

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

RAFAEL LUCKWU DE SOUSA

Avaliação dos diferentes métodos encontrados na literatura para a
obtenção de imunoglobulinas séricas de Tambaqui (*Colossoma
macropomum*)

MANAUS

2024

RAFAEL LUCKWU DE SOUSA

AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES MÉTODOS ENCONTRADOS
NA LITERATURA PARA A OBTENÇÃO DE
IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS DE TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Imunologia Básica e Aplicada como requisito
para obtenção do título de Doutor em Imunologia
Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina dos Santos

Sobreira de Sampaio

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S725a Sousa, Rafael Luckwu de
Avaliação dos diferentes métodos encontrados na literatura para a obtenção de imunoglobulinas séricas de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Rafael Luckwu de Sousa . 2024
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Maria Cristina dos Santos Sobreira de Sampaio
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Sanidade. 2. Piscicultura. 3. Imunoglobulinas. 4. *Colossoma macropomum*. I. Sampaio, Maria Cristina dos Santos Sobreira de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RAFAEL LUCKWU DE SOUSA

AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES MÉTODOS ENCONTRADOS
NA LITERATURA PARA A OBTENÇÃO DE
IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS DE TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*)

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Imunologia Básica e
Aplicada como requisito para obtenção do
título de Doutor em Imunologia Básica e
Aplicada.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.a Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Guilherme Campos Tavares
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof Dr.a Ana Lúcia Silva Gomes
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr.a Elizabeth Gusmão Affonso
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MANAUS

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e a todas as pessoas que se dedicam ao progresso moral da sociedade e ao amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de amor, a maior energia de luz em nossas vidas e causa primária de todas as coisas.

À minha família, que sempre esteve do meu lado me apoiando e me dando forças e suporte em momentos difíceis.

Aos meus colegas de laboratório que sempre quando puderam me auxiliaram nas atividades laboratoriais e companheiros(as) de risadas e apoio mútuo.

À professora Consuelo Latorre Fortes Dias e a Paula Ladeira Ortolani que nos deram suporte nas análises laboratoriais de colunas de proteína de afinidade e exclusão molecular em Belo Horizonte (MG) e via internet.

À professora Maria Cristina, minha atual orientadora, por estar nessa jornada de orientação desde antes da minha graduação em Biologia, na Universidade Federal do Amazonas. Essa jornada juntos já tem 12 anos.

À professora Ana Lúcia por me ajudar e disponibilizar peixes para a realização de coleta de plasma de Tambaqui quando eu necessitava.

Ao piscicultor Luizinho Bonfá pela generosidade de ceder uma quantidade grande de peixes para a obtenção do plasma de Tambaqui para os experimentos.

Ao Framir por me auxiliar e me ensinar a coletar o sangue do Tambaqui.

Ao Roger Crescêncio por se disponibilizar a me dar consultorias sobre como conversar com os piscicultores e também por me auxiliar quanto ao desenvolvimento de uma possível ferramenta que ajude os piscicultores a controlarem as suas finanças.

Ao piscicultor Marcus por me auxiliar em várias perguntas e esteve presente por vários meses me dando atenção na resolução de atividades no CNA Jovem 5ed.

Aos Centros espíritas kardecistas e os espíritos benevolentes de luz por me auxiliarem psicologicamente seja intuitivamente ou nos momentos de passe e me ajudando em momentos onde me sentia sozinho e sem esperança e aos órgãos de fomento Capes e Fapeam.

A Fé renova as forças e Deus capacita os que não se sentem capazes.

Apenas mantenha a vibração positiva e siga em frente.

"Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor e não para as pessoas, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança.

É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo."

Colossenses 3:23-24

RESUMO

Em 2050, a população mundial deverá atingir 9,5 bilhões de habitantes e frente a esse crescimento a produção de proteína animal precisará expandir para atender ao consumo dessa população. A principal atividade da piscicultura, no Brasil, é o cultivo de peixes de água doce, sendo a espécie mais criada, na região Norte, o tambaqui (*Colossoma macropomum*), pelas suas características econômicas, seu sabor e rusticidade. No entanto, um dos entraves encontrados na piscicultura é a manutenção da sanidade animal, pois, por exemplo, bactérias e parasitas intestinais podem gerar grandes perdas econômicas por causarem morbidade e mortalidade na criação. Este trabalho é a continuação do projeto de Mestrado cujos resultados foram a relação dos principais agentes infecciosos, estudados pela comunidade científica, que acometem o tambaqui, e o desenvolvimento de um protocolo para o isolamento das imunoglobulinas totais séricas de tambaqui, purificar e comparar os métodos de obtenção de imunoglobulinas séricas de Tambaqui a fim de auxiliarmos no desenvolvimento de ferramentas para a elucidação da efetividade de futuras vacinas e kits de diagnóstico. Avaliamos a precipitação com ácido caprílico (AC), sulfato de amônio (SAS) e a combinação de ambos os métodos, seguida de cromatografia de exclusão molecular e afinidade. O AC, em pH 5, mostrou-se mais eficiente na purificação, especialmente ao ser purificado após as colunas Superdex 200, Sephacryl 200 e Superose 6. A combinação de AC e SAS, bem como a cromatografia de afinidade, não obtiveram resultados satisfatórios. Os resultados obtidos contribuem para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e de controle de doenças em piscicultura. Como conclusão, as descobertas desta pesquisa representam um passo crucial para o isolamento e caracterização de imunoglobulinas séricas, o que auxiliará no desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico e controle de doenças na piscicultura do tambaqui.

Palavras-chave: Sanidade, Piscicultura, Imunoglobulinas séricas, *Colossoma macropomum*.

Lista de Figuras

Figura 1: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui AC em coluna de afinidade de Proteína A.

Figura 2: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui AC em coluna de afinidade de Proteína G.

Figura 3: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui AC em coluna de fase reversa C4.

Figura 4: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui AC em coluna de fase reversa C8.

Figura 5: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui AC em Superdex 200 HR10/30. Volume total da coluna 24 ml. Fluxo 0.5 ml/min. Tampão Tris 0.1 M pH 8.0. As linhas contínuas em vermelho mostram os volumes de eluição corrigidos (pela curva de regressão) das proteínas padrão e as respectivas massas moleculares (em KDa).

Figura 6: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui SAS em Superdex 200 HR10/30. Volume total da coluna 24 ml. Fluxo 0.5 ml/min. Tampão Tris 0.1 M pH 8.0. As linhas contínuas em vermelho mostram os volumes de eluição corrigidos (pela curva de regressão) das proteínas padrão e as respectivas massas moleculares (em KDa). A linha pontilhada preta indica o corte arbitrário estabelecido para componentes de alta (>32 KDa) e baixa (≤ 32 KDa) massa para fins experimentais.

Figura 7: Superposição de perfis cromatográficos de amostras de plasma de tambaqui SAS e AC recém reconstituídas em Superdex 200 HR10/30. Vermelho - amostra AC; azul - amostra SAS. Volume total da coluna 24 ml. Fluxo 0.5 ml/min. Tampão Tris 0.1 M pH 8.0. A linha pontilhada indica o corte estabelecido para componentes de alta (>32 KDa) e baixa (≤ 32 KDa) massa para fins experimentais.

Figura 8: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tabaqui purificada com SAS e AC, em Superdex 200 HR10/30. Volume total da coluna 24 ml. Fluxo 0.5 ml/min. Tampão Tris 0.1 M pH 8.0. As linhas contínuas em vermelho mostram os volumes de eluição corrigidos (pela curva de regressão) das proteínas padrão e as respectivas massas moleculares (em KDa). A linha contínua preta indica o corte arbitrário estabelecido para componentes de alta (>32 KDa) e baixa (≤ 32 KDa) massa para fins experimentais.

Figura 9: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tabaqui AC em Sephacryl S200. Duas colunas em série com volume total de 360 cm^3 . Tampão TRIS 0.1 M pH 8.0. Fluxo 12 ml/h. Os volumes de eluição estão aproximados devido à variação no volume das frações (entre 2.5 e 3 ml).

Figura 10: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tabaqui SAS+AC em Sephacryl 200 HR10/30. Duas colunas em série com volume total de 360 cm^3 . Tampão TRIS 0.1 M pH 8.0.

Figura 11: Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tabaqui SAS em Sephacryl 400. Dimensões da coluna $d=1.6\text{ cm}$, $h=100\text{ cm}$, vol cerca de 180 cm^3 . Tampão TRIS 0.1 M pH 8.0. Fluxo 12 ml/h. B.

Figura 12: Perfil cromatográfico de P1 da Sephacryl S200, de plasma previamente processado com AC, em Superose 6. Tampão 0.1 M TRIS pH 8.0. Fluxo 0.5 ml/min.

Figura 13: Perfil cromatográfico de IgM-like encontrado em *Neoditrema ransonneti*, um perfil similar ao encontrado na amostra pós Ácido Caprílico.

Figura 14: Perfil cromatográfico de P1 da Sephacryl S200 eluída de plasma de tabaqui processado com SAS+AC. Tampão 0.1 M TRIS pH 8.0. Fluxo 0.5 ml/min.

Figura 15: Resumo de todos os resultados cromatográficos obtidos com as colunas de exclusão molecular deste capítulo de tese. Superose 6 mostra os perfis mais purificados, porém não conclusivos para anticorpos ainda. São necessários novos experimentos para continuar o delineamento experimental.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classe de anticorpo purificado de diferentes espécies de peixes teleósteos; Ig= Imunoglobulina. A purificação foi realizada com plasma obtido de diversas espécies de peixes teleósteos. Os métodos de purificação e referências de cada trabalho.

Tabela 2: Classe de anticorpo purificado de diferentes espécies de peixes teleósteos; Ig= Imunoglobulina. A massa molecular da(s) imunoglobulina(s) encontrada(s). A massa molecular das imunoglobulinas após o processo de redução das cadeias leves e pesadas. A conformação da imunoglobulina relatada. Métodos de análises das purificações encontradas nos estudos. E as referências dos trabalhos na última coluna.

Tabela 3: Colunas de Exclusão molecular mais usadas nos trabalhos de purificação de imunoglobulinas séricas de peixes teleósteos.

Tabela 4: Colunas de Afinidade mais usadas nos trabalhos de purificação de imunoglobulinas séricas de peixes teleósteos.

Tabela 5 – Colunas de Troca iônica mais usadas nos trabalhos de purificação de imunoglobulinas séricas de peixes teleósteos.

Tabela 6: Coluna de Troca Catiônica usada em trabalho de purificação de imunoglobulinas séricas de peixes teleósteos.

Lista de abreviaturas e siglas

ADS: Agência de Desenvolvimento Sustentável do Amazonas.

AU-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida de ureia alcalina.

BCR: Receptor da célula B.

BSA: Albumina Sérica Bovina.

CAPRUC: Cooperativa de Aquicultores e Produtores Rurais do Careiro.

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média.

CNBr: Brometo de Cianogênio.

CNA: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil.

COOPAQUAM: Cooperativa dos Piscicultores do Amazonas.

CR: Receptor do Complemento.

DAB: 3'3 Diaminobenzidina.

DE: Densidade de estocagem.

DEAE: Dietilaminoetil.

DNP: Dinitrofenil.

ELISA: Ensaio imunoenzimático.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

FPLC: Cromatografia líquida rápida de proteínas.

GE HealthCare Bioscience AB: General Electric HealthCare Bioscience, empresa de biotecnologia.

H: Cadeia pesada.

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência.

HR: Alta resolução.

Ig: Immunoglobulina ou anticorpo.

IgM: Immunoglobulina do tipo M.

IgD: Immunoglobulina do tipo D.

IgT: Immunoglobulina do tipo T.

IgZ: Immunoglobulina do tipo Z.

IPAAM: Instituto de Proteção Ambiental do Amazonas.

kDa: Kilodáltons.

L: Cadeia leve.

LFIA: Ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral.

MBP: Proteína de ligação à manose.

MBL: Lectina de ligação de manose.

MemSep: Membrane Separation.

Mini-PROTEAN: Modelo de equipamento de eletroforese vertical da marca BIO-RAD

MVP: Mínimo produto viável.

MW: Massa molecular.

NAP: Nome de coluna de cromatografia de filtração em gel.

OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico.

PAMP: Padrões moleculares associados aos patógenos.

PBS: Solução salina tamponada com fosfato.

PRR: Receptor de reconhecimento de padrão.

RPM: Rotações por minuto.

SAS: Sulfato de Amônio Saturado.

SD: Densidade de estocagem.

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida.

SEPA: Secretaria Executiva de Pesca e Aquicultura.

SEBRAE: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas.

Sephacryl: Coluna de cromatografia de exclusão molecular.

Superdex: Coluna de cromatografia de exclusão molecular.

