B; grupo 6, *A. hyd* + CpG C; grupo 7, *A. hyd* + CpG 1668; grupo 8, *A. hyd* + CpG B; grupo 9, *A. hyd* + CpG 2133; grupo 10, *A. hyd* + CpG 2102 e grupo 11, *A. hyd* + Cpg 2143. O título de anticorpos está representado pelo logaritmo da última diluição do soro em que ocorreu aglutinação, e representa a média  $\pm$ SEM (n=15). Alterações significativas ( $p < 0.05$ ) nos títulos de anticorpos estão demonstrados apenas para amostras coletas 42 dias p.i. O grupo controle diferiu significativamente dos demais grupos e está indicado por letras minúsculas. O grupo 7 diferiu significativamente (\*) dos grupos 9, 10 e 11..... 55

- FIGURA 2 Resposta imune de jundiás inoculados com albumina sérica bovina (BSA) e adjuvantes tradicionais. Amostras de soro foram coletas anteriormente à inoculação e nos dias 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.) e testados para a presença de anticorpos anti-BSA por ELISA. Todos os peixes foram inoculados com BSA (200 µg) associada com PBS ou diferentes adjuvantes, conforme indicado na legenda da figura. Os resultados estão representados pela média ±SEM. As diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os diferentes dias da coleta, no mesmo grupo, estão representadas por letras minúsculas, e as diferenças significativas entre grupos no mesmo dia da coleta estão representadas por letras maiúsculas..... 56
- FIGURA 3 Resposta imune de jundiás inoculados com albumina sérica bovina (BSA) e oligodeoxinucleotídeos CpG. Amostras de soro foram coletas anteriormente à inoculação e nos dias 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.) e testados para a presença de anticorpos anti-BSA por ELISA. Todos os peixes foram inoculados com BSA (200 µg) associada com PBS ou diferentes oligodeoxinucleotídeos CpG, conforme indicado na legenda da figura. Os resultados estão representados pela média ±SEM. As diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os diferentes dias da coleta, no mesmo grupo, estão representadas por letras minúsculas, e as diferenças significativas entre grupos no mesmo dia da coleta estão representadas por letras maiúsculas..... 57

**LISTA DE TABELAS****3. CAPÍTULO 1**

- TABLE 1. Hematological parameters of silver catfish inoculated with phosphate buffered saline (PBS) or inactivated *Parapoxvirus ovis* (iPPVO). Blood samples were collected from all inoculated fish (n = 15) at the indicated time. Data represent the mean  $\pm$ S.E.M. Differences between the PBS and iPPVO group at 3 days post inoculation are indicated by small letters and differences ( $p < 0.05$ ) within the iPPVO group at each time point are indicated by capital letters..... 38

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
Cm	Centímetros
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
iPPVO	<i>Parapoxvírus ovis</i> inativado
Kg	Kilograma
MG	Miligramas
ODN	Oligodeoxinucleotídeos
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PBS	Solução Salina Fosfatada
p.i.	Pós-Inoculação
PPVO	<i>Parapoxvírus ovis</i>
RRP	Receptor de Reconhecimento Padrão
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFP	Unidades Formadoras de Placas
UPF	Universidade de Passo Fundo
μl	Microlitro

## RESUMO

**Dissertação de Mestrado**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação**  
**Universidade de Passo Fundo**

### **EFICÁCIA DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ANTÍGENOS E ADJUVANTES NA INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

Autor: Tatiana Rohde Pavan

Orientador: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 04 de Agosto de 2014

O presente trabalho descreve a utilização de diferentes combinações de antígenos e adjuvantes na modulação do sistema imune natural e específico de jundiás (*Rhamdia quelen*). No *capítulo 1* investigou-se o uso do *Parapoxvirus ovis* inativado (iPPVO) como modulador do sistema imune inato e na indução de anticorpos anti-albumina sérica bovina (BSA). Juvenis de jundiás (60 - 80 g) inoculados com iPPVO ( $1 \times 10^6$  unidades formadoras de placas - UFP) não apresentaram alterações significativas na explosão respiratória 24 h após a inoculação quando comparados com jundiás inoculados com solução salina fosfatada (PBS) estéril. No entanto, observaram-se alterações significativas ( $p < 0.05$ ) na população de monócitos, heterófilos e trombócitos aos 3, 5 e 7 dias pós-inoculação (p.i.), respectivamente. Além disso, o uso do iPPVO como adjuvante da BSA (200  $\mu\text{g}$ /peixe) induziu títulos de anticorpos significativamente maiores daqueles observados em jundiás imunizados somente com BSA, indicando um efeito adjuvante na indução de anticorpos específicos. O *capítulo 2* relata o uso de diferentes combinações de adjuvantes tradicionais (hidróxido de alumínio, adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund e Montanide) e adjuvantes de nova geração, constituído por oligodeoxinucleotídeos CpG (ODN CpGs) associados à bacterina de *Aeromonas hydrophila*, ou BSA, na indução de anticorpos específicos. Nesses experimentos, juvenis de jundiás (60 - 80 g) foram inoculados uma única vez com 0,2 ml de cada combinação de antígeno (*A. hydrophila* =  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias - UFC; BSA 200  $\mu\text{g}$ ) e a presença de anticorpos específicos foi determinada aos 42 dias p.i. para o grupo inoculado com *A. hydrophila*, e aos 14, 28 e 42 dias p.i. para o grupo inoculado com BSA. Grupos controles constituíram-se de peixes inoculados com os respectivos antígenos PBS estéril. Todos os peixes imunizados soroconverteram à inoculação com *A. hydrophila*, no entanto houve uma diferença significativa entre o grupo controle (*A. hydrophila*+PBS) e os demais grupos inoculados. E, entre os grupos inoculados com *A.*

*hydrophila* e diferentes combinações de adjuvantes, houve uma diferença significativamente menor ( $p < 0.05$ ) no título de anticorpos do grupo de peixes inoculado com *A. hydrophila* + ODN CpG 1688 em relação aos grupos inoculados com *A. hydrophila* + ODN CpG 2133, CpG 2102 e CpG 2143. Nos peixes inoculados com as diferentes combinações de adjuvantes e BSA, todos os peixes soroconverteram, e houve diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) nos títulos de anticorpos detectados aos 14, 28 e 42 dias p.i. Essas diferenças foram observadas tanto em relação aos peixes do mesmo grupo em diferentes dias p.i., como entre diferentes grupos de peixes quando comparados no mesmo dia p.i. De forma geral, os maiores títulos de anticorpos foram observados aos 28 dias p.i. E, entre os adjuvantes clássicos, os títulos significativamente maiores de anticorpos anti-BSA foram observados com o uso do adjuvante completo de Freund. E, entre os adjuvantes ODN CpGs, os maiores títulos de anticorpos anti-BSA foram observados com o uso do ODN CpG 1668. Os estudos descritos no presente trabalho indicam que o iPPVO pode ser explorado como imunomodulador em peixes e que adjuvantes ODN CpGs induziram anticorpos específicos anti-BSA em jundiás em níveis similares ou superiores aos adjuvantes clássicos.

**Palavras-chave:** jundiá, *Parapoxvirus ovis*, adjuvantes, oligodeoxinucleotídeos, anticorpos.

## ABSTRACT

**Master's Dissertation**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação**  
**Universidade de Passo Fundo**

### **EFFICACY OF DIFFERENT COMBINATIONS OF ANTIGENS AND ADJUVANTS ON THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*)**

Author: Tatiana Rohde Pavan

Advisor: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 04 de Agosto de 2014

In this work we evaluated the immune response of silver catfish (*Rhamdia quelen*) following the inoculation of different combinations of antigens and adjuvants. In *chapter 1* we investigated the potential of inactivated *Parapoxvirus ovis* (iPPVO) as immunomodulator of the innate immune response and production of antibodies to bovine serum albumin (BSA). The respiratory burst of silver catfish juvenile (60 – 80 g) inoculated with iPPVO ( $1 \times 10^6$  plaque forming units – PFU) was similar, at 24 h post-inoculation (p.i.), to the control fish inoculated with sterile phosphate buffered saline (PBS) solution. However, significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed on circulating monocytes, heterophils and thrombocytes at 3, 5 and 7 days p.i., respectively in iPPVO inoculated silver catfish. Furthermore, silver catfish inoculated with iPPVO+BSA (200  $\mu\text{g}/\text{fish}$ ) had significantly ( $p < 0.05$ ) higher antibody titers to BSA compared to fish inoculated with BSA+PBS, indicating its adjuvanticity effect on antibody production. In chapter 2 we report the use of different combinations of traditional adjuvants (aluminum hydroxide, Freund complete adjuvant, Freund incomplete adjuvant, and montanide), and new generation adjuvants, composed of oligodeoxynucleotides CpG (ODN CpGs) associated with *Aeromonas hydrophila* bacterin, or BSA, on the production of specific antibodies. In these experiments, juvenile catfish (60 – 80 g) were inoculated once with 0,2 ml of each antigen (*A. hydrophila*,  $1 \times 10^8$  colony forming unit – CFU, or BSA 200  $\mu\text{g}$ ) and the production of antibodies was determined at 42 days p.i. in the groups inoculated with *A. hydrophila*, and at 14, 28 and 42 days p.i. for the groups inoculated with BSA. Control groups consisted of fish inoculated with the antigens and sterile PBS. All immunized fish seroconverted to *A. hydrophila*; however, there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the control group and the remaining inoculated groups. And, amongst the *A. hydrophila* inoculated groups there was a significantly lower ( $p < 0.05$ ) antibody titer in the group of fish inoculated with *A. hydrophila* + ODN CpG 1668 compared to the groups inoculated

with *A. hydrophila* + CpG 2133, CpG 2102 and CpG 2143. Fish inoculated with BSA combined with different adjuvants, all fish seroconverted and there were significant differences ( $p < 0.05$ ) in the antibody titers at 14, 28 and 42 days p.i. The difference in antibody titers were observed either in fish within the same group at different days p.i., or when compared within different groups in the same day p.i. In general, higher antibody titers to BSA were observed at 28 days p.i. Within the classical adjuvants, the higher anti-BSA antibody titers were observed in fish inoculated with a combination of BSA+Freund complete adjuvant. And, within the ODN CpGs adjuvants, higher anti-BSA antibody titers were observed in fish inoculated with BSA+CpG 1668. The studies reported herein indicate that iPPVO might be exploited as immunomodulator in fish and that ODN CpGs adjuvants stimulated the production of specific antibodies in silver catfish at titers similar or even higher than those stimulated by classical adjuvants.

**Key words:** silver catfish, *Parapoxvirus ovis*, adjuvants, oligodeoxynucleotides, antibodies.



## 1. INTRODUÇÃO

O ambiente aquático, onde uma ou mais espécies de peixes são cultivadas em alta densidade, oferece condições ideais para que microorganismos patogênicos se disseminem facilmente entre indivíduos (1). A contenção e eliminação da maioria dos microorganismos patogênicos dependem de uma resposta imune eficaz e robusta (2). Por outro lado, a presença da imunidade específica previamente ao contato com o microorganismo limita a colonização do hospedeiro e previne a ocorrência da doença causada pelo microorganismo (3). Nesse contexto, a possibilidade de se induzir imunidade específica, por meio de vacinas, antes do contato com microorganismos patogênicos, se constitui na principal ferramenta de prevenção de doenças e de fundamental importância para o salto qualitativo e quantitativo na produção de peixes cultivados (4).

A eficácia das vacinas utilizadas, no entanto, depende em grande parte da via de inoculação, da natureza química do antígeno e da constituição do adjuvante associado ao antígeno vacinal (5). Vacinas administradas pela via oral ou de imersão, embora de fácil aplicação, induzem uma resposta imune geralmente ineficaz. Por outro lado, vacinas administradas pela via intraperitoneal, embora necessitem aplicação individual, induzem resposta imune satisfatória e de boa duração (6). Vacinas inoculadas intraperitonealmente são constituídas por antígenos inativados misturados a adjuvantes, os quais têm por finalidade melhorar a resposta imune ao antígeno (7). A mistura de antígenos e adjuvantes, no entanto, não está livre de efeitos adversos, como aderências entre órgãos e o peritônio, ou a formação de lesões que atingem órgãos importantes como fígado e ovários, e compromete o bem estar e a produtividade, e depreciam o produto final (8). O desenvolvimento de vacinas mais eficazes (antígenos purificados, vacinas recombinantes, vacinas de DNA) e a busca por novos adjuvantes que interagem com os receptores das células apresentadoras de antígenos e direcionam a resposta imune pela estimulação de subpopulações de linfócitos constituem-se, portanto, no foco principal das investigações (9). A durabilidade da resposta imune inicial (primária) e a necessidade de revacinações para estimular possíveis subpopulações de células de memória e gerar uma resposta imune secundária são ainda investigadas e motivo de intenso debate (10). Essas questões assumem importância ainda maior no momento em que a vacinação de peixes se incorpora ao manejo sanitário de peixes cultivados no Brasil. Para manter nossa competitividade e

independência no cenário científico e tecnológico internacional principalmente no que se refere ao conhecimento que temos, e que somos capazes de produzir, a respeito da nossa própria diversidade biológica, é necessário entender o sistema imunológico de espécies nativas cultivadas e suas especificidades, e a patogenia dos microorganismos patogênicos dessas populações, para que possamos desenvolver vacinas e estratégias de vacinações eficazes e coerentes para nossas espécies e nosso ambiente, que difere muito daquele dos principais países produtores de pescado.