Superose: Coluna de cromatografia de exclusão molecular.

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano.

VCM: Volume corpuscular médio.

WB: Western blot.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
Qual o interesse em conhecer as imunoglobulinas sanguíneas?.....	17
Descrição da composição bioquímica do soro e a importância desses constituintes para a imunidade dos peixes.....	17
Os Anticorpos e seus Papéis Sistêmicos.....	19
Histórico da descoberta das imunoglobulinas no soro dos peixes.....	22
METODOLOGIA.....	23
Uma visão geral dos métodos comumente usados na purificação de anticorpos nos peixes teleósteos.....	24
Os métodos de Precipitação:.....	24
Os métodos Cromatográficos:.....	25
Outros Métodos.....	25
A aplicação histórica dos métodos de purificação.....	25
Entendendo os Princípios, as vantagens e as desvantagens dos métodos.....	26
Considerações para a escolha do método.....	27
Aplicações do Estudo das Imunoglobulinas do Soro dos Peixes Teleósteos.....	27
Aplicações nas Ciências Básicas.....	27
Aplicações nas Ciências Aplicadas.....	28
CONCLUSÃO.....	29
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO II.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
A espécie <i>Colossoma macropomum</i>	55
A relevância econômica da espécie para o Brasil.....	55
Proteína animal sustentável.....	55
As imunoglobulinas plasmáticas.....	57
REFERENCIAL TEÓRICO.....	59
JUSTIFICATIVA.....	60
OBJETIVOS.....	61
Objetivo Geral.....	61
Objetivos Específicos.....	61
MATERIAL E MÉTODOS.....	62
Tipo de Estudo.....	62
Local do Estudo.....	62
População do Estudo.....	62
Amostragem.....	62
Critérios de Elegibilidade.....	62
Procedimentos de coleta de soro de Tambaqui.....	63
Purificação das imunoglobulinas com Ácido Caprílico.....	63

Purificação das imunoglobulinas com sulfato de amônio.....	63
Diálise pós purificação com ácido caprílico e ou sulfato de amônio.....	63
Liofilização.....	64
Cromatografia molecular de exclusão.....	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

CAPÍTULO I

Revisão de literatura: Desvendando a Imunidade Humoral dos Peixes Teleósteos: Avanços e Aplicações.

Rafael Luckwu de Sousa^{1,2}, e Maria Cristina dos Santos Sobreira de Sampaio.

¹Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

²Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas,

INTRODUÇÃO

Qual o interesse em conhecer as imunoglobulinas sanguíneas?

Os peixes teleósteos representam o maior e o mais diversificado grupo de vertebrados, encontrados nos ecossistemas aquáticos e são fonte de alimento em todo o planeta. A ascensão da aquicultura e os crescentes desafios ambientais tornam a compreensão da imunidade dos peixes fundamental para garantir a demanda de alimentos da população.

As imunoglobulinas (Ig), também conhecidas como anticorpos, são componentes-chave do sistema imune humoral dos peixes, pois fornecem proteção, atuando, principalmente, na neutralização de patógenos invasores (Uribe et al., 2011). Ao estudar a estrutura e função das Igs dos peixes, podemos obter informações valiosas sobre os mecanismos exercidos e os componentes que participam nas respostas imunes contra os variados tipos de agentes patogênicos. Um conhecimento essencial para os desenvolvimentos de vacinas e de imunoterapias eficazes, além de imunodiagnósticos adaptados para cada espécie de peixe (Magnadóttir, 2006).

Os passos iniciais no estudo das imunoglobulinas séricas de peixes são o isolamento, a purificação e a caracterização destas proteínas. Amostras de Ig purificadas permitem aos pesquisadores realizar análises aprofundadas da estrutura dos anticorpos, características de ligação e interações com patógenos (Scapigliati et al., 1999). Embora as técnicas de purificação de imunoglobulinas de mamíferos estejam bem estabelecidas, as características distintas das Igs de peixes requerem o desenvolvimento de protocolos de purificação específicos e otimizados (Castro et al., 2013).

O desenvolvimento dos métodos eficazes de purificação em peixes teleósteos é de suma importância devido à presença de distintas classes de imunoglobulinas (Magnadóttir, 2006), que se apresentam em baixas concentrações séricas, quando comparadas às de mamíferos (Castro et al., 2013).

A purificação e análise bem sucedidas de imunoglobulinas de peixes teleósteos prometem melhorar o controle de doenças na aquicultura, melhorar a saúde e o bem-estar dos peixes e, em última análise, contribuir para um abastecimento alimentar global mais sustentável e seguro.

Descrição da composição bioquímica do soro e a importância desses constituintes para a imunidade dos peixes

O soro de peixes constitui uma mistura complexa de proteínas, lipídios, carboidratos e outros compostos essenciais que participam de diversos processos fisiológicos. Este ambiente fluido desempenha um papel vital na defesa imunológica desses animais. As imunoglobulinas

representam uma classe significativa de proteínas séricas envolvidas na resposta imune inata e adaptativa. Por exemplo, a IgM presente na corrente sanguínea antes de qualquer estimulação antigênica é liberada pelos linfócitos do tipo B1 da imunidade inata. Essas glicoproteínas reconhecem antígenos com estruturas conservadas e vitais apresentados por patógenos invasores, facilitando sua neutralização no organismo do peixe (SAAVEDRA, 2013).

Além das imunoglobulinas, o soro dos peixes contém uma série de componentes da imunidade inata, dentre os quais destacam-se as proteínas do Sistema Complemento. Os componentes do Sistema Complemento podem ser ativados em três principais vias: a Clássica, a Alternativa e a das Lectinas. As três vias levam à clivagem de C3, uma proteína central, resultando na geração de fragmentos C3a e C3b (MERLE et al., 2015). C3b se liga covalentemente à superfície do patógeno, atua como uma opsonina que facilita a fagocitose por leucócitos que possuem receptores de complemento (CR) ou inicia a ativação da via Alternativa (NAIK e HARRISON, 2013). O Sistema Complemento também está envolvido na geração de anafilatoxinas (C3a e C5a) que iniciam reações inflamatórias ao induzir quimiotaxia de células fagocíticas e ativar a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (GASQUE, 2004; SARMA e WARD, 2011). Portanto, as três vias, após ativação, podem lisar diretamente os patógenos, com a formação do complexo de ataque à membrana (MAC); atrair células fagocíticas e desencadear respostas inflamatórias pela formação das anafilatoxinas, além de outras funções, que já foram bem definidas em mamíferos (BOSHRA, 2006).

O soro também contém proteínas de fase aguda como a MBL (Mannose Binding Lectin) – a sua concentração aumenta rapidamente durante a infecção ou inflamação, podem reconhecer padrões específicos de carboidratos encontrados em superfícies microbianas (BOSHRA, 2006) e ativar a via das Lectinas do Sistema Complemento. Outra proteína de fase aguda é a proteína C reativa, conhecida por sua capacidade de se ligar aos patógenos e atuar como opsonina ou ativar o Sistema Complemento. Além disso, enzimas como proteases e antiproteases estão presentes no soro, controlando processos inflamatórios e prevenindo danos excessivos aos tecidos (SAAVEDRA, 2013; NAKAYASU, 2002). A lisozima, outra proteína sérica abundante, apresenta ação enzimática ao lisar as paredes celulares bacterianas, proporcionando defesa antimicrobiana (SAAVEDRA, 2013).

Os componentes inatos fornecem uma primeira linha de defesa de amplo espectro e funcionam sinergicamente com a resposta adaptativa. Compreender a interação entre estes constituintes do soro continua a ser crucial para elucidar os mecanismos imunológicos empregados pelos peixes teleósteis.

Nos peixes teleósteos já foram descritos três isotipos de imunoglobulinas: IgM, IgD e IgT/IgZ. O isotipo predominante no soro destes peixes é a IgM, essencial para iniciar a resposta imune primária. As funções da IgD permanecem menos compreendidas, mas provavelmente estão envolvidas na imunidade de mucosa (SAAVEDRA, 2013). IgT/IgZ, um isotipo específico de peixes, desempenha um papel significativo na imunidade da mucosa intestinal (DANILOVA, 2005).

A abundância de vários componentes imunológicos no soro dos peixes varia entre as espécies e em seus estágios de desenvolvimento. Por exemplo, durante as fases iniciais de desenvolvimento, os peixes dependem fortemente de mecanismos imunes inatos. À medida que amadurecem, o seu sistema imune adaptativo se desenvolve, resultando no aumento da produção de imunoglobulinas. Portanto, variações dependentes da idade, no perfil bioquímico do soro de peixes, merecem consideração ao estudar a imunidade desses animais (SAAVEDRA, 2013).

Fatores ambientais influenciam profundamente a composição bioquímica do soro de peixes e a sua eficácia imunológica. As variações de temperatura afetam diretamente as taxas metabólicas e, posteriormente, a produção de componentes imunológicos, assim como, parâmetros de qualidade da água, como salinidade ou níveis de poluição, podem modular as respostas imunológicas. Esses fatores podem levar à imunossupressão ou ao aumento da atividade imunológica, dependendo da natureza e da gravidade do estressor ambiental (COSTA et al. 2019).

Histórico da descoberta das imunoglobulinas no soro dos peixes

A identificação e caracterização de imunoglobulinas (Ig) em peixes marca um capítulo significativo na história da imunologia comparativa. Estudos iniciais no final da década de 1960 forneceram as primeiras evidências da presença de moléculas semelhantes a anticorpos no soro de peixes (CLEM e SIGEL, 1963). Essa pesquisa histórica preparou o terreno para décadas de investigação intensiva sobre a estrutura, função e evolução das imunoglobulinas de peixes.

Ao longo das décadas de 70 e 80, do século XX, estudos cruciais avançaram nossa compreensão da diversidade e características das Ig de peixes. Os pesquisadores, na época, descobriram que os peixes teleósteos possuem uma classe distinta de imunoglobulina, conhecida como IgM, que exibe uma estrutura tetramérica semelhante à IgM de mamíferos (ACTON et al., 1971; CLEM e MCLEAN, 1975). Estudos com foco em espécies como o bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e a carpa

(*Cyprinus carpio*) revelaram a presença de moléculas de Ig com massas moleculares estimadas em aproximadamente 700-900 kDa (LOBB e CLEM, 1981; WARR et al., 1991).

Investigações posteriores revelaram a heterogeneidade da IgM de peixes teleósteos. Pesquisas na década de 1990 demonstraram a existência de pelo menos duas isoformas distintas de IgM em várias espécies (BENGTON et al., 1991; HORDVIK et al., 1992). Essas isoformas, frequentemente chamadas de IgM secretada ou IgM ligadas à membrana de células B, na forma monomérica como um receptor -BCR- (SUNYER, 2013), permitiram compreender suas implicações evolutivas e suas diferenças funcionais, nas linhagens dos peixes.

A progressão histórica da pesquisa sobre imunoglobulinas de peixes revela uma mudança gradual na compreensão. Enquanto os estudos iniciais se concentraram principalmente nas semelhanças estruturais da IgM entre as espécies de vertebrados, investigações subsequentes destacaram a complexidade e as adaptações únicas presentes no sistema imunológico dos peixes. Essa mudança de perspectiva alimentou novas pesquisas sobre os distintos papéis desempenhados por diferentes isoformas de Ig na imunidade dos peixes.

As bases estabelecidas por essas descobertas históricas moldam diretamente as técnicas contemporâneas de purificação de imunoglobulinas na área da Bioquímica. O refinamento de metodologias como precipitação de proteínas, cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão por tamanho agora permite o isolamento e caracterização eficientes de classes e isoformas específicas de Ig expressas de uma variedade de espécies de peixes (ESTEVE-GASSENT et al., 2016; SOLEM e STENVIK, 2016). Esses avanços têm implicações significativas para campos como a aquicultura, no qual as Ig purificadas servem como ferramentas poderosas para diagnósticos, desenvolvimento de vacinas e estudo das respostas imunes dos peixes contra patógenos.

Os Anticorpos e seus Papéis Sistêmicos

Os três isótipos de imunoglobulinas: IgM, IgD e IgT/IgZ exibem papéis e distribuições distintas no sistema imunológico dos peixes, com vários graus de compreensão. A abordagem abaixo é relacionada ao soro.

IgM: A imunoglobulina IgM é predominante encontrada em teleósteos, com concentrações séricas variando de 0,6 a 16 mg/mL, dependendo da espécie e de fatores como temperatura da água e estimulação imune (SOLEM; STENVIK, 2006). Em trutas arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), a concentração sérica de IgM é cerca de 2,5 mg/mL (ZHANG et al., 2010). No entanto, a IgM também é encontrada em outros fluidos corporais, como bile (LOBB e CLEM,

1981), e em tecidos mucosos, incluindo intestino, brânquias, pele, faringe e cavidade nasal (SOLEM e STENVIK, 2006; ZHANG et al., 2010; XU et al., 2016). As concentrações de IgM nesses tecidos são consideravelmente mais baixas do que no soro, por exemplo, o muco intestinal de truta apresenta cerca de 0,075 mg/mL, enquanto o muco cutâneo, branquial, faríngeo e nasal as concentrações são de 0,0046 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,072 mg/mL e 0,28 mg/mL, respectivamente (SOLEM e STENVIK, 2006; ZHANG et al., 2010; XU et al., 2016). A IgM também está presente no muco da pele da sargo-de-dente (*Archosargus probatocephalus*), com concentrações entre 8-90 µg/mL (SALINAS et al., 2011). Além disso, a IgM é encontrada em órgãos linfóides, como rim anterior, baço e timo (ROMANO et al., 1997; ROMBOUT et al., 1993; SCAPIGLIATI et al., 1996). Estruturalmente, a IgM dos teleósteos geralmente se apresenta como um tetrâmero com peso molecular entre 700 e 800 kDa (LOBB e CLEM, 1981; SALINAS et al., 2011; ELCOMBE et al., 1985; ZHANG et al., 2010). No entanto, no muco da pele da sargo-de-dente, uma parte da IgM é encontrada como dímeros e monômeros ligados não covalentemente a uma proteína, possivelmente o componente secretor do receptor de imunoglobulinas poliméricas (SALINAS et al., 2011).

Desempenha o papel crucial na imunidade inata e na adaptativa em peixes, com funções efetoras que incluem a ativação do Sistema Complemento, opsonização, neutralização e aglutinação (PARRA et al., 2013; YE et al., 2013). Atua no revestimento de bactérias em mucosas, embora com menor predominância que a IgT (XU et al., 2013). Sua concentração no soro aumenta em resposta a infecções parasitárias, demonstrando seu importante papel na resposta imune contra esses patógenos (ZHANG et al., 2010).

IgD: A imunoglobulina IgD é encontrada em baixas concentrações no soro de teleósteos, variando de 2 a 80 µg/mL (PARRA et al., 2016). Em trutas arco-íris, a concentração sérica específica é de 0,004 mg/mL (ZHANG et al., 2010). Além do soro, a IgD também está presente, em concentrações ainda menores, no muco de diferentes locais da mucosa, como as brânquias (XU et al., 2016).

A IgD é encontrada em duas formas: ligada à membrana de células B e secretada (PARRA et al., 2016). Células B IgD⁺ são encontradas tanto em tecidos linfóides sistêmicos quanto mucosos (EDHOLM et al., 2010; PERDIGUERO et al., 2019), e a IgD frequentemente é co-expressa com IgM nesses linfócitos (XU et al., 2016). Populações únicas de células B IgM⁻/IgD⁺ também foram identificadas em bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) e truta europeia (*Salmo trutta*) (EDHOLM et al., 2010; PERDIGUERO et al., 2019).

Estudos sugerem que essa imunoglobulina pode atuar como uma molécula de reconhecimento de padrões (PARRA et al., 2016; SUNYER, 2013) e participar da homeostase da microbiota (XU et al., 2016; PERDIGUERO et al., 2019). No bagre (*Ictalurus punctatus*), a IgD pode funcionar como um receptor de reconhecimento de padrões, pois sua forma secretada não possui uma região variável (SUNYER, 2013). Em contraste, a IgD secretada na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) possui uma região variável, indicando um possível papel no reconhecimento adaptativo de antígenos (SUNYER, 2013). Apesar de poder revestir parte da microbiota comensal em tecidos da mucosa, a participação da IgD nesse processo é significativamente menor do que a da IgT (YU et al., 2019). A IgD parece não estar envolvida na imunidade específica em brânquias e mucosa faríngea de trutas arco-íris durante infecções parasitárias (XU et al., 2016; KONG et al., 2019). Contudo, células B IgD⁺ IgM⁻ secretam IgD reativas à microbiota comensal no intestino e brânquias, mas não na pele de trutas europeias (*Oncorhynchus mykiss*), sugerindo um papel na homeostase da mucosa (PEDIGUERO et al., 2019).

Investigações sobre IgT/IgZ: A imunoglobulina IgT também conhecida como IgZ em algumas espécies, apresenta concentrações séricas que variam entre 0,004 mg/mL a 4 mg/mL em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (ZHANG et al., 2010; PARRA et al., 2016). No entanto, é nos tecidos mucosos que a IgT demonstra sua importância, com concentrações atingindo 7 mg/mL no intestino de trutas arco-íris (ZHANG et al., 2010). Outros locais da mucosa, como pele (0,31 mg/mL), brânquias (1,55 mg/mL), nasofaringe (1,7 mg/mL) e mucosa nasal e faríngea (3,46 mg/mL), também apresentam IgT, embora em concentrações menores (XU et al., 2016).

A localização predominante da IgT é em tecidos mucosos, com células B IgT⁺ sendo abundantes no intestino, brânquias, pele e nasofaringe (ZHANG et al., 2010; SAVAN et al., 2005; YU et al., 2020). Essa imunoglobulina é encontrada tanto na forma monomérica, com peso molecular de 180 kDa no soro, quanto na forma multimérica, com 4-5 monômeros associados não covalentemente no muco intestinal (ZHANG et al., 2010; SUNYER, 2013).

A IgT é considerada uma imunoglobulina especializada em imunidade de mucosa em teleostes, similar à IgA em mamíferos (ZHANG et al., 2010). Sua função principal é proteger a mucosa, revestindo a microbiota comensal e controlando a proliferação de patógenos (YU et al., 2020). A importância da IgT na homeostase da microbiota é evidente, pois sua depleção resulta em disbiose, proliferação de patógenos e danos aos tecidos (XU et al., 2020). Estudos demonstraram a capacidade da IgT em controlar o parasita

Ichthyophthirius multifiliis em brânquias de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (XU et al., 2016). A IgT também é alvo promissor para o desenvolvimento de vacinas em peixes, com a imunização oral induzindo respostas de IgT no intestino (BALLESTEROS et al., 2013; MAGADAN et al., 2019). Para exercer suas funções no lúmen intestinal, a IgT presente na mucosa da truta interage com um receptor de imunoglobulina polimérica, o que permite seu transporte para este local (SUNYER, 2013). Em resumo, a IgT é uma imunoglobulina fundamental para a imunidade de mucosa em teleósteos, desempenhando um papel vital na homeostase da microbiota e na defesa contra patógenos.

METODOLOGIA

A fim de realizar uma revisão abrangente das técnicas de purificação e isolamento das imunoglobulinas de peixes teleósteos, três buscas sistemáticas foram conduzidas, uma em três bases de dados científicas de destaque: PubMed, Science Direct e Google Scholar, usando as palavras chave "Isolamento imunoglobulina peixe" com o período de pesquisa abrangendo os artigos publicados de 1963 a fevereiro de 2024. Uma busca sistematizada na base de dados, Science Direct, usando a palavra chave "Teleost Complement Immunology", sem filtro de período de tempo mas com filtro para somente artigos de revisão. E outra busca sistematizada na base de dados Science Direct, usando a palavra chave, "Antibody teleost", sem filtro de período a fim de buscar referências relacionadas ao sistema imune em amplo aspecto. Os critérios de inclusão foram restritos a artigos de pesquisa originais com foco na purificação e isolamento de imunoglobulinas de peixes teleósteos. Artigos de revisão, estudos envolvendo espécies de peixes não teleósteos e pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais ou vacinas foram excluídos.

Após a seleção dos artigos, todos foram processados utilizando a ferramenta online [ilovepdf](#). Os pdf's foram convertidos em formatos legíveis por OCR (Reconhecimento Ótico de Caracteres). Etapa crucial para as ferramentas de IA generativa multimodal avançadas do Google lerem os dados dos pdf antigos.

Com os artigos em formato adequado (OCR), foram empregadas as ferramentas Gemini versão 1.5 PRO e gemini Advanced para agilizar a análise de dados e a geração de texto. Essas ferramentas sofisticadas de IA, atualmente acessíveis por assinatura (Gemini Advanced) e via plataforma de testes (Gemini versão 1.5 PRO), facilitaram a extração eficiente de informações pertinentes e a geração de rascunhos de texto iniciais para posterior comparação com o texto do autor e aprimoramento. Posteriormente, foi conduzido um rigoroso processo de revisão, para verificar meticulosamente a relação conteúdo referências.

A fim de fornecer uma visão abrangente dos métodos utilizados ao longo dos anos e das características das imunoglobulinas purificadas, os dados extraídos dos artigos selecionados pela palavra chave "Isolamento imunoglobulina peixe", foram compilados em duas tabelas (Tabelas 1 e 2), disponíveis como material suplementar.

A Tabela 1 organiza os estudos de acordo com a espécie de peixe teleósteo, classe de imunoglobulina purificada, material de origem (soro), método de purificação utilizado e referência científica original. Já a Tabela 2 detalha as características moleculares das imunoglobulinas purificadas, incluindo a massa molecular, tamanho das cadeias pesada e leve, estrutura da molécula e métodos de caracterização empregados (SDS-PAGE, Western Blot, Dot-Blot, ELISA, etc.). Ambas as tabelas estão organizadas cronologicamente, permitindo traçar a evolução histórica das técnicas e descobertas nesse campo de pesquisa.

Uma visão geral dos métodos comumente usados na purificação de anticorpos nos peixes teleósteos

Para facilitar a condução das pesquisas, vários métodos de purificação de anticorpos de soros de peixes já foram desenvolvidos e refinados ao longo dos anos. Abaixo temos os métodos, seus princípios fundamentais e suas aplicações históricas na pesquisa de imunologia dos peixes.

Os métodos de Precipitação:

Precipitação com sulfato de amônio: Essa é uma técnica clássica que se baseia na solubilidade diferencial das proteínas em concentrações variadas de sal. Ao aumentar gradualmente a concentração de sulfato de amônio, diferentes frações proteicas, incluindo as imunoglobulinas, precipitam-se a partir da solução (SOOD et al., 2007). Esse método é frequentemente utilizado como uma etapa inicial para a concentração de imunoglobulinas antes de purificações posteriores.

Precipitação com ácido caprílico: De forma semelhante à precipitação com sulfato de amônio, esse método utiliza o ácido caprílico para precipitar proteínas séricas que não sejam imunoglobulinas, deixando as imunoglobulinas no sobrenadante (ATANASSOV & BOTEV, 1988). Essa técnica é especialmente útil para espécies de peixes cujas imunoglobulinas sejam sensíveis a altas concentrações de sal.

Os métodos Cromatográficos:

Cromatografia de filtração em gel: Essa técnica separa proteínas com base no seu tamanho e forma. Uma coluna preenchida com grânulos porosos permite a penetração de moléculas menores com eluição posterior, enquanto moléculas maiores, como a IgM, são excluídas, sendo eluídas mais cedo (HAVARSTEIN et al., 1988). Esse método é frequentemente utilizado junto com outras técnicas para alcançar um grau maior de pureza.

Cromatografia de troca iônica: Esse método separa as proteínas de acordo com suas cargas. Proteínas com cargas diferentes se ligam à resina carregada com afinidades variadas e podem ser eluídas alterando-se o pH ou a concentração de sal da solução tampão (ROMBOUT et al., 1993). Essa técnica é particularmente útil para a separação de diferentes isotipos ou subtipos de imunoglobulinas com cargas variadas.

Cromatografia de afinidade: Essa é uma técnica altamente específica que se vale da afinidade de ligação de um anticorpo ao seu antígeno ou da ligação de uma imunoglobulina a um ligante específico. O ligante, como o antígeno, a Proteína A ou a proteína ligante de manana, é imobilizado em um suporte sólido. A imunoglobulina de interesse é seletivamente retida e posteriormente eluída (KOFOD et al., 1994). Esse método é amplamente empregado para a obtenção de preparações de imunoglobulinas altamente purificadas.

Outros Métodos

Imunoprecipitação: Essa técnica utiliza a ligação específica de um anticorpo ao seu antígeno para isolar o antígeno de uma mistura complexa. O anticorpo é imobilizado em um suporte sólido e o antígeno é retido de forma seletiva, sendo eluído posteriormente (ISRAELSSON et al., 1991). Esse método é frequentemente utilizado para isolar e caracterizar antígenos específicos reconhecidos por anticorpos de peixes.

Gel de eletroeluição: Essa técnica isola proteínas de géis de poliacrilamida após separação eletroforética. A banda de proteínas de interesse é retirada do gel e a proteína é eluída utilizando-se um campo elétrico (BABU et al., 2008). Esse método é útil para isolar pequenas quantidades de proteínas altamente purificadas.