O desenvolvimento sustentável da aquicultura depende da compreensão do sistema imune dos peixes, assim como a rápida identificação dos patógenos envolvidos (11). A diversidade de aplicação dos anticorpos policlonais fornece uma resposta eficaz para ambos os aspectos mencionados, isto é, o estudo da imunologia dos peixes e a identificação de patógenos. Os adjuvantes funcionam como intensificadores do sistema imunológico, são utilizados em vacinas para aumentar a resposta imune à vacina (12). Entre os adjuvantes que estão sendo utilizados em vacinas para peixes, estão os oleosos e os baseados em alumínio (7,13). Efeitos adversos advindos da associação entre antígenos complexos (bacterinas/extratos bacterianos) e adjuvantes, principalmente adjuvantes oleosos, constituem um importante problemas na vacinação de peixes (9). A utilização de adjuvantes oleosos para inoculação intraperitoneal em peixes resulta em aderências e lesões no fígado e ovários, o que pode comprometer a reprodução dos peixes e afetar o metabolismo a produção de subprodutos como óleo de fígado, e depreciar a carcaça. Dessa forma, adjuvantes sintéticos, não oleosos, se constituem na melhor opção de investigação (14). A função desses adjuvantes sintéticos é aperfeiçoar a relação do antígeno com as células do sistema imunológico e induzir uma resposta imune que melhor combata o antígeno agressor (15).

Nesse trabalho, o principal objetivo foi estudar a eficácia de diferentes combinações de antígenos (particulado e solúveis) e adjuvantes na indução de anticorpos específicos em jundiá (*Rhamdia quelen*). Os resultados obtidos com esses experimentos estão descritos em dois capítulos. O primeiro capítulo trata da utilização do *Parapoxvirus ovis* inativado (iPPVO) na indução de resposta imune natural e específica em jundiás, e se constitui em um artigo científico intitulado “**Inactivated *Parapoxvirus ovis* as inductor of immunity in silver catfish (*Rhamdia quelen*)**” submetido para publicação no periódico *Fish and ShellFish Immunology*. O segundo capítulo versa sobre a utilização de adjuvantes clássicos e CpGs associados à um antígeno particulado (bacterina de *Aeromonas hydrophila*) ou solúvel (albumina sérica bovina – BSA) em

jundiás, e a subsequente determinação da cinética da resposta imune humoral. Esse capítulo, também na forma de artigo científico, será submetido á um periódico específico.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Na piscicultura, pela facilidade com que micro-organismos se disseminam na água, o contato de peixes com micro-organismos patogênicos presentes na água é um evento inevitável. No processo evolutivo, os peixes constituem o primeiro grupo de animais com um sistema imunológico básico, mas considerado primitivo quando comparado aos mamíferos, principalmente devido à relativa ineficiência do sistema imune adaptativo nos peixes (16). Nesse contexto, o estudo sobre espécies nativas, como *Rhamdia quelen*, o jundiá, é de fundamental importância para o desenvolvimento de vacinas e estratégias de vacinação que contribuam de forma significativa para a sanidade e produtividade do pescado, além de servir de referência para estudos similares em outras espécies de peixes. O jundiá é encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México (17) e seu cultivo está aumentando no sul do Brasil. O jundiá pode atingir 50cm de comprimento e 3kg de peso. O jundiá pode ser diferenciado das outras espécies de *Rhamdia* através das seguintes características: espinho na nadadeira peitoral serrilhado em ambos os lados; nadadeira caudal com lóbulos desiguais, olhos de tamanho médio, com ou sem padrão de manchas. O peixe em estudo vive em lagos e poços profundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se em pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, para procurar alimento (17). Durante o experimento com alevinos em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e busca de locais escuros. O estudo sobre a resposta imune específica, imunoglobulinas, adjuvantes e memória imunológica, preenche uma importante lacuna existente no conhecimento da imunologia de uma espécie de peixe nativo.

O uso de imunoestimulantes em peixes confere defesa inata e resistência ao ataque de patógenos durante períodos de estresse. Pouco se conhece sobre o comportamento fisiológico do jundiá frente à utilização de imunoestimulantes. Os imunoestimulantes usados rotineiramente são componentes que ativam os mecanismos de reconhecimento padrão do sistema imune inato. Seu modo de ação e aplicação tem sido descrito, bem como a melhora dos parâmetros do sistema imune inato e adquirido e efeitos positivos na sobrevivência e resistência à doenças (18). Estudos prévios demonstraram o efeito promissor do *Parapoxvirus ovis* inativado (iPPVO) como imunoestimulante em diversas espécies (19), dessa maneira a eficácia do *Parapoxvirus ovis* (PPVO) como indutor de imunidade em peixes deve ser avaliada. Além da complexa interação do

sistema imune durante a infecção, o PPVO inativado tem sido associado ao estímulo do sistema imune natural. O primeiro uso do PPVO inativado foi em camundongos desafiados com *Pseudomonas aeruginosa*, onde se verificou a redução da taxa de mortalidade (20). Após isso, realizaram-se diversos estudos para verificar os efeitos imunoestimulatórios do PPVO em diferentes condições patológicas (21). O efeito do PPVO como imunoestimulante foi demonstrado em diversas infecções e condições estressantes em muitas espécies animais (19).

Em relação ao sistema imune específico existem algumas similaridades com mamífero, principalmente no que se refere à indução da resposta imune específica. No entanto, a dinâmica da resposta imune específica, os tipos de imunoglobulinas e a presença de resposta imune de memória são alguns tópicos que ainda estão em debate (5) (22). Indiscutível, no entanto, é a importância da resposta imune e a presença de anticorpos específicos na defesa contra microorganismos patogênicos. Até o surgimento das primeiras vacinas, doenças bacterianas de peixes eram controladas pelo uso de antibióticos na água e o cultivo de peixes em cativeiro era limitado. Com o advento e disseminação no uso de vacinas, esse cenário sofreu uma profunda modificação: a utilização de antibióticos e demais produtos quimioterápicos foi reduzida significativamente na mesma proporção em que a produção de peixes aumentou (6,23). Além da importância das vacinas em peixes, o sistema imune natural tem importância fundamental no combate a infecções nessa espécie.

Para espécies de peixes para as quais não existem vacinas disponíveis, o desenvolvimento de vacinas restringe-se ao pouco conhecimento que se tem, tanto do sistema imunológico dessas espécies, quanto sobre o micro-organismo e sua patogenia, e tem obedecido à estratégia “tentativa e erro” e, provavelmente, continuará assim em curto prazo (5). Essa estratégia é conveniente, pois peixes podem ser cultivados e inoculados em grande número, em experimentos relativamente simples e baratos, onde a proteção vacinal é avaliada pelo número de mortos e sobreviventes após o desafio. A vacina disponível no mercado nacional é a AQUAVAC®STREP, indicada para imunização ativa de tilápias (*Oreochromis niloticus*) para reduzir a mortalidade e a doença decorrente da estreptococose causada por *Streptococcus agalactiae*. Nesse cenário, o desenvolvimento de novas vacinas produzidas com antígenos de subunidades purificados, vacinas recombinantes e vacinas de DNA, estão entre as principais metas dos pesquisadores. Em contraste, a utilização de vacinas vivas atenuadas na piscicultura ainda é limitada. Micro-organismos, mesmo quando atenuados, se multiplicam no hospedeiro e

induzem uma resposta imune similar àquela induzida pelo micro-organismo patogênico. Porém, uma das principais preocupações em relação a esse tipo de vacina está relacionada à sua segurança e possibilidade de reversão à virulência. E, no meio aquático, conforme exposto acima, a disseminação do micro-organismo atinge proporções que inviabilizam sua ampla utilização como agente vacinal.

A imunização de peixes normalmente necessita de quantidades de antígenos maior do que aquela usada em mamíferos (23); conseqüentemente, vacinas inativadas, efetivas e baratas têm sido difíceis de produzir. Antígenos inativados não se multiplicam no animal hospedeiro e necessitam, portanto, de substâncias adjuvantes para maximizar a interação com as células apresentadoras de antígenos, as quais, por sua vez, apresentam antígenos aos linfócitos B para produção de anticorpos. Nesse aspecto, a busca por adjuvantes capazes de induzir uma boa resposta imune humoral e celular, contra antígenos solúveis e particulados, tem aumentado significativamente (14). Efeitos adversos advindos da associação entre antígenos complexos (bacterinas/extratos bacterianos) e adjuvantes, principalmente adjuvantes oleosos, constituem um importante problema na vacinação de peixes. A utilização de adjuvantes oleosos para inoculação intraperitoneal em peixes resulta em aderências e lesões no fígado e ovários, o que pode comprometer a reprodução dos peixes e afetar o metabolismo a produção de subprodutos como óleo de fígado, e depreciar a carcaça (7). Dessa forma, adjuvantes sintéticos, não oleosos, se constituem na melhor opção de investigação. A função desses adjuvantes é aperfeiçoar a relação do antígeno com as células do sistema imunológico e induzir uma resposta imune que melhor combata o antígeno agressor.

Os recentes avanços na caracterização de patógenos e células imunológicas permitiram mapear as moléculas, tanto dos micro-organismos como das células, responsáveis pelo reconhecimento e estimulação. Micro-organismos possuem moléculas específicas que os diferenciam de outras células. Essas moléculas constituem, de forma geral, o que se conhece por Padrão Molecular Associado aos Patógenos (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern* – PAMP). Os PAMPs se constituem em estruturas exclusivas das diferentes classes de micro-organismos, altamente conservadas e essenciais para a integridade, sobrevivência e patogenicidade do micro-organismo (24). As células imunológicas possuem Receptores de Reconhecimento Padrão (PRP) que interagem de forma específica com os PAMPs, tornando assim possível o reconhecimento de micro-organismos. A interação entre PAMPs e PRP se

constitui no primeiro e mais importante aspecto da resposta imune, pois a partir dessa interação outras células serão ativadas. Assim, antígenos inoculados são capturados por células apresentadoras de antígenos e transportados até os órgãos linfóides secundários onde ocorrerá a resposta imune específica pela estimulação dos linfócitos B e T (25). Conhecendo-se a interação entre antígenos (PAMPs) e células imunológicas, é possível delinear e estimular a resposta imune específica pelo uso de adjuvantes que interagem com os PRPs e maximizam a resposta específica ao antígeno associado. Entre os PRPs identificados encontra-se o *Toll-Like Receptor 9* (TLR-9), uma molécula que em células de mamíferos encontra-se presente predominantemente em células dendríticas e linfócitos B (22), ambas imprescindíveis para a resposta imune humoral (produção de anticorpos). O TLR-9 reconhece os dinucleotídeos não metilados-citosina-fosfato-guanina (CpG), considerados PAMPs pois em vertebrados esse dinucleotídeo é metilado e encontra-se suprimido, enquanto que em bactérias essa sequência é prevalente, não metilada e flanqueada por sequência diferentes daquelas dos vertebrados (14).

A interação entre TLR e CpG induz uma sinalização intracelular importante para ativação das células dendríticas e linfócitos B (26), além disso, estudos recentes demonstraram que oligodeoxinucleotídeos (ODN) sintéticos contendo a sequência CpG (CpG ODN) mimetizam dinucleotídeos CpG bacterianos e induzem diversos efeitos imunológicos (14). O estudo dos efeitos adjuvantes de sequências contendo CpG ODN em peixes é incipiente. Em trutas arco-íris (27), salmão atlântico (28,29), rodovalho (30) e linguado japonês (15), a inoculação de antígenos solúveis associados à sequência CpG induziu uma resposta imune diferenciada, superior aquela induzida pela associação deste mesmo antígeno com adjuvantes convencionais (hidróxido de alumínio, adjuvantes oleosos), e induziu expressão de genes associados à uma resposta imune celular, a qual seria ideal para combater determinados patógenos, como vírus, bactérias intracelulares e alguns tipos de parasitos.