A aplicação histórica dos métodos de purificação

Os primeiros estudos sobre as imunoglobulinas do soro dos peixes frequentemente baseavam-se na precipitação com sulfato de amônio e a cromatografia de filtração em gel para isolar e parcialmente caracterizar a IgM (MARCHALONIS, 1971; CISAR & FRYER, 1974).

À medida que a pesquisa avançou, a cromatografia de afinidade usando Proteína A ou antígenos específicos se tornou amplamente adotada na obtenção de preparações de IgM altamente purificadas (LOBB & CLEM, 1981; SCAPIGLIATI et al., 1996). Técnicas como a cromatografia de afinidade por proteína ligante de manana e a separação imunomagnética têm sido empregadas para isolar e caracterizar diferentes isotipos e subtipos de imunoglobulinas, assim como populações específicas de leucócitos (PETTERSEN et al., 1995; CROSBIE & NOWAK, 2002).

As vantagens e as desvantagens dos métodos

Cada método de purificação baseia-se em princípios específicos da bioquímica de proteínas. Métodos de precipitação exploram a solubilidade diferencial de proteínas em condições variadas de sal ou pH. Métodos cromatográficos separam proteínas com base em seu tamanho, carga ou afinidade de ligação a ligantes específicos. Outras técnicas, como a imunoprecipitação e gel de eletroeluição, utilizam a ligação específica de anticorpos com seus antígenos, ou a mobilidade eletroforética de proteínas para alcançar a purificação.

Cada método de purificação de anticorpos apresenta um conjunto único de vantagens e desvantagens que os pesquisadores devem considerar ao escolher a técnica mais apropriada para suas necessidades específicas (disposição de materiais, como soluções e colunas de afinidade e exclusão, em sua localidade para a realização das purificações). Essa resposta irá discutir os pontos positivos e negativos de vários métodos comumente usados em pesquisa de imunologia em peixes.

Precipitação com sulfato de amônio: Esse método é simples, barato e eficiente para concentrar imunoglobulinas em grandes volumes de soro (SOOD et al., 2007). Porém, esse método pode coprecipitar outras proteínas do soro, exigindo etapas adicionais de purificação para atingir alta pureza. Além disso, altas concentrações de sal podem potencialmente desnaturar ou alterar a estrutura de algumas imunoglobulinas.

Precipitação com ácido caprílico: Essa técnica é mais branda que a precipitação com sulfato de amônio e adequada para imunoglobulinas de peixe sensíveis a altas concentrações de sal (ATANASSOV & BOTEV, 1988). No entanto, pode não ser tão eficiente quanto a precipitação com sulfato de amônio na remoção de todas as proteínas contaminantes.

Cromatografia de filtração em gel: Esse método é brando e eficaz para separar proteínas com base no tamanho, tornando-o adequado para isolar imunoglobulinas intactas (HAVARSTEIN et al., 1988). Entretanto, pode ter uma resolução menor do que outras técnicas cromatográficas, potencialmente levando a picos sobrepostos e pureza reduzida.

Cromatografia de troca iônica: Essa técnica oferece alta resolução e é eficaz na separação de isotipos ou subtipos diferentes de imunoglobulinas com cargas variadas (ROMBOUT et al., 1993). Porém, essa metodologia demanda um ajuste fino e cuidadoso das condições do tampão para uma separação ideal e pode não ser adequada para todas as imunoglobulinas de peixes.

Cromatografia de afinidade: Esse método fornece a mais alta pureza e especificidade para o isolamento de imunoglobulinas (KOFOD et al., 1994). Entretanto, ele exige a disponibilidade de ligantes ou anticorpos específicos, que podem não estar prontamente disponíveis para todas as espécies de peixes. Adicionalmente, o custo de resinas de afinidade pode ser relativamente alto.

Outros métodos

Imunoprecipitação: Essa técnica é altamente específica para isolar e caracterizar antígenos reconhecidos por anticorpos de peixe (ISRAELSSON et al., 1991). No entanto, essa metodologia exige a disponibilidade de anticorpos específicos e pode não ser adequada para o isolamento de grandes quantidades de antígenos.

Gel de eletroeluição: Esse método é útil para isolar pequenas quantidades de proteínas altamente purificadas de géis de poliacrilamida (BABU et al., 2008). Porém, esse método consome tempo e pode não ser adequado para purificações em grande escala.

Considerações para a escolha do método

A escolha do método de purificação depende de vários fatores, incluindo a pureza desejada, o rendimento, e as aplicações posteriores das imunoglobulinas isoladas. Pesquisadores devem também considerar a disponibilidade de recursos, como anticorpos específicos ou resinas de afinidade, e o potencial impacto do processo de purificação na estrutura e função das imunoglobulinas, além dos objetivos de pesquisa específicos e dos recursos disponíveis.

Uso em Ciências Básicas

Entendendo as relações filogenéticas: O estudo da estrutura e função das imunoglobulinas em diferentes espécies de peixes, fornecem informações sobre a história evolutiva e a diversificação do sistema imune nos vertebrados (MARCHALONIS, 1971). Comparando sequências de genes de imunoglobulinas e estruturas de proteínas, os pesquisadores podem inferir relações filogenéticas e traçar os caminhos evolutivos de diferentes linhagens de peixes.

Elucidando o desenvolvimento do sistema imune: Investigar a ontogenia das imunoglobulinas em peixes nos ajuda a entender como o sistema imune se desenvolve e amadurece desde os estágios iniciais de vida até a fase adulta (FUDA et al., 1991). Esse conhecimento é crucial para determinar o momento ideal para a vacinação e outras intervenções imunomoduladoras.

Explorando mecanismos da resposta imune: Estudar as interações entre imunoglobulinas de peixe e os antígenos lança luz sobre os mecanismos de reconhecimento imunológico, produção de anticorpos e funções efetoras do sistema imune (MOCHIDA et al., 1994). Esse conhecimento é essencial para o entendimento sobre como os peixes se defendem contra patógenos e para o desenvolvimento de estratégias para o aprimoramento da resposta imune.

Uso em Ciências Aplicadas

Desenvolvimento de ferramentas de imunodiagnóstico: Imunoglobulinas de peixes purificadas são essenciais para a produção de anticorpos específicos e o desenvolvimento de imunoenaios, como ELISA e Western blotting, para detecção de patógenos e monitoramento das respostas imunes em peixes (SCAPIGLIATI et al., 1996). Essas ferramentas são cruciais para diagnóstico de doenças, desenvolvimento de vacinas e estudos epidemiológicos na aquicultura.

Desenvolvimento e avaliação de vacinas: O estudo da resposta imune humoral a antígenos específicos ajuda os pesquisadores a desenvolver e avaliar vacinas para peixes (CROSBIE & NOWAK, 2002). Analisando os títulos dos anticorpos e as especificidades, pesquisadores podem avaliar a eficácia das vacinas e otimizar os protocolos de vacinação para diferentes espécies de peixes e patógenos.

Imunoestimulação e imunomodulação: Compreender os mecanismos das respostas imunes dos peixes permite aos pesquisadores desenvolver imunoestimulantes e agentes imunomoduladores que podem aumentar a imunidade dos peixes e sua resistência a doenças (RAUTA et al., 2013). Essas intervenções podem ser ferramentas valiosas para melhorar a saúde dos peixes e reduzir perdas devido a doenças infecciosas na aquicultura.

Conservação de espécies de peixes em extinção: Estudar o *status* imunológico das populações de peixes em extinção pode fornecer informações valiosas para os esforços de conservação. Ao avaliar os níveis e especificidades de imunoglobulinas, os pesquisadores

podem identificar populações em risco de surtos de doenças e desenvolver estratégias para protegê-las (DAS et al., 2011).

O estudo das imunoglobulinas do soro dos peixes teleósteos tem amplas aplicações nas ciências básicas e aplicadas. Contribuindo para a nossa compreensão dos processos biológicos fundamentais, como a evolução, a imunidade, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento de aplicações práticas para a aquicultura, como na sanidade animal. Conforme a pesquisa em imunologia de peixes avança, podemos esperar progressos adicionais na nossa compreensão das imunoglobulinas e suas aplicações na promoção de peixes mais saudáveis nos cultivos dos piscicultores.

CONCLUSÃO

Ao longo desta revisão, realizamos uma jornada e pesquisa em imunoglobulinas de peixes teleósteos, desde as descobertas iniciais até as aplicações contemporâneas na aquicultura. A elucidação da estrutura, função e diversidade das imunoglobulinas de peixes tem sido fundamental para a nossa compreensão da complexa rede de defesa humoral que protege esses vertebrados aquáticos dos patógenos.

A otimização e o desenvolvimento contínuo de métodos de purificação de imunoglobulinas permanecem cruciais para o avanço da nossa compreensão da imunidade dos peixes. A busca por técnicas mais eficientes, sensíveis e específicas, capazes de isolar diferentes isotipos e subtipos de imunoglobulinas, abrirá novas portas para a investigação de suas funções distintas e interações complexas.

A aplicação do conhecimento adquirido sobre as imunoglobulinas de peixes tem implicações significativas para a saúde e sustentabilidade da aquicultura. O desenvolvimento de vacinas eficazes, imunoestimulantes e imunoterapias baseadas em imunoglobulinas tem o potencial de revolucionar o manejo de doenças na aquicultura, reduzindo a dependência de antibióticos e promovendo o bem-estar dos peixes. Além de servir como ferramentas valiosas para o monitoramento da saúde dos peixes, a detecção precoce de patógenos e a avaliação da eficácia das intervenções imunológicas.

Em última análise, a pesquisa em imunoglobulinas de peixes teleósteos não apenas aprofunda nossa compreensão da biologia fundamental desses organismos, mas também contribui para o desenvolvimento de soluções práticas para os desafios enfrentados pela aquicultura e pela conservação dos ecossistemas aquáticos. À medida que continuamos a desvendar os mistérios da imunidade humoral dos peixes, podemos esperar um futuro promissor para a saúde, o bem-estar e a sustentabilidade das populações de peixes em todo o mundo.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Espécie de peixe teleósteo	Classe de Ig purificada	Material usado (soro)	Método de purificação utilizado	Referência
<i>Neoceratodus forsteri</i>	Proteínas semelhantes às imunoglobulinas	Soro	Aplicação sequencial de eletroforese zonal em amido e filtração em gel em St-phadex G-200	MARCHALON IS, 1969
Paddle fish <i>Polyodon spathula</i> Gar fish <i>Lepiosteus osseus</i>	-	-	Extração com clorofórmio e metanol, cromatografia de troca iônica e filtração em gel (Sephadex G-200)	ACTON <i>et al.</i> , 1970
Paddle fish <i>Polyodon spathula</i>	Macroglobulinas	Soro	DEAE-Sephadex Sephadex G-200	ACTON <i>et al.</i> , 1971
<i>Ictalurus punctatus</i> <i>Lepisosteus osseus</i> <i>Polyodon spathula</i>	Macroglobulinas do tipo IgM	Soro	Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex (A-50) Filtração em gel em Sephadex G-200 Filtração em gel em Sepharose 6B	ACTON <i>et al.</i> , 1971
Coho salmon <i>Oncorhynchus kisutch</i>	Macroglobulina 17S composta por quatro subunidades do tipo IgM	Soro	Sephadex G-200	CISAR and FRYER, 1974
Gold fish <i>Carassius auratus</i>	IgM	Soro	-	WARR and MARCHALON IS, 1977
Pacific hagfish <i>Eptatretus stouti</i>	Semelhante à IgM	Soro	Sephacryl S-200 Sephadex G-200 Cromatografia de troca iônica	RAISON <i>et al.</i> , 1978
Ratfish <i>Callorhynchus callorhynchus</i>	IgM	Soro	Sepharose 6B Sephadex G-200	CLERX <i>et al.</i> , 1980
Pike <i>Esox lucius</i>	IgM	Soro	Sephadex G-200 Sephacryl S-200 Sepharese 6B-CL	SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 1980
Catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	Semelhante à IgM	Soro	Cromatografia de troca aniônica Cromatografia de filtração em gel	LOBB and CLEM, 1982