Nesse contexto, e em face da crescente demanda por pescados cultivados, onde a ocorrência de doenças infecciosas é potencializada pela densidade populacional, torna-se necessário investigar o potencial de diferentes adjuvantes na indução de resposta imune humoral, com ênfase na cinética, intensidade e memória imunológica, que são questões relevantes e ainda não equacionadas na maioria das espécies de peixes cultivadas.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **Inactivated *Parapoxvirus ovis* as inductor of immunity in silver catfish (*Rhamdia quelen*)**

Tatiana Rohde Pavan<sup>1</sup>, Cristian Olivio Nied<sup>1</sup>, Mirela Noro<sup>2</sup>, Deniz Anziliero<sup>3</sup>, Rafael

Frاندoloso<sup>1</sup>, Luiz Carlos Kreutz<sup>1\*</sup>

(Artigo submetido ao periódico *Fish and Shellfish Immunology* – 2014)

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Campus I, Bairro São José, BR 282, km 171. 99052-900 - Passo Fundo, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pampa, Curso de Medicina Veterinária, BR 472, km 592. CEP: 97.501-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Bairro Camobi. CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Luiz Carlos Kreutz, Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus I, Bairro São José. CEP 99052-100. Telephone +55 54 3316 8444; Fax +55 54 3316 8163. E-mail: [lckreutz@upf.br](mailto:lckreutz@upf.br).



## ABSTRACT

Molecules with immune modulating activity are ubiquitously distributed in herb, roots and microorganisms and their impact on aquaculture has been increasingly exploited aiming to prevent outbreaks of infectious diseases. In the present work our goals were to investigate the effect of inactivated *Parapoxvirus ovis* (iPPVO) on blood cells and innate and acquired immune response. Groups of silver catfish were inoculated with phosphate buffered saline (PBS) or with iPPVO alone and blood samples were collected at 24 h post infection to measure the respiratory burst activity, and at 3, 5 and 7 days to evaluate hematological parameters. In addition, the production of specific antibodies to bovine serum albumin (BSA) was investigated in fish inoculated with BSA alone or BSA+iPPVO, or BSA+Freund incomplete adjuvant (FIA). Fish inoculated with iPPVO had no significant changes on respiratory burst activity; however, they had significant changes ( $p < 0.05$ ) on monocytes, heterophils and thrombocytes, which are the main cells involved in innate immunity and provide connection with acquired immunity. Fish inoculated with a combination of BSA+iPPVO had significantly higher levels ( $p < 0.05$ ) of specific serum antibodies compared to fish inoculated with BSA alone, but lower than fish inoculated with BSA+FIA. Taken together, our results indicate that administration of iPPVO to fish causes a transient but significant change on innate immune cells and improved antibody secretion to a specific antigen. These findings point to the potential usefulness of iPPVO as immunomodulator in fish and instigate further research to identify its specific component that interact with immune cells that could be exploited as adjuvants in fish.

**Key words:** fish, respiratory burst, antibody production, *Parapoxvirus ovis*, adjuvant.

## 1. Introduction

Viruses of the Poxviridae family have long been known to cause important diseases in humans, birds, terrestrial and aquatic animals [1,2]. The *Parapoxvirus ovis* (PPVO), also known as orf virus (ORFv), is a large enveloped DNA virus associated with a localized mucocutaneous infections in sheep and goats [3]; outbreaks are most commonly found during the weaning season [4] when the numbers of susceptible, immunologically immature younger animals is higher. Reinfection occurs even in the presence of humoral and cellular mediated immunity [5,6] suggesting that PPVO developed strategies to modulate the host defense mechanisms.

One of the most interesting immunological features observed following infection of sheep with PPVO is the lack of neutralizing antibodies which, in association with the localized and epitheliotropic character of infection, might be related to the high rate of reinfection [3]. A molecular analysis of PPVO genome indicated the presence of several genes coding for proteins known to counterattack host immune response [7] and genes homologues to host cytokines. The IL-10 homologue found on PPVO gene [8], for instance, is able to reduce the innate immune response and stimulate Th1 lymphocytes which, in turn, secrete cytokines such as Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2 and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) all of them able to stimulate cell mediated phagocytosis of different types of microorganisms.

These unique features instigated investigations aiming to uncover the immune-modulating capability of PPVO in several animal species. In general, animals inoculated with iPPVO have increased resistance to infection by specific pathogens [9–14]. In human cultures of mononuclear cells, increased levels of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  have been observed [14]. Mice inoculated with iPPVO had significantly higher levels of IFN-I and cytokines related to macrophage activation such as IFN- $\gamma$  and IL-12 [15]. In addition, iPPVO inoculated mice had higher resistance to infection by virus (encephalomyocarditis virus - EMCV), Gram negative bacteria (*Escherichia coli*) and fungi (*Candida albicans*). Thus, the immune modulating activity of iPPVO indicates the existence of a complex group of proteins in the viral structure that interact with immune related cells, and that could be exploited as potential adjuvants for the prophylaxis of animal diseases or as vaccine adjuvants.

In fish, molecules that interact with immune cells and mediate natural and acquired defense mechanisms are much needed and research on this subject has increased significantly in the last decade. Most molecules with immune stimulating properties are derived from herbs, roots

and microorganisms, mainly bacteria and fungi. Studies concerning the immunological effect of viral-derived proteins in fish are scarce. One study indicated that rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with iPPVO had reduced clinical signs following infection with *Aeromonas salmonicida*, the etiological agent of furunculosis [16]. Here, the major goals were to investigate the effect of iPPVO on respiratory burst activity, innate immune cells and serum antibody response in silver catfish (*Rhamdia quelen*), a Teleostean fish ubiquitous in South American rivers and lakes.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Fish

Silver catfish of both sexes were (50 – 80 g) were acclimatized in self-cleaning tanks containing 1000 L of continuously running water (15 fish/tank) and used in this study. Fish were fed twice daily with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil).

### 2.2 Experimental design

In the first experiment, groups of fish were inoculated with sterile PBS, or iPPVO, prepared as previously described [17], and blood samples were collected at 24 h post inoculation to determine the respiratory burst activity, or at 3, 5 and 7 days post inoculation to determine hematological parameters. At each time, fish captured for blood sampling were removed from the experiment. Concomitantly, in a second experiment, 5 groups of fish were inoculated with: I) sterile PBS; II) iPPVO; III) BSA; IV) BSA+iPPVO; V) BSA+FIA. Blood samples were collected at 35 days post inoculation to measure the production of specific antibodies. Fish inoculation and sample collection were performed in fish anesthetized with Eugenol (50 mg/L<sup>-1</sup>). The number of fish sampled at each time point to evaluate immunological and hematological parameters is indicated on the tables and figures legend. The experiments were carried out according to the guidelines of the “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” and were approved by the Ethics Committee for the Care and Use of Experimental Animals (CEUA) of the Universidade de Passo Fundo.

### 2.3 Respiratory burst activity

The nitroblue tetrazolium (NBT) method was used to estimate the production of intracellular superoxide radicals on whole blood samples, as reported previously [18]. Briefly, 100  $\mu$ l of heparinized blood was mixed with 100  $\mu$ l of 0.2% NBT (Sigma) and incubated at 25°C for 30 min. Then, 50  $\mu$ l of the blood NBT solution was mixed to 1 ml of N, N diethylmethyl formamide (Sigma), centrifuged (6000 x g, 5 min) and the optical density of the supernatant was measured at 540 nm. Blood samples with no NBT added were used as negative controls.

### 2.4 Hematological parameters

Heparinized blood samples were collected from the caudal vein and blood smear were prepared immediately after sampling, air-dried and stained with Wright-Giemsa, to differentiate leukocytes and thrombocytes. Erythrocytes and leukocytes were counted using an improved Neubauer chamber following standard protocols. Hematocrit and hemoglobin counts were determined on whole blood within 2 h after sampling, as previously described [19]. Total plasma protein was determined using a refractometer. Blood samples used to measure antibody production were collected without anticoagulant.

### 2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-BSA antibodies

A triple antibody indirect ELISA was carried out to detect silver catfish antibodies to BSA. Briefly, 100  $\mu$ l of BSA (50  $\mu$ g/ml<sup>-1</sup>) in carbonate-bicarbonate buffer (15 mM, pH 9.5) were distributed in 96-well plates and incubated for 24 h at 4°C. Then, the BSA solution was removed and the wells blocked with 3% skim milk (SK, Sigma) diluted in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) for 1 h at 23°C. The blocking solution was removed and silver catfish serum, diluted 1:100 in PBS-T, 1% SK, was added to the plates as first antibody. The plates were incubated at 23°C for 1 h, washed four times with PBS-T and allowed to react with rabbit anti-silver catfish IgM-like immunoglobulin (Kreutz et al., manuscript in preparation) diluted 1:1000 as the second antibody for 1 h at 23°C. After four washes, goat anti-rabbit peroxidase conjugated (third antibody, Sigma) diluted 1:20,000 was added and incubated for 1 h at 23°C. Plates were then washed four times and incubated with 100  $\mu$ l of substrate solution (5 mg of O-phenylene diamine tetra dihydrochloride in 10 ml of acetate buffer, pH 5.0, containing 4  $\mu$ l of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 15 min

in the dark. The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ l of 3 M hydrochloric acid and measured in an ELISA reader at 450 nm (Anthos 2010).

## 2.6 Statistical analysis

The data obtained was analyzed by the Shapiro-Wilk's test and were found to have normal distribution. Differences amongst treatments were analyzed by t-test or two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test, as indicated on the table and figure legends, and plotted using Prism GraphPad Prism Software v. 5. *P*-values of 0.05 or smaller were considered significant. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.).

## 3. Results and discussion

Vaccination is becoming a major tool on fish farming and has been the key reason for the dramatic reduction of antibiotic usage in aquaculture [20]. Currently, commercial vaccines are available for several bacterial diseases and ongoing research focus on the development of improved adjuvants and antigens aiming protection mainly against viral and parasitic diseases. One of the major hurdles associated with fish vaccination concerns to massive production of low-cost and effective antigens and adjuvants. In addition, the route of vaccine administration in fish is also a matter of concern in that protective immune response is usually achieved only following intraperitoneal inoculation of oil-based vaccines, and poses several limitations and risks [21]. In this scenario, research on novel, pathogen-associated molecular pattern (PAMP) components with adjuvanticity properties are much needed. The immunomodulatory effects of iPPVO on terrestrial vertebrates has long been reported and demonstrated *in vitro* and *in vivo* [8–13], and recently detailed in a murine model in which we demonstrated that iPPVO inoculation in mice resulted in a coordinated overexpression of proinflammatory and Th1 cytokines up to 96 h post inoculation [15,17], and improved innate immune response mediated by respiratory burst, phagocytosis and serum bactericidal activity. In fish, a single work indicated the potential of iPPVO as a prophylactic agent in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with clinical signs of furunculosis [16].

Here, we found that the respiratory burst, measured on total blood cells sampled 24 h post inoculation of fish with iPPVO, was higher but not significantly different from PBS inoculated fish (Figure 1). Previous work demonstrated that iPPVO induced a transient but significant increase in respiratory burst of murine [17] and human neutrophils [14], and canine monocytes [13]. Interestingly, respiratory burst could not be observed in total porcine blood cells [12]. It should not be assumed, however, that fish cells do not recognize iPPVO; instead, it instigates investigation of the possible effect and interaction of iPPVO with purified blood cells and cells from head and middle kidney cells. In most mammals species, iPPVO is a potent inducer of proinflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-8) and Th1-derived cytokines [15] and the increase on respiratory burst might be the result of direct interaction of iPPVO with innate immune cells and also as the result of cytokine (TNF- $\alpha$ ) stimulation of pre-activated phagocytic cells [22,23]. In the other hand, because of the transient and timely effect of iPPVO on cells, it is possible that silver catfish blood cells were activated but at the time we sampled the fish (24 h post inoculation) the production of reactive oxygen species was lowering, as observed in the murine model [17], or not yet high enough to be detected, in our assay, and differentiated from PBS inoculated fish. Nonetheless, because fish pleiotropic cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are both induced by leucocytes-exposed PAMPs, ongoing investigation with isolated cell population should indicate the stimulating role of iPPVO and its potential use as innate immune modulator in fish.

Furthermore, we found that iPPVO inoculation on silver catfish caused significant changes on circulating blood cells (Table 1). The number of circulating monocytes 3 days post inoculation with iPPVO was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) compared to mock inoculated fish. Circulating monocytes are driven to the site of antigen injection and comprise the first and perhaps the most important cells of the innate immune system of fish and central to lymphocyte stimulation by means of cytokine production [22]. Heterophilic granulocytes and thrombocytes, in contrast, were significantly higher in iPPVO inoculated fish ( $p < 0.05$ ) at 5 and 7 days post inoculation, respectively. The remaining hematological parameters were similar amongst groups and within the range expected for this species [19]. There was no difference in the values of total plasma protein (data not shown). In fish, heterophils and thrombocytes have phagocytic function and play a key role on innate defense towards pathogen infection [24,25]. It is tempting to speculate that the higher number of heterophils and thrombocytes observed in iPPVO inoculated fish could have been the result of the cytokine cascade resulting from the monocytes in contact

with iPPVO at the injection site. Either iPPVO proteins or its double stranded DNA might act on monocytes pattern recognition receptors (PRRs) and trigger a cascade of events leading to pleiotropic cytokine (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) production and stimulation of innate and even acquired immunity. Future investigation on the expression of selective immune-related genes by iPPVO stimulated silver catfish cells might provide a better understanding on this subject.

Beside their pivotal role on first line of defense, innate immune cells (e.g. monocytes, heterophil and thrombocytes), and the recently recognized fish dendritic cells [26], are fundamental to the development of acquired immunity. Thus, we sought to investigate if antibody production to specific antigen was also affected in iPPVO inoculated fish. Indeed, the antibody production in BSA+iPPVO vaccinated fish was significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared to the fish inoculated with BSA alone (Figure 2), but lower than that from fish inoculated with BSA+FCA. Because the main goal of this work was to investigate a possible adjuvanticity effect of iPPVO, the kinetics of antibody production during the experiment was not performed. Nonetheless, because the main effects of iPPVO have been studied mostly on innate immunity, the adjuvanticity effect of iPPVO reported herein is a novel finding, at least in a fish model. The mechanisms behind the increased antibody production might also be related to the pleiotropic cytokines induced by the innate immune cells that interact with iPPVO. In a murine model, proinflammatory (IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8), Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12), and regulatory Th2 (IL-4 and IL-10) cytokines were transiently up regulated *in vivo* within 96h post iPPVO inoculation [15,17]. A similar pattern of cytokine up regulation was also observed in porcine and human peripheral blood mononuclear cells [12,14]. This intricate network of cytokine production mediated by iPPVO might indeed affect the production of antibodies. IFN type I ( $\alpha/\beta$ ), for instance, up regulated de expression of MHC class II molecules [13] that mediate epitope presentation to B-lymphocytes. In addition, IL-1 $\beta$  mediates activation of T and B lymphocytes, and IL-4 stimulates antibody production by B cells, whereas IL-2 is well known for its role on clonal expansion of lymphocytes [27,28]. Furthermore, in a porcine model, T helper cells responded to iPPVO administration and were found to be the main source of the increased levels of IL-2, IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  [12]. Thus, iPPVO stimulate cytokine-producing innate immune cells which in turn provide the stimuli and support to the development of adaptive, antigen-specific immune response.

Interest on the interaction of novel adjuvant molecules on piscine immune system is growing mainly because the characteristics inherent to traditional adjuvants limit their use in aquaculture species. Molecules with immunomodulatory and adjuvanticity properties fit to aquaculture species are in great demand. PPVO is a large enveloped DNA virus that contains several components that might interact with PRRs and improve fish defense mechanisms. In addition, the beneficial effect on immunity is associated mostly with the inactivated form of PPVO, even on non-target species [3], indicating that the immunomodulating molecules are structural components of the virions and its effect do not required replication on the vaccinated host, which could raise concerns regarding its use as adjuvant or even prophylactic or therapeutic agent in several transmissible and non-transmissible diseases.

In summary, although iPPVO has been demonstrated to improve innate immunity in several mammalian species its use in fish has not been investigated yet. Here, we demonstrated for the first time that iPPVO alters circulating immune cells and improve the secretion of antibodies to a specific antigen. Future studies should investigate the innate immune cells that interact with iPPVO and the immune-related genes expressed both *in vivo* and *in vitro* and their correlation with protection to an infecting pathogen.

### **Acknowledgements**

This work was carried out using financial support from the Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, grant no 473195/2010-0. Tatiana R. Pavan is a Master Student with a CAPES fellowship (#2013/1236). Cristian.O. Nied is an undergraduate student with a CNPq fellowship (125852/2013-4).



## References

- [1] Haig DM. Orf virus infection and host immunity. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:127–31.
- [2] Robinson a J, Mercer a a. Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus. *Virology* 1995;208:812–5.
- [3] Haig M, McInnes CJ. Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res* 2002;88:3–16.
- [4] McElroy MC, Bassett HF. The development of oral lesions in lambs naturally infected with orf virus. *Vet J* 2007;174:663–4.
- [5] Haig DM, Thomson J, McInnes C, McCaughan C, Imlach W, Mercer A, et al. Orf virus immuno-modulation and the host immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:395–9.
- [6] Turner PC, Moyer RW. Poxvirus immune modulators : functional insights from animal models. *Virus Res* 2002;88:35–53.
- [7] McGuire MJ, Johnston S a, Sykes KF. Novel immune-modulator identified by a rapid, functional screen of the parapoxvirus ovis (Orf virus) genome. *Proteome Sci* 2012;10:4.
- [8] Fleming SB, McCaughan C a, Andrews a E, Nash a D, Mercer a a. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1997;71:4857–61.
- [9] Castrucci G, Osburn BI, Frigeri F, Ferrari M, Salvatori D, Lo Dico M, et al. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000;23:163–73.
- [10] Paillot R. A systematic review of the immune-modulators Parapoxvirus ovis and Propionibacterium acnes for the prevention of respiratory disease and other infections in the horse. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;153:1–9.
- [11] Kyriakis SC, Tzika ED, Lyras DN, Tsinas a C, Saoulidis K, Sarris K. Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. *Res Vet Sci* 1998;64:187–90.
- [12] Fachinger V, Schlapp T, Strube W, Schmeer N, Saalmüller a. Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J Virol* 2000;74:7943–51.
- [13] Schütze N, Raue R, Büttner M, Alber G. Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet Microbiol* 2009;137:260–7.

- [14] Friebe A, Siegling A, Friederichs S, Volk H, Weber O, Ag BH. Immunomodulatory Effects of Inactivated Parapoxvirus Ovis ( Orf Virus ) on Human Peripheral Immune Cells : Induction of Cytokine Secretion in Monocytes and Th1-Like Cells. *J Virol* 2004;78:9400–11.
- [15] Anziliero D, Weiblen R, Kreutz LC, Spilki F, Flores EF. Inactivated Parapoxvirus ovis induces a transient increase in the expression of autoregulatory cytokines in mice. *Brazilian J Med Biol Res* 2014;47:110–8.
- [16] C Ortega I Ruiz I De Blas, JL Muzquiz AFJA. Furunculosis control using a paraimmunization stimulant (Baypamun) in rainbow trout. *Vet Res* 1996;27:561–8.
- [17] Anziliero D, Kreutz LC, Flores EF, Weiblen R. Effects of inactivated parapoxvirus ovis on cellular and humoral events of the innate immune response in mice. *Cell Immunol* 2014;289:36–41.
- [18] Behera T, Nanda PK, Mohanty C, Mohapatra D, Swain P, Das BK, et al. Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 2010;28:320–5.
- [19] Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, de Faria Valle S, de Oliveira Silva T, Anziliero D, Davi dos Santos E, et al. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol* 2011;30:51–7.
- [20] Sommerset I, Krossøy B, Biering E, Frost P. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:89–101.
- [21] Evensen Ø. Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies , adjuvants and formulations. *Options Méditerranéennes* 2009;A:177–86.
- [22] Forlenza M, Fink IR, Raes G, Wiegertjes GF. Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Dev Comp Immunol* 2011;35:1246–55.
- [23] Mulero V, Ayala AG, Meseguer J. What can we learn from fish? An evolutionary perspective of pro-inflammatory cytokines. *Inmunología* 2005;24:17–22.
- [24] Hill DJ, Rowley a F. Are integrins involved in the aggregatory and phagocytic behaviour of fish haemostatic cells? *J Exp Biol* 1998;201:599–608.
- [25] Tosik MS, Eptula WD, Rávnièek MT. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio* L.). *Vet Med - Czech* 2001;46:12–6.
- [26] Bassity E, Clark TG. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One* 2012;7:e33196.

- [27] Swanson CL, Wilson TJ, Strauch P, Colonna M, Pelandra R, Torres RM. Type I IFN enhances follicular B cell contribution to the T cell-independent antibody response. *J Exp Med* 2010;207:1485–500.
- [28] Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity* 2006;25:373–81.

Figure 1. Respiratory burst activity measured on blood cells collected from silver catfish 24 h after inoculation with PBS or PPVO. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. (n = 15) and were compared using t-test. There were no significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups.

Figure 2. Antibody production in silver catfish. Fish were inoculated with phosphate buffered saline (PBS; group I), iPPVO (group II), BSA (group III), BSA + iPPVO (group IV) or BSA + FIA (group V). Serum samples were collected 35 days p.i. and antibody titers measured by ELISA. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. (n = 15) and were compared using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. Significant differences ( $p < 0.05$ ) amongst groups are indicated by asterisk.

Figure 1

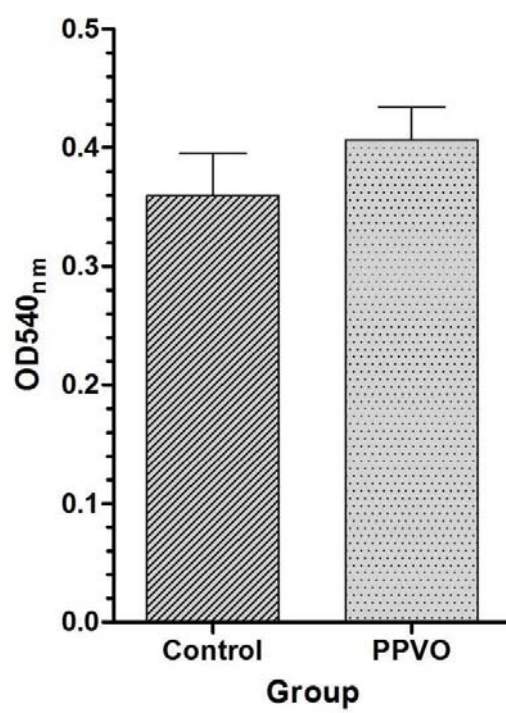
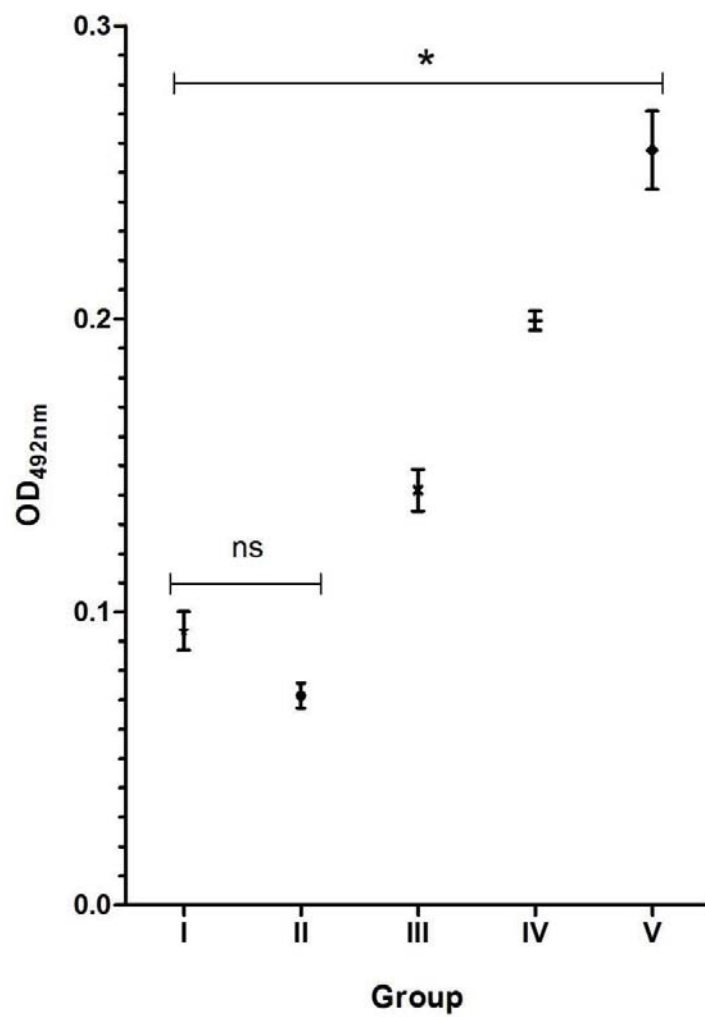


Table 1. Hematological parameters of silver catfish inoculated with phosphate buffered saline (PBS) or inactivated *Parapoxvirus ovis* (iPPVO). Blood samples were collected from all inoculated fish (n = 15) at the indicated time. Data represent the mean  $\pm$ S.E.M. Differences between the PBS and iPPVO group at 3 days post inoculation are indicated by small letters and differences ( $p < 0.05$ ) within the iPPVO group at each time point are indicated by capital letters.