Chun salmon <i>Oncorhynchus keta</i>	IgM	Soro	Cromatografia de troca iônica DEAE-cellulose Sephadex 6B Sephadex G-200	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1982
Brown bull head <i>Ictalurus nebulosus</i>	-	Soro	Sephadex G-200	ISELL and PAULEY, 1983
Carp Goldfish Tench (consta apenas o nome genérico)	-	Soro	DNP-lysine-Sepharose AH-Sepharose 4B-carbodiimid-penicillin-G-sodium Sephadex G-25	WETZEL and CHARLEMAGNE, 1985
Hagfish <i>Eptatretus burgeri</i>	-	Soro	Sephadex G-200	TOMONAGA and HAGIWARA, 1985
Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	IgM	Soro	Sephadex 6B DEAE-Sepharcel	PHILLIPS and OURTH, 1986
Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	Coefficiente de sedimentação 14S (Proteína 14S) Coefficiente de sedimentação 7S (Proteína 7S)	Soro	Sephadex G-200	OURTH, 1986
Carp <i>Cyprinus carpio</i>	Semelhante à IgM	Soro	LKB Ultragel Sephadex 6B	ATANASSOV and BOTEV, 1988
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	IgM	Soro	Sistema cromatográfico FPLC Superose 6 Coluna de troca aniônica Mono Q Sephacryl S-200	HÅVARSTEIN <i>et al.</i> , 1988
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	Soro	Cromatografia de afinidade Sephadex 4B S-300	SÁNCHEZ and DOMÍNGUEZ, 1991
Cod <i>Gadus morhua</i>	IgM	Soro	Sephacryl S-300 HR Sephacryl S-400 HR	PILSTRÖM and PETERSSON, 1991)
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	Soro	Sephadex 4B S-300	SÁNCHEZ and DOMÍNGUEZ, 1991
Masu salmon <i>Oncorhynchus masou</i>	IgM	Soro	Sulfato de amônio DEAE Celulose (DE-52, Whatman)	FUDA <i>et al.</i> , 1991
Atlantic cod <i>Gadus morhua</i>	IgM	Soro	Sephadex	ISRAELSON <i>et al.</i> , 1991

Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	IgM	Soro	DEAE-Sephacel Sephacel 6B	OURTH <i>et. al.</i> , 1991
Rainbow trout	IgM	Soro	Sephacel com Proteína A	OLESEN <i>et. al.</i> , 1991
Salmo salar	IgM	Soro	CM Affi Gel Blue (Bio-Rad Laboratories) Sulfato de Amônio Sephacryl S-300	MAGNADOTT IR and GUDMUNDSD OTTIR, 1992
Chum salmon <i>Oncorhynchus keta</i>	IgM	Soro	Sephacel 6B Sephacel 4B	FUDA, Hirotoshi <i>et al.</i> , 1992
European perch <i>Perca fluviatilis</i>	Ig	Soro	Sephacel 4B ativada com brometo de cianogênio Coluna de troca iônica DEAE-Sephacel CL-6B	WHITTINGTO, 1993
Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	IgM	Soro	Sulfato de Amônio DEAE-Cellulose Sephacryl S-300 Coluna C26/100	ROMBOUT <i>et al.</i> , 1993
<i>Oreochromis aureus</i>	IgM	Soro	Sephacel com Proteína A CL-4B Sephacryl S-300	SMITH <i>et al.</i> , 1993)
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	IgM	Soro	Sephacel 4B MemSep®1010 Proteína A	ESTÉVEZ <i>et al.</i> , 1993
Turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	Semelhante à IgM	Soro	S-400 S-300	KOFOD <i>et al.</i> , 1994
Tilápia <i>Oreochromis niloticus</i>	IgM	Soro	Sephacel 4B DEAE-Sephacel	MOCHIDA <i>et al.</i> , 1994
Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	IgM	Soro	Sulfato de Amônio DEAE-Toyopearl 650S Toyopearl HW 65 Sephacel com Proteína A CL-4B Sephacel 4B ativada com brometo de cianogênio	SUZUKI <i>et al.</i> , 1994
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	IgM	Soro	Coluna Superose 6 Coluna de troca aniônica Mono Q Coluna HiTrap Proteína G	PETTERSEN <i>et al.</i> , 1995

Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	IgM	Soro	Filtração em gel e troca aniônica da Pharmacia (sem nomes de colunas)	MELINGEN <i>et al.</i> , 1995
Seabass <i>Dicentrarchus labrax</i>	Semelhante à IgM	Soro	Superose 6PG Superose 6B	BOURMAUD <i>et al.</i> , 1995
Seabass <i>Dicentrarchus labrax</i>	IgM	Soro	Sephacryl 4B com Proteína A	SCAPIGLIATI <i>et al.</i> , 1996
Sturgeon <i>Acipenser transmontanus</i>	IgM	Soro	Sulfato de Amônio DEAE Sepharose Coluna Sephacryl S-300 superfina Sephacryl 6B-100	ADKISON <i>et al.</i> , 1996
Flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	IgM	Soro	Sephacryl S-300 Coluna de hidroxiapatita	BANG <i>et al.</i> , 1996
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	IgM	Soro	Coluna Superose 6 (HR10/30, Pharmacia)	MAGNAD <i>et al.</i> , 1996
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ig	Soro	Matriz cromatográfica de troca iônica Sephacryl S-200 HR (resina ABx)	SZALAI <i>et al.</i> , 1996
Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	Ig	Soro	Cromatografia de afinidade com anticorpo anti-BSA	BRYANT <i>et al.</i> , 1999
<i>Oreochromis mossambicus</i>	IgM	Soro	Sephacryl CL 6-B DEAE-Sephacel	RAJAVARTHIN I <i>et al.</i> , 2000
Bluefin tuna <i>Thunnus maccoyii castelnau</i>	Ig	Soro	Sephacryl HR 300	WATTS <i>et al.</i> , 2001
Snapper <i>Pagrus auratus</i>	Ig	Soro	Kit de cromatografia de afinidade com Proteína A, affi-gel, acoplado a esferas de agarose	MORRISON and NOWAK, 2001
<i>Brevoortia patronus</i>	Semelhante à IgM	Soro	Sephacryl-400	SHELBY <i>et al.</i> , 2002
Barramundi <i>Lates calcarifer blonch</i>	Ig	Soro	Proteína A Sepharose S-300	CROSBIE and NOWAK, 2002
Carp <i>Cyprinus carpio l.</i>	Ig	Soro	Esferas de agarose acopladas à Proteína A ou Proteína G	CHOI <i>et al.</i> , 2002

<i>Trematomus bernacchii</i> <i>Trematomus pennellii</i> <i>Trematomus newnesi</i> <i>Gymnodraco acuticeps</i> <i>Anarhichas minor</i>	IgM	Soro	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (FPLC) em uma coluna Bio-Prep SE-1000/17	PUCCI <i>et. al.</i> , 2003
Flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	Ig	Soro	IgG-Sepharose 4B	BROMAGE <i>et al.</i> , 2004
STRIPED BASS <i>MORONE SAXATILIS</i> BARRAMUNDI <i>LATES CALCARIFER</i> MOZAMBIQUE TILAPIA <i>OREOCHROMIS MOSSAMBICUS</i> NILE TILAPIA <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> ATLANTIC SALMON <i>SALMO SALAR</i> RAINBOW TROUT <i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>	IgM	Soro	Sephacryl S300	BEELEN <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (L.)	Ig	Soro	Coluna Poly-Prep Econo-Pac com gel azul DEAE Affi-Gel	JANG <i>et al.</i> , 2004
Gouper fish <i>Epinephelus coioides</i>	Ig	Soro	Coluna de Sepharose A	SHIN <i>et al.</i> , 2006
Black rockfish <i>Sebastes schlegeli</i> higendorf	Ig	Soro	Troca Aniônica com Proteína A e IgG de Cabra	(NAKAMURA <i>et al.</i> , 2006)
<i>Neoditrema ransonneti</i>	IgM	Soro	Sephacryl S300 16/60 Sistema HR Bio Logic (Bio-Rad, EUA) Ultrafiltração (Ultra-free Bio-Max 100k, Millipore, EUA) Superose 6HR 10/30	CHENG <i>et al.</i> , 2006

<i>Cyprinus carpio</i> l.	Ig	Soro	Sephacryl S300	VESELY <i>et al.</i> , 2006
<i>Clarias gariepinus</i>	Ig	Soro	Sephacryl S300 Coluna Hitrap para dessalinização	RATHORE <i>et al.</i> , 2006
<i>Cyprinus carpio</i>	Ig	Soro	BSA-CL agarose	SOOD <i>et al.</i> , 2007
<i>Clarias gariepinus</i> (burchell, 1822)	Ig	Soro	BSA-CL agarose	LI <i>et al.</i> , 2007
Bloch <i>Channa striatus</i>	Ig	Soro	BSA-CL agarose	SOOD <i>et. al.</i> , 2008
Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	IgM	Soro	Sepharose 4B ligada à BSA	CHOUDHURY and PANI, 2011
Bloch <i>Channa striata</i>	Ig	Soro	-	RAUTA <i>et al.</i> , 2013
Olive barb <i>Puntius sarana</i>	IgM	Soro	BSA-Sepharose 4B	DAS <i>et al.</i> , 2014
Silver catfish <i>rhamdia quelen</i>	Semelhante à IgM	Soro	Sepharose 4B ativada com CNBr e cruz-ligada com BSA para a purificação de IgM	KREUTZ <i>et al.</i> , 2016)
Pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	IgM	Soro	Coluna de afinidade para proteína de ligação à manose (MBP)	FARIAS <i>et al.</i> , 2018
Siberian sturgeons <i>Acipenser baerii</i> <i>Acipenser stellatus</i>	Ig	Soro	-	YEKTASERES HT <i>et. al.</i> , 2018
<i>Clarias gariepinus</i> (burchell, 1822)	IgM	Soro	Coluna de matriz trocadora de ânions QAE-Sephadex A-50 Coluna de Ultrogel AcA34 Agarose ativada com CNBr Coluna de agarose com Proteína A	VERMA <i>et. al.</i> , 2018
Striped catfish <i>Pangasius hypophthalmus</i>	Ig	Soro	Esferas de agarose com anti-IgG de camundongo em uma coluna de vidro	GALAGARZA <i>et al.</i> , 2019
Giant grouper <i>Epinephelus lanceolatus</i>	Ig	Soro	Coluna com esferas absorventes de Proteína A MabDirect HiPrep 16/60 pré-equilibrado Coluna Sephadryl S-200 HR	LI <i>et al.</i> , 2021
Indian major carp <i>Cirrhinus mrigala</i>	IgM	Soro	Coluna de agarose BSA-CL	KHANDIGE <i>et al.</i> , 2022

Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	IgM	Soro	Sephadex G-200	DIAS <i>et. al.</i> , 2023
---	-----	------	----------------	-------------------------------

Tabela 1. Classe de anticorpo purificado de diferentes espécies de peixes teleósteos; Ig= Imunoglobulina. A purificação foi realizada com soro obtido de diversas espécies de peixes teleósteos. Os métodos de purificação e referências de cada trabalho.

Espécie	Classe de Ig purificada	Massa molecular (kDa)	Cadeia pesada / Cadeia leve (kDa)	Estrutura	Caracterização SDS-PAGE/ WB/Sequenciamento	Referência
<i>Neoceratodus forsteri</i>	Proteínas semelhantes a imunoglobulinas 19.4S 5.9S	-	Immunoglobulin light chains (23kD) immunoglobulin heavy chains (70kD)	-	SDS-PAGE	MARCHALONIS, 1969
Paddle fish <i>Polyodon spathula</i> Gar fish <i>Lepisosteus osseus</i>	-	Paddle fish 630 kD Gar fish 600 kD	Paddle fish H= 72 kD L= 23 kD Gar fish H= 72 kD L= 23 kD	-	-	ACTON <i>et al.</i> , 1970
Paddle fish <i>Polyodon spathula</i>	Macroglobulina	662 kD	H= 58,1 kD L= 22 kD	-	-	ACTON <i>et al.</i> , 1971
<i>Ictalurus punctatus</i> <i>Lepisosteus osseus</i> <i>Polyodon spathula</i>	Macroglobulinas do tipo IgM	600-630 kD	H= 70 kD L= 23 kD	-	-	ACTON <i>et al.</i> , 1971
Coho salmon <i>Oncorhynchus kisutch</i>	Macroglobulina 17S composta por quatro subunidades do tipo IgM	189 kD	H= 75 kD L= 26 kD	-	-	CISAR and FRYER, 1974
Gold fish <i>Carassius auratus</i>	IgM	-	H= 84 kD L= 74 kD	-	SDS-PAGE	WARR and MARCHALONIS, 1977
Pacific hagfish <i>Eptatretus stouti</i>	Semelhante à IgM	Immunoglobulin 160 kD	-	-	SDS-PAGE	(RAISON <i>et al.</i> , 1978)
Ratfish <i>Callorhynchus callorhynchus</i>	Semelhante à IgM	960 kD	H= 71,2 kD L= 23 kD	Pentamérico	SDS-PAGE AU-PAGE (Alkaline Urea) SDS-DATD-PAGE	CLERX <i>et al.</i> , 1980
Pike <i>Esox lucius</i>	IgM	651-638 kD	H= 72-70 kD L= 22,5 kD	-	SDS-PAGE	SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 1980
Catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	Semelhante à IgM	720 kD	H= 70 kD L= 25 kD	Tetramérico	-	LOBB and CLEM, 1982
Chun salmon <i>Oncorhynchus keta</i>	IgM	730 kD 560 kD 360 kD 190 kD	H= 72 kD L= 23 kD	Tetramérico	SDS-PAGE AU-PAGE	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1982
Brown bull head <i>Ictalurus nebulosus</i>	-	600-584 kD	H= 50,5 kD	-	-	ISELL and PAULEY, 1983