Blood parameter	Treatment group (days post inoculation)			
	PBS	iPPVO		
	3	3	5	7
Erythrocytes ( $10^6/\mu\text{l}$ )	2.1 ( $\pm 0.14$ )	2.0 ( $\pm 0.17$ )	1.8 ( $\pm 0.09$ )	1.8 ( $\pm 0.19$ )
Hemoglobin (g/l)	109 ( $\pm 8.9$ )	103 ( $\pm 4.5$ )	133 ( $\pm 3.8$ )	121 ( $\pm 5.4$ )
Hematocrit (%)	42 ( $\pm 2.6$ )	36 ( $\pm 1.5$ )	37 ( $\pm 2.0$ )	40 ( $\pm 1.5$ )
Leucocytes ( $\mu\text{l}$ )	30058 ( $\pm 3359$ )	34946 ( $\pm 7619$ )	34946 ( $\pm 7619$ )	29470 ( $\pm 5934$ )
Heterophils ( $\mu\text{l}$ )	2245 ( $\pm 700$ )	3087 ( $\pm 1339$ ) <sup>A</sup>	19245 ( $\pm 4011$ ) <sup>B</sup>	5343 ( $\pm 1992$ ) <sup>A</sup>
Eosinophils ( $\mu\text{l}$ )	0	0	0	0
Monocytes ( $\mu\text{l}$ )	1097 ( $\pm 328$ ) <sup>a</sup>	362 ( $\pm 133$ ) <sup>b</sup>	214 ( $\pm 105$ )	131 ( $\pm 59$ )
Lymphocytes ( $\mu\text{l}$ )	11719 ( $\pm 1942$ )	16693 ( $\pm 7208$ )	7807 ( $\pm 1762$ )	4218 ( $\pm 1294$ )
Thrombocytes ( $\mu\text{l}$ )	31085 ( $\pm 2454$ )	34339 ( $\pm 5703$ ) <sup>A</sup>	31199 ( $\pm 7061$ ) <sup>A</sup>	56799 ( $\pm 3397$ ) <sup>B</sup>

Figure 2



## 4. CAPÍTULO 2

### **Eficácia de diferentes adjuvantes na indução de resposta imune humoral em jundiás (*Rhamdia quelen*).**

Tatiana Rohde Pavan<sup>1</sup>, Cristian Olivio Nied<sup>1</sup>, Márcia Bortoluzzi<sup>1</sup>, Adriana Costa da Motta<sup>1</sup>,  
Rafael Frandoloso<sup>1</sup>, Luiz Carlos Kreutz<sup>1\*</sup>

(Artigo será submetido ao periódico *Fish and Shellfish Immunology* – 2014)

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

\* Autor para correspondência: L.C.Kreutz, Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo. Campus I, Bairro São José. 99052-900 – Passo Fundo, RS, Brasil. Telefone +55 54 3316 8485. E-mail: [lckreutz@upf.br](mailto:lckreutz@upf.br).



## RESUMO

O uso de vacinas se constitui na principal ferramenta de prevenção de doenças e foi de fundamental importância para o salto qualitativo e quantitativo na produção de peixes cultivados. No presente trabalho o principal objetivo foi avaliar a eficácia de diferentes combinações de antígenos e adjuvantes na indução de anticorpos específicos em jundiás (*Rhamdia quelen*). Bacterinas de *Aeromonas hydrophila* ( $1 \times 10^8$  UFC/peixe) e albumina sérica bovina (BSA, 200 µg/peixe) foram combinadas com adjuvantes clássicos (hidróxido de alumínio, adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund, montanide) e adjuvantes de nova geração (oligodeoxinucleotídeos CpG) e inoculados intraperitonealmente em jundiás. Como controles, jundiás foram inoculados com solução salina fosfatada (PBS, pH 7,4) estéril + antígenos. Os peixes que receberam *A. hydrophila* em associação com adjuvantes distintos foram capturados e anestesiados para coleta de sangue, previamente à inoculação e 42 dias após a inoculação. Os peixes inoculados com BSA em associação com adjuvantes distintos foram capturados e anestesiados para coleta de sangue previamente à inoculação e aos 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.). Todos os peixes imunizados soroconverteram à inoculação com *A. hydrophila*, observando-se uma diferença significativa entre o grupo controle (*A. hydrophila*+PBS) e os demais grupos inoculados. E, entre os grupos inoculados com *A. hydrophila* e diferentes combinações de adjuvantes, houve uma diferença significativamente menor ( $p < 0.05$ ) no título de anticorpos do grupo de peixes inoculados com *A. hydrophila* + ODN CpG 1688 em relação aos grupos inoculados com *A. hydrophila* + ODN CpG 2133, CpG 2102 e CpG 2143. Nos peixes inoculados com as diferentes combinações de adjuvantes e BSA, todos os peixes soroconverteram, e houve diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) nos títulos de anticorpos detectados aos 14, 28 e 42 dias p.i. De forma geral, os maiores títulos de anticorpos foram observados aos 28 dias p.i. Entre os adjuvantes clássicos, os títulos significativamente maiores de anticorpos anti-BSA foram observados com o uso do adjuvante completo de Freund, enquanto que entre os adjuvantes ODN CpGs, os maiores títulos de anticorpos anti-BSA foram observados com o uso do ODN CpG 1668. Os estudos descritos no presente trabalho são importantes para o desenvolvimento de vacinas e estratégias de vacinação em peixes.

**Palavras-chave:** jundiá, adjuvantes, oligodeoxinucleotídeos, anticorpos.

## 1. Introdução

Globalmente, as doenças infecciosas têm causado a morte de aproximadamente 10% dos peixes cultivados o que, em cifras atuais representam perdas anuais na ordem de 13,5 bilhões de dólares (1). O desenvolvimento sustentável da aquicultura depende da prevenção de doenças, e a vacinação se constitui na principal ferramenta de proteção (2). O desenvolvimento de vacinas recombinantes, vacinas de DNA, antígenos recombinantes e a pesquisa por novos adjuvantes são de fundamental importância para garantir o crescimento de peixes cultivados e a crescente demanda por carne de pescado (3).

Adjuvantes atuam como intensificadores da resposta imunológica e são utilizados para aumentar a resposta imune ao antígeno vacinal melhorando, portanto a proteção imunológica frente à determinada doença (4). Adjuvantes em geral podem ser separados em dois grandes grupos, baseados no seu principal mecanismo de ação: adjuvantes de entrega de vacina e adjuvantes imunoestimulantes (5). O sistema de entrega de vacina inclui emulsões, micropartículas e lipossomas. Sua função consiste em direcionar antígenos associados as células apresentadoras de antígeno (APC) (6). Por outro lado, adjuvantes imunoestimulantes são substâncias derivadas principalmente de patógenos que, de forma independente, ativam células do sistema imune natural (7) e potencializam a resposta imune adquirida.

A utilização de adjuvantes tradicionais (ex: adjuvante incompleto de Freund; hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio) na indução de imunidade protetora e mesmo na ativação de genes imunológicos (genes de citocinas, sistema do complemento, imunoglobulinas e receptores celulares) continua sendo investigada (8). De forma geral, peixes imunizados com antígenos associado ao adjuvante incompleto de Freund apresentam maior resistência ao desafio com o micro-organismo patogênico e maior sequestração do antígeno no local da inoculação, enquanto que peixes imunizados com antígenos associados a adjuvantes a base de hidróxido ou fosfato de alumínio produzem títulos de anticorpos mais altos (9). Além disso, o perfil de genes imunológicos expressos após a aplicação de diferentes adjuvantes difere significativamente; o adjuvante incompleto de Freund induz genes vinculados à resposta imune celular enquanto que adjuvantes a base de hidróxido ou fosfato de alumínio induzem a expressão de genes vinculados à resposta imune humoral (8). Esses achados são fundamentais para a escolha do adjuvante correto para cada tipo de patógeno e para a indução do tipo de imunidade mais eficaz (humoral ou celular) contra esse patógeno (10). Em contraste, a capacidade de induzir imunidade protetora em

nível de mucosa, que previne a aderência e multiplicação de parasitos (ex: *Ichthyophthirius multifiliis*) ainda é limitada, mesmo com diferentes combinações de antígenos e adjuvantes (11).

A associação do antígeno com o adjuvante, principalmente a associação de bacterinas com adjuvantes oleosos, pode resultar em efeitos colaterais indesejáveis e interferir no bem-estar do peixe, reduzir a produtividade e depreciar o produto final (2). Consequentemente, a busca por novos adjuvantes, que possibilitam a indução de uma resposta imune específica robusta sem causar efeitos colaterais indesejáveis e sem danos aos órgãos e tecidos peritoneais, tem se intensificado nos últimos anos. Adjuvantes que se associam aos receptores das células dendríticas e que estimulam citocinas e aperfeiçoem a produção de anticorpos constituem uma importante linha de investigação (12). Nesse contexto, componentes microbianos específicos, como os padrões moleculares associados aos patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*, PAMP) encontram lugar de destaque, pois naturalmente se associam a receptores de reconhecimento padrão (PRR), principalmente os receptores similares ao Toll (*Toll-like receptors*, TLR) das células dendríticas e mimetizam uma infecção natural, induzindo uma resposta imune similar aquela resultante da infecção (13). Identificar esses PAMPs e entender sua relação com as células imunológicas das espécies de peixes de interesse comercial representa hoje o maior desafio na pesquisa de novos adjuvantes.

Toxinas bacterianas têm sido utilizadas para estimular o sistema imune em vertebrados. No entanto, a descoberta que o DNA bacteriano é imunogênico e imunoestimulante em um hospedeiro vertebrado é relativamente recente (14). O DNA bacteriano, alguns DNA virais e DNA de invertebrados diferem estruturalmente do DNA de vertebrados por possuírem um grande número de sequências de nucleotídeos citosina e guanina não metilados (CpG). Além disso, oligonucleotídeos sintéticos (ODN) contendo sequências de CpG também se mostraram eficientes na estimulação de células imunológicas (5). A ativação das células imunológicas por meio de CpG não é mediada por receptor de superfície celular, mas sim por receptores intracelulares (15). Nesse caso, o DNA é degradado intracelularmente e fragmentos de DNA são reconhecidos por TLR específicos (7) como o TLR 9. A localização intracelular do receptor para CpG sugere que o reconhecimento imune do CpG representa uma defesa contra patógenos intracelulares; além disso, esse reconhecimento estimula uma forte resposta mediada por linfócitos Th<sub>1</sub> (16). Dessa forma, CpG-ODN tem sido descritos como adjuvantes naturais, pois promovem a estimulação de células apresentadoras de antígenos (APC) e linfócitos (4,7).

Nesse contexto, e em face da crescente demanda por pescados cultivados, onde a ocorrência de doenças infecciosas é potencializada pela densidade populacional, torna-se premente investigar o potencial de diferentes adjuvantes na indução de resposta imune humoral com ênfase na cinética e intensidade imunológica, que são questões relevantes e ainda não equacionadas na maioria das espécies de peixes cultivadas. Nesse trabalho, o principal objetivo foi avaliar a eficácia de diferentes combinações de antígenos e adjuvantes na indução de anticorpos específicos em jundiás (*Rhamdia quelen*).

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Peixes**

Para os estudos de avaliação da resposta imune específica, foram utilizados juvenis de jundiás (60 - 80g) alocados em tanques de 1000 L de água, na densidade máxima de 1g peixe/L de água. Os tanques possuíam circulação contínua de água. Anteriormente a qualquer experimento, os peixes ficaram por pelo menos 7 dias nos tanques para adaptação. Os tanques continham refúgios e ficaram abrigados da luz solar direta. A alimentação consistia de ração comercial peletizada. Durante os experimentos, a água foi monitorada para determinação de parâmetros como pH, alcalinidade, amônia total, condutividade, dureza, temperatura, e O<sub>2</sub> dissolvido. Todos os estudos relacionados a avaliação da resposta imune específica foram conduzidos utilizando-se pelo menos 15 – 17 peixes por tratamento, com três repetições cada, e pelo menos um grupo controle.

### **2.2 Imunização dos peixes**

A imunização dos peixes foi feita por etapas, cada um dos antígenos, isoladamente, foi associado a cada um dos adjuvantes e inoculado na cavidade intraperitoneal dos alevinos. Cada mistura antígeno-adjuvante foi inoculada em pelo menos 15 - 17 peixes. Como controles, jundiás foram inoculados com solução salina fosfatada (PBS, pH 7,4) estéril + antígenos, sem adjuvantes. Para a verificação da intensidade de anticorpos produzidos os peixes que receberam antígeno purificado (BSA) em associação com adjuvantes distintos foram capturados e anestesiados para coleta de sangue, após 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.). Os peixes que receberam antígeno

particulado (*Aeromonas hydrophila*) em associação com adjuvantes distintos foram capturados e anestesiados para coleta de sangue, previamente à inoculação e 42 dias após a inoculação.

No presente estudo foi utilizado um antígeno purificado (albumina sérica bovina - BSA, 0,2 µg/peixe, Sigma) e uma bactéria (*Aeromonas hydrophila*;  $1 \times 10^8$  UFC/peixe). Esses antígenos foram utilizados em associação com adjuvantes distintos, a saber: adjuvante incompleto de Freund; hidróxido de alumínio; Montanide; e Oligodeoxinucleotídeos (ODN) CpG (10µg/peixe). A sequência dos ODN CpGs foi definida conforme sugerida em estudos anteriores (7). Os CpGs utilizados foram: CpG 1668, CpG 2102, CpG2133, CpG2143, CpG A/B, CpG C e CpG B.

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do "Colégio Brasileiro de Experimentação Animal" e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) da Universidade de Passo Fundo.

### **2.3 Coleta de sangue**

O sangue foi coletado por meio de punção da veia caudal, em peixes previamente anestesiados, e depositados em tubos de ensaio, à 4°C. Após coagulação o sangue foi centrifugado para separação do soro sanguíneo, o qual foi aliquoteado e congelado (-18°C) até a determinação de anticorpos específicos.

### **2.4 Ensaio imunoenzimático para determinação de anticorpos anti-albumina sérica bovina**

A produção de anticorpos anti-BSA foi determinada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para o ELISA, a BSA (50 µg/ml) foi adsorvida *overnight* em placas para ELISA, em tampão de carbonato (15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). Após, as placas foram bloqueadas com solução salina fosfatada tamponada (PBS, pH 7,2) contendo 5% de leite em pó desnatado (Skim Milk – Sigma) e 0,05% tween-20 (PBS-SK/T) por 1 hora. Após remoção da solução de bloqueio, foi adicionado o soro dos peixes, diluído 1:100 em PBS SK 1% T 0,05%, seguido de incubação por 1 hora a 23°C. Após nova lavagem, foi adicionado soro de coelho com anticorpo policlonal anti-Ig do jundiá, diluído 1:1000 em PBS SK 1% T 0,05%, por mais 1 hora. Após nova lavagem, foi adicionado anticorpo de cabra marcado com peroxidase anti-IgG de

coelho (*goat anti-rabbit* peroxidase SIGMA) diluído 1:20000 em PBS SK 1% T 0,05%, por mais 1 hora. As placas foram novamente lavadas e adicionou-se o substrato (O-phenyldiamine, 0,067%; Sigma) seguido de leitura a 492 nm em uma leitora de placas de ELISA. Soros de peixes não imunizados foram utilizados como controle negativo.

## 2.5 Ensaio de aglutinação em placa para detectar anticorpos anti-Aeromonas

A resposta imune humoral dos jundiás inoculados com *A. hydrophila* foi determinada por meio do ensaio de aglutinação em placas de 96 cavidades, fundo em “U”. Nos orifícios da primeira coluna, em duplicata, foram adicionados 75µl de PBS (pH 7,2) e 25µl de soro (diluição 1:4) e nos demais orifícios foi depositado 50µl da diluição de soro de cada orifício da primeira coluna foram transportados para os orifícios da segunda coluna (fator de diluição 1:2) e, após homogeneização, o procedimento se repetiu até a 11ª coluna. Após, foram adicionados a cada orifício 50µl de uma solução contendo *A. hydrophila* inativada (0.1 OD<sub>550nm</sub>) em PBS (pH 7,2). A placa foi incubada à 23°C por 2 horas e posteriormente “overnight” a 4°C para que ocorresse completa aglutinação das bactérias pelos anticorpos presentes no soro. O título de anticorpos de cada soro foi expresso como o logaritmo da recíproca da última diluição onde ocorreu completa aglutinação das bactérias. Os orifícios da 12ª coluna foram reservados para controle das bactérias.

## 2.6 Análises Estatísticas

O teste de Shapiro-Wilk's foi utilizado para verificar a distribuição normal dos resultados. Diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste t ou two-way ANOVA seguidas pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni, como indicado na legenda das figuras e tabelas. Para confecção das tabelas e figuras foi utilizado o Software Prism GraphPad Prism versão 5. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos. Os resultados foram representados pela média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.).

### 3. Resultados e Discussão

A vacinação está se tornando uma das mais importantes ferramentas para o controle profilático de doenças na aquicultura (6). A eficácia das vacinas utilizadas, no entanto, depende em grande parte da via de inoculação, da natureza química do antígeno, da constituição do adjuvante associado ao antígeno vacinal (3), além de fatores ambientais e condição de saúde dos peixes (9). Vacinas inoculadas intraperitonealmente são constituídas por antígenos inativados misturados a adjuvantes, os quais têm por finalidade melhorar a resposta imune ao antígeno. O desenvolvimento de vacinas mais eficazes (antígenos purificados, vacinas recombinantes, vacinas de DNA) e a busca por novos adjuvantes que interagem com os receptores das células apresentadoras de antígenos e direcionam a resposta imune pela estimulação de subpopulações de linfócitos constituem-se, portanto, no foco principal de inúmeras investigações (7). Essas questões assumem importância ainda maior no momento em que a vacinação de peixes (17) se incorpora ao manejo sanitário de peixes cultivados no Brasil.

Nesse estudo diferentes combinações de antígenos e adjuvantes foram utilizadas para avaliar a resposta imune humoral em jundiás. Recentemente, em um estudo sobre a cinética da resposta imune, nós demonstramos que jundiás imunizados com bacterina de *A. hydrophila* ( $1 \times 10^8$  UFC/peixe) possuíam anticorpos específicos já aos 7 dias p.i. (18) e que a produção de anticorpos aumentou gradativa e significativamente até os 35 dias p.i. No presente estudo, o objetivo principal foi avaliar a eficácia de adjuvantes na indução de anticorpos e, conseqüentemente, a resposta imune foi mensurada somente aos 42 dias pós-inoculação. Todos os peixes imunizados soroconverteram à inoculação com *A. hydrophila*, no entanto houve uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo controle (*A. hydrophila* + PBS) e os demais grupos inoculados (Figura 1). E, entre os grupos inoculados com *A. hydrophila* e diferentes combinações de adjuvantes, houve uma diferença significativamente menor ( $p < 0.05$ ) no título de anticorpos do grupo de peixes inoculado com *A. hydrophila* + ODN CpG 1688 em relação aos grupos inoculados com *A. hydrophila* + ODN CpG 2133, CpG 2102 e CpG 2143. Interessantemente, de forma geral, os títulos de anticorpos detectados nesse experimento foram inferiores aos detectados anteriormente (18), quando os peixes receberam um inóculo de *A. hydrophila* sem adjuvante. Observa-se, no entanto, que no experimento anterior cada peixe foi inoculado com  $2 \times 10^8$  UFC de *A. hydrophila*, ou seja, o dobro de antígenos usados no experimento atual. Pode-se inferir, dessa forma, que a dose de antígeno é mais importante que o



tipo de adjuvante na indução de anticorpos contra bacterinas de *A. hydrophila*. Além disso, é importante salientar que devido à constituição da parede celular, bactérias Gram negativas como a *A. hydrophila* possuem lipopolissacarídeos (LPS) que são bons imunógenos (19) e podem, de certa forma, mascarar um possível efeito dos adjuvantes, principalmente os ODN CpGs. Porém, estudos *in vivo* sugerem que peixes são menos sensíveis a toxicidade do LPS que outras espécies (20). Interessantemente em peixes o LPS estimula apenas a expressão de genes para citocinas pro-inflamatórias e não para IFN $\alpha$ -1, como em mamíferos (20). Leucócitos de trutas foram testados *in vitro* para análise de resposta a agonistas TLR em mamíferos, sendo entre outras moléculas, o LPS, um agonista TLR4. Com a utilização de uma molécula ultra-pura de LPS extraída de *Salmonella* não foram evidenciadas alterações na expressão de genes para citocinas pro-inflamatórias e para IFN $\alpha$ -1 (20). Entretanto quando utilizada a molécula de LPS extraída de *E. coli*, foi observado aumento considerável na expressão de genes citocinas pro-inflamatórias e não para IFN $\alpha$ -1, portanto o estímulo de leucócitos *in vitro* não responde como esperado para as moléculas analisadas, consideradas agonistas em mamíferos, como LPS, agonista para TLR4 (20).

Nos peixes inoculados com as diferentes combinações de adjuvantes e BSA, todos os peixes soroconverteram, e houve diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) nos títulos de anticorpos detectados aos 14, 28 e 42 dias p.i. (Figura 2 e 3). Essas diferenças foram observadas tanto em relação aos peixes do mesmo grupo em diferentes dias p.i., como entre diferentes grupos de peixes quando comparados no mesmo dia p.i. De forma geral, os maiores títulos de anticorpos foram observados aos 28 dias p.i., consistente com achados anteriores que indicam máxima produção de anticorpos em torno de 4 a 5 semanas pós-vacinação (18,21). E, entre os adjuvantes clássicos, os títulos significativamente maiores de anticorpos anti-BSA foram observados com o uso do adjuvante completo de Freund (Figura 2). De forma geral, peixes imunizados com antígeno associado ao adjuvante completo de Freund apresentam uma possível maior resistência ao desafio com o micro-organismo patogênico e maior sequestração do antígeno no local da inoculação, enquanto que peixes imunizados com antígenos associados a adjuvantes a base de hidróxido ou fosfato de alumínio produzem maiores títulos de anticorpos (9) quando associados a uma bacterina. Estudos relatam que o perfil de genes imunológicos expressos após a aplicação de diferentes adjuvantes difere significativamente; o adjuvante incompleto de Freund induz genes vinculados à resposta imune celular enquanto que adjuvantes a base de hidróxido ou fosfato de



alumínio induzem a expressão de genes vinculados à resposta imune humoral (8,9). No entanto, no presente estudo, o ACF foi superior ao hidróxido de alumínio em induzir anticorpos em jundiás; dados similares foram observados com linguado japonês, *Paralichthys olivaceus* (8). Seria interessante avaliar os genes expressos nas células imunológicas dos jundiás imunizados para avaliar o perfil de genes expressos e correlacionar com os resultados sorológicos. De qualquer maneira, mais estudos são necessários para a escolha do adjuvante correto para cada tipo de patógeno e para a indução do tipo de imunidade mais eficaz (humoral ou celular) contra esse patógeno.

Entre os adjuvantes ODN CpGs, os maiores títulos de anticorpos anti-BSA foram observados com o uso do ODN CpG 1668. O CpG 1668 induz a expressão de interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (7), o que acarretaria uma maior produção de anticorpos, explicando a diferença significativa em relação aos outros CpGs utilizados. O CpG 1668 é relatado como imunoestimulante em todas as espécies em que foi testado (7,14,22). Sabe-se que o efeito imunológico dos CpG ODNs dependem não somente da característica da sequência mas também do animal onde ela está sendo testada (23) e, possivelmente, da dose do ODN CpG (23,24). No presente estudo não foi avaliado o efeito de diferentes doses de ODN CpGs.

O DNA bacteriano tem sido reconhecido como um modulador da resposta imune, estimulando proliferação de células B e a produção de citocinas em diferentes células imunológicas de mamíferos (25). Essa atividade é causada por sequências CpG não metiladas no DNA bacteriano, o que é raro em DNA de vertebrados. Os ODN CpGs simulam muitas ações do DNA bacteriano e, em macrófagos e células dendríticas em mamíferos, estimulam a expressão de genes de citocinas como interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferon (IFN) (7). Ambos o plasmídeo de DNA e ODNs sintético contendo CpGs modificadas induziram a produção citocinas com atividade semelhantes ao IFN em leucócitos de salmão do Atlântico (26), enquanto ODNs com o CpG invertido ou citosinas metiladas, não apresentaram atividade estimulante (26). Foi demonstrado que macrófagos foram estimulados diretamente pelos CpGs para a produção de IFN e citocinas (14).