			L= 22,5 kD			
Carp Goldfish Tench (consta apenas o nome genérico)	-	-	-	-	SDS-PAGE	WETZEL and CHARLEMA GNE, 1985
hagfish <i>eptatretus burgeri</i>	-	160-150 kD 160-90 kD	H= 68 kD L= 25-22 kD	-	SDS-PAGE	TOMONAGA and HAGIWARA, 1985
Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	Semelhante à IgM	775 kD	-	-	-	PHILLIPS and OURTH, 1986
Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	Coefficiente de sedimentação 14S (Proteína 14S) Coefficiente de sedimentação 7S (Proteína 7S)	775 kD	H= 72 kD L= 23 kD	Tetramérico	SDS-PAGE	OURTH, 1986
Carp <i>Cyprinus carpio</i>	Semelhante à IgM	669 kD	-	-	-	ATANASSOV and BOTEV, 1988
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	Semelhante à IgM	~800 kD	H= 72 kD L= 27 kD	-	SDS-PAGE	HÅVARSTEI N <i>et al.</i> , 1988
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	540 kD 360 kD 180 kD	-	Tetramérico Dimérico Monomérico	SDS-PAGE	SÁNCHEZ and DOMÍNGUEZ , 1991
Cod <i>Gadus morhua</i>	IgM	821-882 kD	H= 81 kD L= 27,5 kD	Tetramérico	SDS-PAGE, Western Blot	PILSTRÖM and PETERSSON, 1991
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	700 kD 540 kD 360 kD 180 kD	H= 58 kD L= 26 kD L= 24 kD	Tetramérico	SDS-PAGE, Sequenciamento	SÁNCHEZ and DOMÍNGUEZ , 1991
Masu salmon <i>Oncorhynchus masou</i>	IgM	-	-	-	-	(FUDA <i>et al.</i> , 1991)
Atlantic cod <i>Gadus morhua</i>	IgM	-	-	-	SDS-PAGE	ISRAELSON <i>et al.</i> , 1991
Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	IgM	-	-	-	SDS-PAGE, Western Blot	OURTH <i>et. al.</i> , 1991
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	IgM	-	-	-	-	OLESEN <i>et. al.</i> , 1991
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	IgM	-	-	Tetramérico	SDS-PAGE	MAGNADOT TIR and GUDMUNDS DOTTIR, 1992
Chum salmon <i>Oncorhynchus keta</i>	Semelhante à IgM	494 kD 150 kD	H= 61 and 51,5 kD	Tetramérico Monomérico	SDS-PAGE, Sequenciamento	FUDA <i>et al.</i> , 1992

			L= 13			
European perch <i>Perca fluviatilis</i>	Ig	800-730 600 390 255-210 220 185 150	H= 72 L= 30-27 L= 28	Tetramérico Trimérico Dimérico Monomérico	SDS-PAGE	WHITTINGT O, 1993
Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	IgM	760 kD 380 kD 190 kD	H= 70 kD L= 25 kD	Tetramérico Dimérico Monomérico	SDS-PAGE, Western Blot	ROMBOUT <i>et al.</i> , 1993
<i>Oreochromis aureus</i>	Semelhante à IgM	788-780 kD	H= 77 kD L= 21,5 and 20,5 kD	-	SDS-PAGE	SMITH <i>et al.</i> , 1993
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	IgM	900 kD 160 kD	H= 70 kD L= 25 kD	Tetramérico Monomérico	SDS-PAGE	ESTÉVEZ <i>et al.</i> , 1993
Turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	Semelhante à IgM	900-800 kD 500-400 kD	H= 79 kD L= 29 and 27 kD 97 kD and 57 kD are Unknow proteins (Secretory or Complement-related factor?)	Tetramérico Dimérico	SDS-PAGE, Western Blot	KOFOD <i>et al.</i> , 1994
Tilápia <i>Oreochromis niloticus</i>	IgM	760 kD	-	-	SDS-PAGE, Western Blot	MOCHIDA <i>et al.</i> , 1994
Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	IgM	500-300 kD (egg)	H= 75 kD (serum) H= 68 kD (egg)	-	SDS-PAGE, Western Blot	SUZUKI <i>et al.</i> , 1994
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	IgM	-	H= 80 kD	-	SDS-PAGE, ELISA, WESTERN BLOTTING	PETTERSEN <i>et al.</i> , 1995
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	IgM	-	-	-	-	MELINGEN <i>et al.</i> , 1995
Seabass <i>Dicentrarchus labrax</i>	Semelhante à IgM	883 kD	-	-	SDS-PAGE	BOURMAUD <i>et al.</i> , 1995
Seabass <i>Dicentrarchus labrax</i>	IgM	800 kD	H= 78 kD L= 27 kD	Tetramérico	SDS-PAGE, Western Blot	SCAPIGLIATI <i>et al.</i> , 1996
Sturgeon <i>Acipenser transmontanus</i>	IgM	850-870 kD 170 kD 30 kD	H= 73 kD L= 30-27 kD	Tetramérico Monomérico	SDS-PAGE, Western Blot	ADKISON <i>et al.</i> , 1996
Flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	IgM	720 kD 540/360 kD 230 kD	H= 69 and 68 kD L= 24 and 22 kD L= 26 and 22 kD	Tetramérico Trimérico ou Dimérico	SDS-PAGE, Western Blot	BANG <i>et al.</i> , 1996

Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	IgM	-	H=72 kD L= 26,5 kD	-	SDS-PAGE	MAGNAD <i>et al.</i> , 1996)
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ig	200 kD 70 kD 40 kD	H= 78 kD L= 32,3 kD L= 27,5 kD	-	SDS-PAGE, Western Blot	(SZALAI <i>et al.</i> , 1996)
Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	Ig	768 kD 210 kD	H= 70 kD L= 27 kD	Tetramérico Monomérico	SDS-PAGE, Sequenciamento	BRYANT <i>et al.</i> , 1999
<i>Oreochromis mossambicus</i>	IgM	900 kD	H= 90 kD L= 30 kD	-	SDS-PAGE	RAJAVARTHI NI <i>et al.</i> , 2000
Bluefin tuna <i>Thunnus maccoyii castelnaui</i>	Ig	845 kD 778 kD 180 kD 168 kD	H= 71,2 kD H= 74,6 kD L= 28 kD L= 29 kD	Tetramérico Monomérico	SDS-PAGE	WATTS, <i>et al.</i> , 2001
Snapper <i>Pagrus auratus</i>	Ig	880 kD 575 kD 250 kD	H= 71,8 kD H= 67,7 kD L= 30,2 kD L= 29 kD	-	SDS-PAGE	MORRISON and NOWAK, 2001
<i>Brevoortia patronus</i>	Semelhante à IgM	850 kD	H= 76 kD L= 27 kD	-	SDS-PAGE, Western Blot	SHELBY <i>et al.</i> , 2002
Barramundi <i>Lates calcarifer blonch</i>	Ig	929 kD	H= 86 L= 24 kD	Tetramérico	SDS-PAGE, ELISA	CROSBIE and NOWAK, 2002
Carp <i>Cyprinus carpio l.</i>	IgG	220 kD	H= 82 kD H= 50 kD L= 25 kD	-	SDS-PAGE, ELISA	CHOI <i>et al.</i> , 2002
<i>Trematomus bernacchii</i> <i>Trematomus pennellii</i> <i>Trematomus newnesi</i> <i>Gymnodraco acuticeps</i> <i>Anarhichas minor</i>	IgM	830 400 200	H= 79 H= 76 H= 74 L= 25	Tetramérico Dimérico Monomérico	SDS-PAGE, IMUNOBLOTTING, ELISA	PUCCI <i>et al.</i> , 2003
Flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	Ig	-	H= 77 H= 72 L= 28 L= 26	-	SDS-PAGE, Western Blot	BROMAGE <i>et al.</i> , 2004

STRIPED BASS <i>MORONE SAXATILIS</i> BARRAMUNDI <i>LATES CALCARIFER</i> MOZAMBIQUE TILAPIA <i>OREOCHROMIS MOSSAMBICUS</i> NILE TILAPIA <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> ATLANTIC SALMON <i>SALMO SALAR</i> RAINBOW TROUT <i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>	Ig	<i>Oreochromis mossambicus</i> 800 700 600 400 200 <i>Lates calcarifer</i> 800 600 500 400 200 <i>MORONE SAXATILIS</i> 800 600 400 200 <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> 800 700 600 400 200 <i>SALMO SALAR</i> 800 600 500 400 200	H= 95 H= 85 H= 75 L= 25	Tetramérico Trimérico Dimérico Monomérico	SDS-PAGE	BEELEN <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (l.)	Ig	780	H= 70 kD L= 27 kD	-	SDS-PAGE, ELISA, WESTERN BLOTTING	JANG <i>et al.</i> , 2004
Gouper fish <i>Epinephelus coioides</i>	Ig	-	H= 78 kD L= 27 kD	-	SDS-PAGE	SHIN <i>et al.</i> , 2006
Black rockfish <i>Sebastes schlegeli</i> higendorf	Ig	-	H= 70 kD L= 25 kD H (?)= 97kD L (?)= 23kD	-	SDS-PAGE	NAKAMURA <i>et al.</i> , 2006
<i>Neoditrema ransonneti</i>	IgM	820 kD	H= 82 kD L= 24 kD	-	SDS-PAGE WESTERN BLOTTING	CHENG <i>et al.</i> , 2006
<i>Cyprinus carpio</i> l.	Ig	-	H= 70 kD L= 25 kD	-	SDS-PAGE, ELISA, WESTERN BLOTTING	VESELY <i>et al.</i> , 2006
<i>Clarias gariepinus</i>	Semelhante à IgM	840 kD 204 kD	H= 74,8 kD L= 27,2 kD	Tetramérico Monomérico	SDS-PAGE	RATHORE <i>et al.</i> , 2006
<i>Cyprinus carpio</i>	Ig	820 kD 198 kD	H= 73,7 kD L= 25,3 kD	Tetramérico Monomérico	SDS-PAGE	SOOD <i>et al.</i> , 2007

<i>Clarias gariepinus</i> (burchell, 1822)	Ig	840 kD	H= 74,8 kD L= 27,2 kD	-	SDS-PAGE	LI <i>et al.</i> , 2007
Bloch <i>Channa striatus</i>	Ig	820 kD 191 kD	H= 70,4 kD L= 25,3 kD	Tetramérico Monomérico	SDS-PAGE	SOOD <i>et al.</i> , 2008
Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	Semelhante à IgM	896 kD 860 kD 420 kD 205 kD	H= 83 kD L= 27 kD	Tetramérico Dimérico Monomérico	SDS-PAGE	CHOUDHUR Y and PANI, 2011
Bloch <i>Channa striata</i>	Ig	896	H= 72 kD L= 27 kD	-	SDS-PAGE, ELISA	RAUTA <i>et al.</i> , 2013
Olive barb <i>Puntius sarana</i>	IgM	879	H= 88 kD L= 26 kD	-	SDS-PAGE, Western Blot	DAS <i>et al.</i> , 2014
Silver catfish <i>rhamdia quelen</i>	Semelhante à IgM	-	H= 75 kD L= 28 kD	-	SDS-PAGE, ELISA, WESTERN BLOTTING, DOT BLOT	KREUTZ <i>et al.</i> , 2016
Pacu <i>Piaractus</i> <i>mesopotamicus</i>	IgM	-	H= 72 kD L= 26 kD	-	SDS-PAGE, ELISA, WESTERN BLOTTING	FARIAS <i>et al.</i> , 2018
Siberian sturgeons <i>Acipenser baerii</i> <i>Acipenser stellatus</i>	Ig	-	H= 70 kD L= 27 kD L= 27,5 kD (BAERI STELLATUS)	-	SDS-PAGE	YEKTASERE SHT <i>et al.</i> , 2018
<i>Clarias gariepinus</i> (burchell, 1822)	IgM	890	H= 74,5 kD L= 30,5 kD L= 29,5 kD	-	SDS-PAGE, WESTERN BLOTTING, DOT-BLOT	VERMA <i>et al.</i> , 2018
Striped catfish <i>Pangasius</i> <i>hypophthalmus</i>	Ig	760	H= 70 kD L= 25 kD	Tetramérico	SDS-PAGE, ELISA	GALAGARZA <i>et al.</i> , 2019
Giant grouper <i>Epinephelus</i> <i>lanceolatus</i>	Ig	-	H= 80 H= 40 L= 25 L= 30	-	SDS-PAGE	LI, A. <i>et al.</i> , 2021
Indian major carp <i>Cirrhinus mrigal</i>	IgM	900	H= 90 L= 30	Tetramérico	SDS-PAGE, ELISA, WESTERN BLOTTING	KHANDIGE <i>et al.</i> , 2022
Tilapia <i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>	IgM	850	H= 81 L= 40	Tetramérico	SDS-PAGE, ELISA	DIAS <i>et al.</i> , 2023

Tabela 2. Classe de anticorpo purificado de diferentes espécies de peixes teleósteos; Ig= Imunoglobulina. A massa molecular da(s) imunoglobulina(s) encontrada(s). A massa molecular das imunoglobulinas após o processo de redução das cadeias leves e pesadas. A conformação da imunoglobulina relatada. Métodos de análises das purificações encontradas nos estudos. E as referências dos trabalhos na última coluna.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, R. T.; WEINHEIMER, P. F.; DUPREE, H. K.; RUSSELL, T. R.; WOLCOTT, M.; EVANS, E. E.; SCHROHENLOHER, R. E.; BENNETT, J. C. Isolation and characterization of the immune macroglobulin from the paddlefish, *Polyodon spathula*. The journal of biological chemistry, [s. l.], v. 246, n. 22, p. 6760–6769, 1971.