Em resumo, nossos estudos demonstraram a eficácia de diferentes combinações de antígenos e adjuvantes na indução de anticorpos específicos em jundiás. A combinação de antígeno, particulado ou solúvel, e adjuvante (clássico ou de nova geração) influi na intensidade e cinética da resposta imune e que a combinação adequada deve ser investigada para cada tipo de

antígeno e adjuvante. Não obstante, observou-se que adjuvantes de nova geração (ODN CpGs) induzem anticorpos em títulos similares ou mesmo superiores aqueles observados ao imunizar-se jundiás com antígenos associados à adjuvantes clássicos. Todavia, devido ao modo de ação e reduzido potencial de induzir lesões no local de inoculação, há um enorme potencial para uso de ODN CpGs na aquicultura. Estudos futuros serão conduzidos para verificar o perfil de genes imunológicos ativados pela exposição de células imunológicas aos adjuvantes utilizados nesse experimento, visando definir com maior precisão as características ideais das vacinas a serem utilizadas nessa e possivelmente outras espécies de peixes nativos.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, processo 473195/2010-0. Tatiana R. Pavan é estudante de mestrado com uma bolsa CAPES (# 2013/1236).

## Referências Bibliográficas

1. FAO. FAO Fishery and Aquaculture Statistics Yearbook [Internet]. 2012th ed. FAO, editor. Roma, Italy: FAO; 2013. Available from: [www.fao.org/icalog/inter-e.htm](http://www.fao.org/icalog/inter-e.htm)
2. Evensen Ø. Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies , adjuvants and formulations. 2009;(86):177–86.
3. Sommerset I, Krossøy B, Biering E, Frost P. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2005 Mar;4(1):89–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15757476>
4. McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* [Internet]. 2007 Nov [cited 2014 Jul 16];27(5):687–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031690>
5. Secombes C. Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2014 Mar 31];25(4):409–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562212>
6. Tafalla C, Bøgwald J, Dalmo R a. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Dec [cited 2014 Mar 20];35(6):1740–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23507338>
7. Carrington AC, Secombes CJ. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2006 Aug 15 [cited 2014 Mar 31];112(3-4):87–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16750571>
8. Jiao X, Cheng S, Hu Y, Sun L. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. *Vaccine* [Internet]. 2010 Mar 17 [cited 2014 Mar 31];28(7):1832–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006568>
9. Zheng Z, Yingeng W, Qingyin W, Nannan D, Meijie L, Jiangbo Q, et al. Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Mar [cited 2014 Mar 31];32(3):391–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178783>
10. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2006 Feb [cited 2014 Jul 13];20(2):137–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950491>
11. Alvarez-Pellitero P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2008 Dec 15 [cited

- 2014 Mar 31];126(3-4):171–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783835>
12. Thim HL, Iliev DB, Christie KE, Villoing S, McLoughlin MF, Strandskog G, et al. Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Jul 6 [cited 2014 Mar 31];30(32):4828–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634299>
  13. Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 Mar;240(1):11–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349083>
  14. Tassakka ACM a. R, Sakai M. The in vitro effect of CpG-ODNs on the innate immune response of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* [Internet]. 2003 Apr [cited 2014 Mar 31];220(1-4):27–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848602002752>
  15. Liu C, Sun Y, Hu Y, Sun L. Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Jul 7 [cited 2014 Mar 31];28(25):4153–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416262>
  16. Bayne CJ, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2001;25(8-9):725–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602193>
  17. Office N, Health A. Responsible use of vaccines and vaccination in fish production. 2006;(November).
  18. Kreutz LC, Pavan TR, Alves a G, Correia a G, Barriquel B, dos Santos ED, et al. Increased immunoglobulin production in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to agrichemicals. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2014 Jun;47(6):499–504. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4086177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  19. Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and immunostimulatory effects of beta-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2006 Dec 15 [cited 2014 Mar 31];114(1-2):15–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16919782>
  20. Purcell MK, Smith KD, Hood L, Winton JR, Roach JC. Conservation of Toll-Like Receptor Signaling Pathways in Teleost Fish. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* [Internet]. 2006 Mar [cited 2014 Apr 30];1(1):77–88. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1524722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

21. Bastardo A, Ravelo C, Castro N, Calheiros J, Romalde JL. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 May [cited 2014 Mar 31];32(5):756–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326941>
22. Jørgensen JB, Zou J, Johansen a, Secombes CJ. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1beta and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2001 Nov [cited 2014 Apr 30];11(8):673–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11759038>
23. Liu C, Sun Y, Hu Y, Sun L. Identification and analysis of the immune effects of CpG motifs that protect Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Aug [cited 2014 Mar 31];29(2):279–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20420914>
24. Strandskog G, Skjaeveland I, Ellingsen T, Jørgensen JB. Double-stranded RNA- and CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: comparison and synergies. *Vaccine* [Internet]. 2008 Aug 26 [cited 2014 Jul 23];26(36):4704–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602433>
25. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, et al. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* [Internet]. 2004 Sep [cited 2014 Mar 19];34(9):2541–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15307186>
26. Jørgensen JB, Johansen a, Stenersen B, Sommer a I. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2001 May;25(4):313–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11246071>

Figura 1. Resposta imune de jundiás inoculados com bacterina de *Aeromonas hydrophila*. O soro de jundiás foi coletado anteriormente à inoculação e 42 dias pós-inoculação (p.i.) e testado para a presença de anticorpos aglutinantes anti-*A. hydrophila*. Todos os peixes foram inoculados com bacterina de *Aeromonas hydrophila* associada com PBS ou diferentes adjuvantes: grupo 1: *A. hyd* + PBS; grupo 2 *A. hyd* + Hidróxido de alumínio; grupo 3: *A. hyd* + montanide; grupo 4: *A. hyd* + adjuvante incompleto de Freund; grupo 5: *A. hyd* + CpG A/B; grupo 6, *A. hyd* + CpG C; grupo 7, *A. hyd* + CpG 1668; grupo 8, *A. hyd* + CpG B; grupo 9, *A. hyd* + CpG 2133; grupo 10, *A. hyd* + CpG 2102 e grupo 11, *A. hyd* + CpG 2143. O título de anticorpos está representado pelo logaritmo da última diluição do soro em que ocorreu aglutinação, e representa a média  $\pm$ SEM (n=15). Alterações significativas ( $p < 0.05$ ) nos títulos de anticorpos estão demonstrados apenas para amostras coletas 42 dias p.i. O grupo controle diferiu significativamente dos demais grupos e está indicado por letras minúsculas. O grupo 7 diferiu significativamente (\*) dos grupos 9, 10 e 11.

Figura 2. Resposta imune de jundiás inoculados com albumina sérica bovina (BSA) e adjuvantes tradicionais. Amostras de soro foram coletas anteriormente à inoculação e nos dias 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.) e testados para a presença de anticorpos anti-BSA por ELISA. Todos os peixes foram inoculados com BSA (200  $\mu$ g) associada com PBS ou diferentes adjuvantes, conforme indicado na legenda da figura. Os resultados estão representados pela média  $\pm$ SEM. As diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os diferentes dias da coleta, no mesmo grupo, estão representadas por letras minúsculas, e as diferenças significativas entre grupos no mesmo dia da coleta estão representadas por letras maiúsculas.

Figura 3. Resposta imune de jundiás inoculados com albumina sérica bovina (BSA) e oligodeoxinucleotídeos CpG. Amostras de soro foram coletas anteriormente à inoculação e nos dias 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.) e testados para a presença de anticorpos anti-BSA por ELISA. Todos os peixes foram inoculados com BSA (200  $\mu$ g) associada com PBS ou diferentes oligodeoxinucleotídeos CpG, conforme indicado na legenda da figura. Os resultados estão representados pela média  $\pm$ SEM. As diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os diferentes dias da coleta, no mesmo grupo, estão representadas por letras minúsculas, e as diferenças significativas entre grupos no mesmo dia da coleta estão representadas por letras maiúsculas.