ACTON, R. T.; WEINHEIMER, P. F.; HALL, S. J.; NIEDERMEIER, W.; CLAUDE BENNETT, E. S. A. Tetrameric Immune Macroglobulins in Three Orders of Bony Fishes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 107–111, 1971.

ACTON, R.; WEINHEIMER, P.; WOLCOTT, M.; EVANS, E. E.; BENNETT, J. Biological sciences: N-terminal sequences of immunoglobulin heavy and light chains from three species of lower vertebrates. Nature, [s. l.], v. 228, p. 991–992, 1970.

ADAMS, A.; THOMPSON, K. D. Development of monoclonal antibodies for application in fish disease diagnostics. Journal of Aquatic Animal Health, v. 7, n. 2, p. 120-132, 1995.

ADKISON, M. A.; BASURCO, B.; HEDRICK, R. P. Humoral immunoglobulins of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: partial characterization of and recognition with monoclonal antibodies. Developmental and comparative immunology, v. 20, n. 4, p. 285–298, 1 jul. 1996.

ATANASSOV, C.L.; BOTEV, B.A. Isolation and partial characterization of IgM-like immunoglobulins from the serum of carp (*Cyprinus carpio* L), frog (*Rana ridibunda* Pall.) and tortoise (*Testudo graeca* Pall). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, v. 89, n. 4, p. 737-741, 1988.

BABU, P.P.S.; SHANKAR, K.M.; HONNANANDA, B.R.; SWAMY, H.V.K.; SHAMA, K.; SURYANARAYANA, V.V.S.; DECHAMMA, H.J. Isolation and characterization of immunoglobulin of the Indian major carp, rohu [*Labeo rohita* (Ham.)]. Fish & Shellfish Immunology, v. 24, n. 6, p. 779-783, 2008.

BANG, J. D.; KIM, J. W.; LEE, S. D.; PARK, S. I.; CHUN, S. G.; JEONG, C. S.; PARK, J. W. Humoral immune response of flounder to *Edwardsiella tarda*: the presence of various sizes of immunoglobulins in flounder. Diseases of aquatic organisms, [s. l.], v. 26, p. 197–203, 1996.

BEELEN, R.; BEELEN, R.; BEELEN, R.; BOYD, B.; GARAVELLO, J. C.; PAVANELLI, G. C.; AINSWORTH, A. Generation, characterisation and applicability of a monoclonal antibody to hybrid surubim catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz) × *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus) immunoglobulin. Comparative clinical pathology, [s. l.], v. 12, p. 191–198, 2004.

BENGTEEN, E.; LEANDERSON, T.; PILSTRÖM, L. Immunoglobulin heavy chains of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: Evolutionary implications of two isotypes. European Journal of Immunology, v. 21, n. 12, p. 3011–3016, 1991.

BOSHRA, H., LI J., SUNYER J. O. Avanços recentes no sistema complemento de peixes teleósteos. Fish & Shellfish Immunology, 20(2), p. 239-262, 2006.

BOURMAUD, C.-F.; ROMESTAND, B.; BOUIX, G. Isolation and partial characterization of IgM-like seabass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) immunoglobulins. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands), v. 132, n. 1-2, p. 53–58, abr. 1995.

BROMAGE, E. S.; YE, J.; OWENS, L.; KAATTARI, I. M.; KAATTARI, S. L. Use of staphylococcal protein A in the analysis of teleost immunoglobulin structural diversity. Developmental and comparative immunology, [s. l.], v. 28, n. 7-8, p. 803–814, 2004.

BRYANT, M. S.; LEE, R. P.; LESTER, R. J.; WHITTINGTON, R. J. Anti-immunoglobulin antisera used in an ELISA to detect antibodies in barramundi *Lates calcarifer* to *Cryptocaryon irritans*. Diseases of aquatic organisms, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 21–28, 1999.

CAIN, K.; SWAN, C.; BOWDEN, L. Assessment of maternal transfer of immunity in rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology, v. 10, n. 4, p. 307–314, 2000.

CASTRO, R.; ABOS, B.; PIGNATELLI, J.; VON GERSDORFF JORGENSEN, L.; GONZALEZ GRANJA, A.; BUCHMANN, K.; TAFALLA, C. Comparative study of several affinity purification methods for the isolation of rainbow trout IgM. Fish & Shellfish Immunology, 35(4), p. 1005-1013, 2013.

CHENG, C.-A. et al. Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain. Veterinary immunology and immunopathology, v. 109, n. 3-4, p. 255–265, 15 fev. 2006.

CHOI, S.-H.; PARK, K.-H.; YOON, J.-M. Characterization of Carp (*Cyprinus carpio* L.) Immunoglobulin Structure. Asian-Australasian journal of animal sciences, v. 15, n. 2, p. 290–296, 1 jan. 2002.

CHOUDHURY, M.; PANI PRASAD, K. Isolation and characterization of immunoglobulin M of Asian sea bass, *Lates calcarifer* and its level in serum. Central European journal of biology, v. 6, p. 1064, 14 jan. 2011.

CISAR, J.O.; FRYER, J.L. Characterization of anti *Aeromonas salmonicida* antibodies from coho salmon. Infection and Immunity, v. 9, n. 2, p. 236-243, 1974.

CLEM, L. W.; MCLEAN, W. E. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. Immunology, v. 29, n. 4, p. 791–799, 1975.

CLEM, L. W.; SIGEL, M. M. Comparative immunochemical studies of proteins in sera of marine and freshwater fishes. Federation Proceedings, v. 22, p.1138-1144, 1963.

CLERX, J. P. et al. Isolation and characterization of the immunoglobulin of pike (*Esox lucius* L.). Veterinary immunology and immunopathology, v. 1, n. 2, p. 125–144, fev. 1980.

COSTA, O. T. F. DA; DIAS, L. C.; MALMANN, C. S. Y.; et al. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands), v. 499, p. 260–268, 2019.

CROSBIE, P.B.B.; NOWAK, B.F. Production of polyclonal antisera against barramundi (*Lates calcarifer* Bloch) serum immunoglobulin derived from affinity columns containing mannanbinding protein or staphylococcal protein A. Aquaculture, v. 211, n. 1-4, p. 49-63, 2002.

DANILOVA, N., BUSSMANN, B., JENTOFT, S., DANNEVIG, B. Isolamento de IgT do Salmão do Atlântico. Developmental and Comparative Immunology, 29(6), p. 497-505, 2005.

DAS, A. et al. Purification and molecular characterization of IgM in olive barb, *Puntius Sarana*. Journal of immunoassay & immunochemistry, v. 35, n. 3, p. 269–287, 2014.

DIAS, D. De C.; TACHIBANA, L.; BACH, E. E. Isolation and Characterization of the Immunoglobulin (IgM) from *Oreochromis niloticus* in Brazil. European Journal of Aquatic Sciences, v. 2, n. 1, p. 6–10, 30 jun. 2023.

ESTEVE-GASSENT, M. D.; NIELSEN, M. E.; AMARO, C. The kinetics of antibody production in mucosae of vaccinated trout and the influence of temperature. Fish & Shellfish Immunology, v. 54, p. 580-588, 2016.

ESTÉVEZ, J.; SÁNCHEZ, C.; DOMÍNGUEZ, J.; LEIRO, J.; SANMARTÍN, M. L.; UBEIRA, F. M. Protein-a binding characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunoglobulins. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 173–180, 1993.

ESTEVEZ, J.; LEIRO, J.; UBEIRA, F. M. Immunization of turbot, *Psetta maxima* (L.) with formalin-inactivated bacteria and evaluation of the efficacy against natural furunculosis. *Aquaculture*, v. 245, n. 1, p. 235-241, 2005.

FAHEY, J. L.; McKELVEY, E. M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *The Journal of Immunology*, v. 94, n. 1, p. 84-90, 1969.

FARIAS, T. H. V.; SILVA, K. R.; MARIGUELA, V.; MONTASSIER, H. J.; PILARSKI, F. Development of an indirect ELISA assay to evaluation of the adaptive immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 3327–3335, 2018.

FUDA, H.; HARA, A.; YAMAZAKI, F.; KOBAYASHI, K. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Developmental and comparative immunology*, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 415–423, 1992.

FUDA, H.; SOYANO, K.; YAMAZAKI, F.; HARA, A. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 637–643, 1991.

GALAGARZA, O. A. et al. Development of a polyclonal antibody for detection and sensitive quantification of immunoglobulin M-like antibody in *Pangasius hypophthalmus* plasma. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, v. 513, n. 734369, p. 734369, nov. 2019.

GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol. Immunol.*, 41, 1089–1098, (2004).

HÅVARSTEIN, L. S.; AASJORD, P. M.; NESS, S.; ENDRESEN, C. Purification and partial characterization of an IgM-like serum immunoglobulin from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental and comparative immunology*, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 773–785, 1988.

ISELL, G. L.; PAULEY, G. B. Characterization of immunoglobulins from the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) produced against a naturally occurring bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila*. *Developmental and comparative immunology*, Verão. 1983. v. 7, n. 3, p. 473–482.

ISRAELSON, O.; PETERSSON, A.; BENGTÉN, E.; WIERSMA, E. J.; ANDERSON, J.; GEZELIUS, G.; PILSTROM, L. Immunoglobulin concentration in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., serum and cross-reactivity between anti-cod-antibodies and immunoglobulins from other species. Journal of fish biology, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 265–278, 1991.

JANG, H.; WOO, J.-K.; CHO, Y.-H.; KYONG, S.-B.; CHOI, S.-H. Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of flounder (*Paralichthys olivaceus*) immunoglobulin. Journal of biochemistry and molecular biology, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 314–319, 2004.

KHANDIGE, P. S.; SHANKAR, K. M.; BABU, P. S.; SADANANDA, V.; GOWRISH, S. Isolation, production, and characterization of serum immunoglobulin M (IgM) of Indian major carp *Cirrhinus mrigala* (MRIGAL). Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences, [s. l.], v. 2022, p. 2339924, 2022.

KOBAYASHI, K.; HARA, A.; TAKANO, K.; HIRAI, H. Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Molecular immunology, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 95–103, 1982.

KOFOD, H.; PEDERSEN, K.; LARSEN, J. L.; BUCHMANN, K. Purification and characterization of IgM-like immunoglobulin from turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Acta veterinaria scandinavica, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 1–10, 1994.

KREUTZ, L. C.; CANOVA, R.; NIED, C. O.; BORTOLUZZI, M.; FRANDOLOSO, R. Characterization of an IgM-like immunoglobulin from silver catfish (*Rhamdia quelen*) serum and its use for the production of polyclonal antibodies and development of immunoassays. Pesquisa veterinaria brasileira [Brazilian journal of veterinary research], [s. l.], v. 36, n. 9, p. 819–825, 2016.

LI, A.; THWAITE, R.; KELLIE, S.; BARNES, A. Serum IgM heavy chain sub-isotypes and light chain variants revealed in giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) via protein A affinity purification, mass spectrometry and genome sequencing. Fish & shellfish immunology, [s. l.], v. 113, p. 42–50, 2021.

LI, Q.; ZHAN, W.; XING, J.; SHENG, X. Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish & shellfish immunology, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 982–990, 2007.