Figura 1

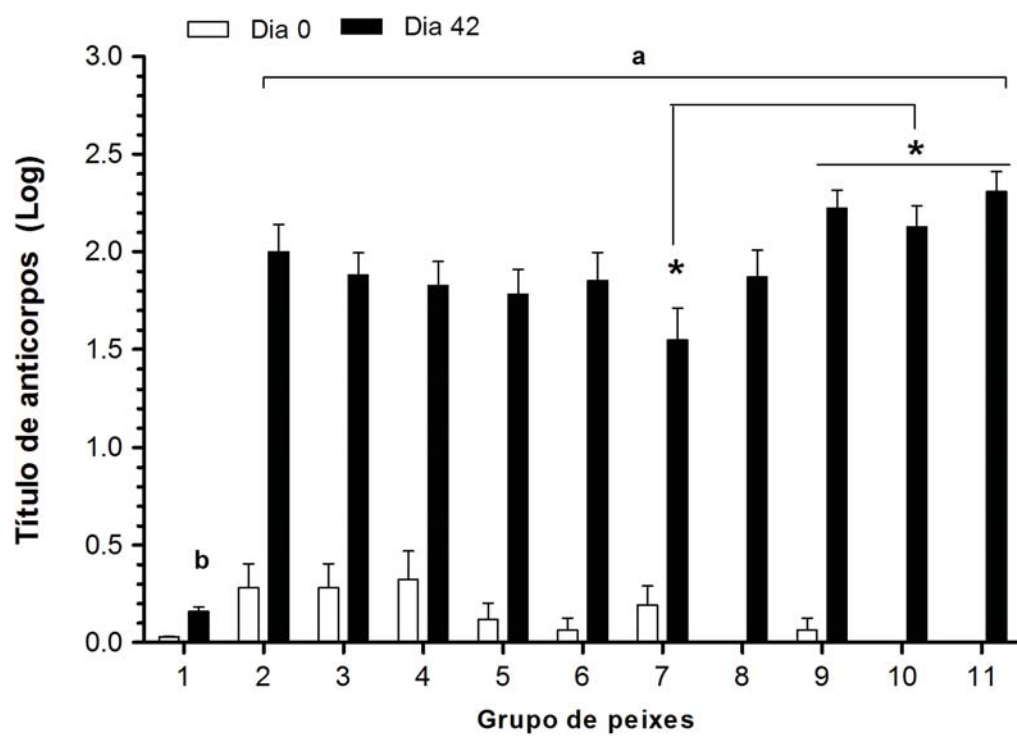


Figure 2

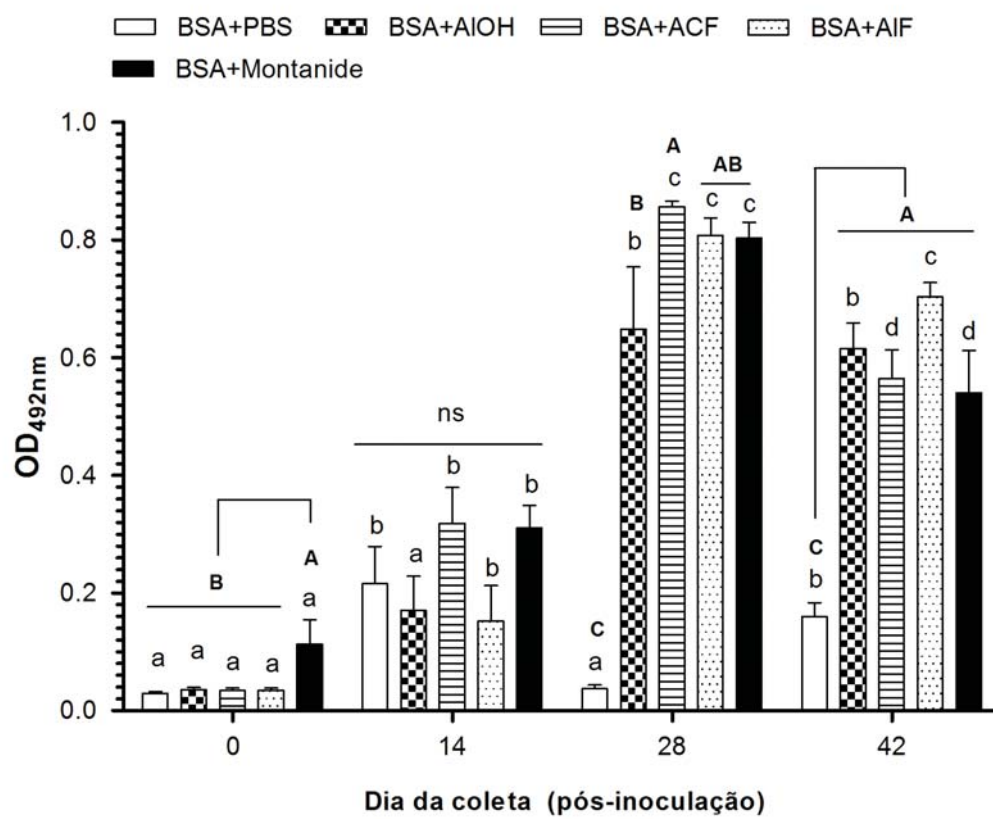
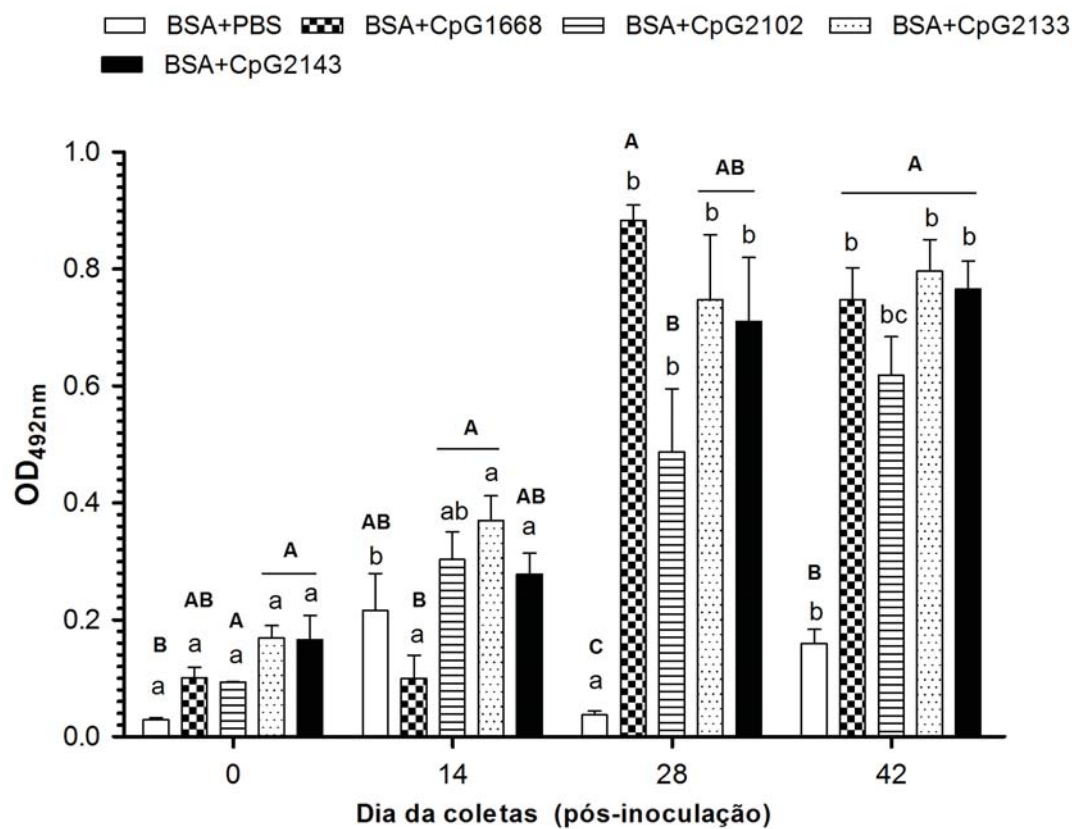




Figura 3



#### 4. CONCLUSÕES

A utilização de imunoestimulantes e adjuvantes de nova geração representam um avanço no desenvolvimento de medidas profiláticas, vacinas e programas de vacinação, e estão se tornando imprescindíveis para o desenvolvimento sustentável da aquicultura. Porém, o uso racional de moduladores do sistema imune, tanto daqueles misturados à dieta, ou aplicados parenteralmente associados a antígenos vacinais, conforme descrito nesse trabalho, preconiza uma profunda compreensão do sistema imune da espécie de peixe estudada. O estudo descrito nessa dissertação contribui para estreitar a lacuna de conhecimento existente nessa área e nos permite concluir que:

1. A administração de iPPVO promoveu um aumento transitório, mas significativo, em diversas células do sistema imune inato dos jundiás, e aumentou a produção de anticorpos específicos. Dessa maneira, os achados sugerem o uso promissor do iPPVO como imunomodulador em peixes.
2. A detecção de anticorpos aos 14 dias p.i. com as diferentes combinações de BSA e adjuvantes indica que a resposta imune específica do jundiá, cronologicamente, se assemelha aquelas observadas na maioria dos mamíferos.
3. Em jundiás imunizados com apenas uma dose de antígeno solúvel (BSA) o pico da produção de anticorpos específicos foi detectado aos 28 dias p.i.
4. Entre os adjuvantes clássicos, o ACF se mostrou mais eficaz na indução de anticorpos anti-BSA.
5. Adjuvantes de nova geração, baseados em ODN CpGs foram eficazes na indução de anticorpos específicos quando utilizados como adjuvante vacinal.
6. O título de anticorpos detectados em peixes vacinados com BSA+CpGs foi similar ao título de anticorpos anti-BSA detectados em peixes vacinados com BSA+ACF.
7. Os títulos de anticorpos anti-*A. hydrophila*, detectados aos 42 dias p.i., foram similares nos diferentes grupos de jundiás, exceto no grupo imunizado com *A. hydrophila* + ODN CpG 1668.

8. Observou-se que o potencial adjuvante do ODN CpG 1668 foi menor quando associado à bacterina de *A. hydrophila*, porém superior quando associado à BSA.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos observou-se uma preocupação maior com hábitos saudáveis de alimentação, nesse sentido resalta-se a importância do pescado, uma das mais antigas fontes de proteína para o consumo humano. Países da América Latina, como o Brasil estão em destaque pelo contínuo crescimento da produção de peixes cultivados. Nesse contexto o desenvolvimento sustentável da aquicultura depende da prevenção de doenças, e a vacinação assim como o uso de imunoestimulantes se constitui nas principais ferramentas de profilaxia. No entanto, é consenso entre pesquisadores que as informações disponíveis nessas áreas ainda são escassas.

Nos experimentos descritos nessa dissertação foram identificados diversos adjuvantes com futuro promissor para uso em vacinas; porém ainda são necessários mais estudos para melhor avaliar a cinética da resposta humoral das espécies de peixes de interesse comercial, fato esse que representa hoje o maior desafio na pesquisa de novos adjuvantes.

Os experimentos com a utilização do iPPVO, por exemplo, são inéditos, e indicam a capacidade desse vírus em induzir alterações imunológicas importantes, principalmente em relação as células imunológicas (monócitos, heterófilos e trombócitos) e na produção de anticorpos específicos. Seria interessante dar continuidade aos experimentos com iPPVO para avaliar a expressão de genes imunológicos em células expostas ao vírus, ou em órgãos de peixes inoculados com o iPPVO.

Da mesma forma, os estudos de imunização de jundiás com diferentes adjuvantes combinados com dois antígenos distintos (bacterina de *A. hydrophila*, e um antígeno solúvel – BSA) permitiram avaliar a cinética da produção de anticorpos e avaliar a eficácia dos adjuvantes clássicos e de nova geração em jundiás. Esses dados também são inéditos.

Além disso, para que pudéssemos avaliar a resposta imune específica, foi necessário desenvolver ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) o qual se mostrou eficaz e seguro na avaliação da resposta imune específica de jundiás.

E, mais importante ainda, o presente estudo permitiu suprir uma importante lacuna de conhecimento sobre a resposta imune específica de uma espécie de peixe nativo (*Rhamdia quelen*) e importante em toda a América do Sul.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Dominguez M, Takemura A, Tsuchiya M, Nakamura S. Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* [Internet]. 2004 Nov [cited 2014 Mar 31];241(1-4):491–500. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004484860400376X>
2. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2006 Feb [cited 2014 Jul 13];20(2):137–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950491>
3. Bastardo A, Ravelo C, Castro N, Calheiros J, Romalde JL. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 May [cited 2014 Mar 31];32(5):756–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326941>
4. Alvarez-Pellitero P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2008 Dec 15 [cited 2014 Mar 31];126(3-4):171–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783835>
5. Secombes C. Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2014 Mar 31];25(4):409–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562212>
6. Sommerset I, Krossøy B, Biering E, Frost P. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2005 Mar;4(1):89–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15757476>
7. Jiao X, Cheng S, Hu Y, Sun L. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. *Vaccine* [Internet]. 2010 Mar 17 [cited 2014 Mar 31];28(7):1832–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006568>
8. Office N, Health A. Responsible use of vaccines and vaccination in fish production. 2006;(November).
9. Zheng Z, Yingeng W, Qingyin W, Nannan D, Meijie L, Jiangbo Q, et al. Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Mar [cited 2014 Mar 31];32(3):391–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178783>
10. Tafalla C, Bøgwald J, Dalmo R a. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier

Ltd; 2013 Dec [cited 2014 Mar 20];35(6):1740–50. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23507338>

11. Rajanbabu V, Chen J-Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Feb [cited 2014 Mar 27];32(2):415–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093512>
12. McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* [Internet]. 2007 Nov [cited 2014 Jul 16];27(5):687–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031690>
13. Parker R, Deville S, Dupuis L, Bertrand F, Aucouturier J. Adjuvant formulation for veterinary vaccines: Montanide<sup>TM</sup> Gel safety profile. *Procedia Vaccinol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Mar 31];1(1):140–7. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877282X09000575>
14. Carrington AC, Secombes CJ. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2006 Aug 15 [cited 2014 Mar 31];112(3-4):87–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16750571>
15. Liu C, Sun Y, Hu Y, Sun L. Identification and analysis of the immune effects of CpG motifs that protect Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Aug [cited 2014 Mar 31];29(2):279–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20420914>
16. Aoki T, Takano T, Santos MD, Kondo H. Molecular Innate Immunity in Teleost Fish : Review and Future Perspectives. *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress*. 2008. p. 263–76.
17. Figueredo AB, Tancredo KR, Hashimoto GS, Roumbedakis K, Marchiori NDC, Martins ML. Haematological and parasitological assessment of silver catfish *Rhamdia quelen* farmed in Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* [Internet]. 2014 Jun;23(2):157–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054493>
18. Blas IRI De. Original article Furunculosis control using a paraimmunization stimulant ( Baypamun ) in rainbow trout Ortega. 1996;
19. Paillot R. A systematic review of the immune-modulators Parapoxvirus ovis and *Propionibacterium acnes* for the prevention of respiratory disease and other infections in the horse. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 May 15 [cited 2014 May 1];153(1-2):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481655>
20. Swain P, Behura a, Dash S, Nayak SK. Serum antibody response of Indian major carp, *Labeo rohita* to three species of pathogenic bacteria; *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens*. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2007 May 15

[cited 2014 Mar 31];117(1-2):137–41. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17383016>

21. Weber O. Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2014 May 1];84(7):1843–52. Available from: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/vir.0.19138-0>
22. Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Dev Comp Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Dec [cited 2014 Mar 31];35(12):1263–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21414346>
23. Evensen Ø. Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies , adjuvants and formulations. 2009;(86):177–86.
24. Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 Mar;240(1):11–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349083>
25. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Apr 28];9(1):15–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079135>
26. Purcell MK, Smith KD, Hood L, Winton JR, Roach JC. Conservation of Toll-Like Receptor Signaling Pathways in Teleost Fish. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* [Internet]. 2006 Mar [cited 2014 Apr 30];1(1):77–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1524722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Jørgensen JB, Zou J, Johansen a, Secombes CJ. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1beta and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2001 Nov [cited 2014 Apr 30];11(8):673–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11759038>
28. Strandskog G, Skjaeveland I, Ellingsen T, Jørgensen JB. Double-stranded RNA- and CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: comparison and synergies. *Vaccine* [Internet]. 2008 Aug 26 [cited 2014 Jul 23];26(36):4704–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602433>
29. Thim HL, Iliev DB, Christie KE, Villoing S, McLoughlin MF, Strandskog G, et al. Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Jul 6 [cited 2014 Mar 31];30(32):4828–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634299>

30. Liu C, Sun Y, Hu Y, Sun L. Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Jul 7 [cited 2014 Mar 31];28(25):4153–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416262>