LOBB, C. J.; CLEM, L. W. Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. *Developmental and comparative immunology*, v. 6, n. 3, p. 473–479, 1 jun. 1982.

LOBB, C. J.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XII. Secretory immunoglobulins in the bile of the marine teleost *Archosargus probatocephalus*. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 5, n. 2, p. 271–282, 1981.

LOBB, C.J.; CLEM, L.W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function-X. Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 5, n. 2, p. 271-282, 1981.

LORENZEN, N.; KARAS, N. Detection of Antibodies Against Viral Hemorrhagic Septicaemia Virus in Rainbow Trout by a Monoclonal-Antibody-Based Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 11, n. 4, p. 321-327, 1999.

MAASEIDE, N.P.; GLETTE, J.; ENDRESEN, C.; WERGELAND, H.I. Monoclonal antibodies reactive with serum IgM and leukocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 5, n. 4, p. 275-287, 1995.

MAGNAD ÓTTIR, B. Ó. T.; KRISTJ ÁNSD ÓTTIR, H.; GUDMUNDSD ÓTTIR, S. Characterisation of monoclonal antibodies to separate epitopes on salmon IgM heavy chain. *Fish & shellfish immunology*, v. 6, n. 3, p. 185–198, 1 abr. 1996.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), p. 137-151, 2006.

MAGNADOTTIR, B.; GUDMUNDSDOTTIR, B. K. A comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 32, n. 1-2, p. 179–189, 1 abr. 1992.

MARCHALONIS, J. J. Isolation and characterization of immunoglobulin-like proteins of the Australian lungfish (*Neoceratodus forsteri*). *The Australian journal of experimental biology and medical science*, v. 47, n. 4, p. 405–419, 1 ago. 1969.

MARCHALONIS, J.J. Isolation and partial characterization of immunoglobulins of goldfish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology*, v. 20, n. 2, p. 161-173, 1971.

MELINGEN, G. O.; STEFANSSON, S. O.; BERG, A.; WERGELAND, H. I. Changes in serum protein and IgM concentration during molting and early post-smolt period in vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & shellfish immunology*, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 211–221, 1995.

MERLE, N.S., CHURCH, S.E., FREMEAUX-BACCHI, V., ROUMENINA, L.T. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.*, 6, 262, (2015)

MOCHIDA, K.; LOU, Y. H.; HARA, A.; YAMAUCHI, K. Physical biochemical properties of IgM from a teleost fish. *Immunology*, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 675–680, 1994.

MORRISON, R. N.; NOWAK, B. F. Affinity purification and partial characterisation of systemic immunoglobulin of the snapper (*Pagrus auratus*). *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), v. 201, n. 1-2, p. 1–17, set. 2001.

NAIK, U., HARRISON, R.E. Phagocytosis. In: Nabi (Ed.), *Building Blocks of the Cell*. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael, CA, pp. 1–118, (2013).

NAKAMURA, O.; KUDO, R.; AOKI, H.; WATANABE, T. IgM secretion and absorption in the materno-fetal interface of a viviparous teleost, *Neoditrema ransonneti* (Perciformes; Embiotocidae). *Developmental and comparative immunology*, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 493–502, 2006.

NAKAYASU, C., NAKAGAWA, H. A natureza molecular da amiloide A sérica em bagres do canal. *Fish & Shellfish Immunology*, 13, p. 465-471, 2002.

OLESEN, N. J.; LORENZEN, N.; JØRGENSEN, P. E. V. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50%PNT). *Diseases of aquatic organisms*, v. 10, p. 31–38, 1991.

OURTH, D. D. Purification and Quantitation of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Immunoglobulin M. *Zeitschrift für angewandte Ichthyologie* [Journal of applied ichthyology], p. 140–143, 1986.

OURTH, D. D.; RATTS, V. D.; PARKER, N. C. Bactericidal complement activity and concentrations of immunoglobulin M, transferrin, and protein at different ages of channel catfish. *Journal of aquatic animal health*, v. 3, n. 4, p. 274–280, dez. 1991.

PETTERSEN, F. E.; FYLLINGEN, I.; KAVLIE, A.; MAASEIDE, N. P.; GLETTE, J.; ENDRESEN, C.; WERGELAND, H. I. Monoclonal antibodies reactive with serum IgM and leukocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & shellfish immunology*, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 275–287, 1995.

PHILLIPS, J. O.; OURTH, D. D. Isolation and molecular weight determination of two immunoglobulin heavy chains in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, v. 85, n. 1, p. 49–54, 1986.

PILSTRÖM, L.; PETERSSON, A. Isolation and partial characterization of immunoglobulin from cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental and comparative immunology, Primavera*, v. 15, n. 3, p. 143–152, 1991.

POLLARA, B.; FINSTAD, J.; GOOD, R. A. The phylogenetic development of immunoglobulins. In: SOLOMON, J. B.; HORTON, J. D. (Eds.). *Developmental Immunobiology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., p. 3-10, 1977.

PUCCI, B.; COSCIA, M. R.; ORESTE, U. Characterization of serum immunoglobulin M of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, v. 135, n. 2, p. 349–357, jun. 2003.

RAISON, R. L.; HULL, C. J.; HILDEMAN, W. H. Characterization of immunoglobulin from the Pacific hagfish, a primitive vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 75, n. 11, p. 5679–5682, nov. 1978.

RAJAVARTHINI, P. B.; ARUNKUMAR, R. I.; MICHAEL, R. D. Partial characterization of serum immunoglobulins of *Oreochromis mossambicus*. *Indian journal of experimental biology*, v. 38, n. 6, p. 549–553, jun. 2000.

RATHORE, G.; SWAMINATHAN, T. R.; SOOD, N.; MISHRA, B. N.; KAPOOR, D. Affinity purification and partial characterization of IgM-like immunoglobulins of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Indian journal of experimental biology*, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 1018–1021, 2006.

RAUTA, P. R.; MOHANTY, J.; GARNAYAK, S. K.; SAHOO, P. K. Characterization of serum immunoglobulin in *channa striata* (BLOCH) and kinetics of its response to *Aeromonas hydrophila* antigen. *Journal of immunoassay & immunochemistry*, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 283–293, 2013.

ROMBOUT, J.H.W.M.; TAVERNE, N.; VAN DE KAMP, M.; TAVERNE-THIELE, A.J. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, v. 17, n. 4, p. 309-317, 1993.

SAAVEDRA, R., ANGULO, C. Purificação e quantificação de imunoglobulinas séricas em tilápia e truta arco-íris. *Imunologia*, 32, p. 16-22, 2013.

SALINAS, I.; PARRA, D. Fish immunoglobulins: Structure and function. In: KUMAR, V. (Ed.). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, p. 1-26, 2011.

SÁNCHEZ, C.; DOMÍNGUEZ, J. Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies. *Molecular immunology*, v. 28, n. 11, p. 1271–1277, 1 nov. 1991.

SÁNCHEZ, G. A.; GAJARDO, M. K.; IOANNES, A. D. IgM-like natural hemagglutinin from ratfish serum: isolation and physico-chemical characterization. (*Callorhynchus callorhynchus*). *Developmental and comparative immunology*, v. 4, n. 4, p. 667–678, 1980.

SARMA, J.V., WARD, P.A. The complement system. *Cell Tissue Res.*, 343, 227–235, (2011).

SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; PICCHIETTI, S.; MAZZINI, M.; MASTROLIA, L.; SCALIA, D.; ABELLI, L. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish & shellfish immunology*, [s. l.], v. 6, p. 383–401, 1996.

SCAPIGLIATI, G., CHAMANKHAH, M., PEDROTTI, D. Affinity chromatography purification of fish immunoglobulins. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 726(1-2), p. 39-46, 1999.

SHELBY, R. A.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Isolation, purification, and molecular weight determination of serum immunoglobulin from gulf menhaden: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to assess serum immunoglobulin concentrations from Atlantic menhaden. *Journal of aquatic animal health*, v. 14, n. 4, p. 254–262, dez. 2002.

SHIN, G.; LEE, H.; PALAKSHA, K. J.; KIM, Y.; LEE, E.; SHIN, Y.; LEE, E.; PARK, K.; JUNG, T. Production of monoclonal antibodies against serum immunoglobulins of black rockfish (*Sebastes schlegelii* Higendorf). *Journal of veterinary science*, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 293–295, 2006.

SMITH, S. A.; GEBHARD, D. H.; HOUSMAN, J. M.; LEVY, M. G.; NOGA, E. J. Isolation, purification, and molecular-weight determination of serum immunoglobulin from *Oreochromis aureus*. *Journal of aquatic animal health*, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 23–35, 1993.

SOLEM, S. T.; STENVIK, J. Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 57, p. 21–38, 2016.

SOOD, N.; RATHORE, G.; SWAMINATHAN, T.R.; ABIDI, R.; MISHRA, B.N.; LAKRA, W.S. Isolation and characterization of serum immunoglobulins of *Cyprinus carpio*. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 77, n. 7, p. 642–645, 2007.

SOOD, N.; SWAMINATHAN, T.; RATHORE, G. Purification and partial characterization of serum immunoglobulins of *Channa striatus* (Bloch). *Indian Journal of Fisheries*, v. 55, n. 3, p. 257–260, 2008.

SUZUKI, Y.; ORITO, M.; FURUKAWA, K.; AIDA, K. Existence of low molecular weight immunoglobulin M in carp eggs. *Fisheries science: FS*, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 159–162, 1994.

SWAMINATHAN, T.R.; RATHORE, G.; SOOD, N. Purification and partial characterization of serum immunoglobulins of *Channa striatus* (Bloch). *Indian Journal of Fisheries*, v. 55, n. 3, p. 257–260, 2008.

SZALAI, A. J.; BANOUB, J.; NAKHLA, N. A.; KEOUGH, K. M. W. An alternative procedure for isolation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, serum immunoglobulin. *Journal of applied aquaculture*, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 33–45, 1996.

THIELE, A.J. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, v. 17, n. 4, p. 309–317, 1993.

TOMONAGA, S.; HAGIWARA, K. Isolation and characterization of immunoglobulin of hagfish, *Eptatretus burgeri*, a primitive vertebrate. *Molecular immunology*, v. 22, n. 9, p. 1091–1097, 1 set. 1985

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10), p. 486–503, 2011.

VERMA, V. K.; SEHGAL, N.; PRAKASH, O. Isolation and characterization of immunoglobulin from African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 56, p. 402–410, 1 jun. 2018.

VESELY, T.; RESCHOVA, S.; POKOROVA, D.; HULOVA, J.; NEVORANKOVA, Z. Production of monoclonal antibodies against immunoglobulin heavy chain in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarni medicina*, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 296–302, 2006.

WARR, G. W.; HART, S.; MARCHALONIS, J. J. Colonization of the Elasmobranch spleen and thymus: an evolutionary series reflecting the emergence of the T cell lineage. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 15, p. 331–345, 1991.

WARR, G. W.; MARCHALONIS, J. J. Lymphocyte surface immunoglobulin of the goldfish differs from its serum counterpart. *Developmental and comparative immunology*, v. 1, n. 1, p. 15–22, , jan. 1977.

WATTS, M.; MUNDAY, B. L.; BURKE, C. M. Isolation and partial characterisation of immunoglobulin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* Castelnau. *Fish & shellfish immunology*, v. 11, n. 6, p. 491–503, ago. 2001.

WETZEL, M.; CHARLEMAGNE, J. Antibody diversity in fish. Isoelectrofocalisation study of individually-purified specific antibodies in three teleost fish species: tench, carp and goldfish. *Developmental and comparative immunology*, v. 9, n. 2, p. 261–270, 1 mar. 1985

WHITTINGTON, R. J. Purification and partial characterisation of serum immunoglobulin of the European perch (*Perca fluviatilis* L.). *Fish & shellfish immunology*, v. 3, n. 5, p. 331–343, set. 1993.

YEKTASERESHT, A.; HEMATI, Z.; GHOLAMHOSSEINI, A. Isolation and partial characterization of serum immunoglobuline in two species of sturgeons, Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and Stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*). *Marine science and technology bulletin*, v. 7, n. 1, p. 1–3, 30 jun. 2018.

CAPÍTULO II

Avaliação comparativa de diferentes métodos de obtenção de imunoglobulinas de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Rafael Luckwu de Sousa^{1,2}, Paula Ladeira Ortolani³, Maria Cristina dos Santos Sobreira de Sampaio e Consuelo Latorre Fortes Dias³

¹Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

²Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

³Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

INTRODUÇÃO

A espécie *Colossoma macropomum*

O tambaqui (*Colossoma macropomum*), um peixe teleósteo de grande porte (até 1 m e 30 kg) e ampla distribuição na América do Sul, é um dos representantes mais importantes da ordem Characiformes. Essa ordem, exclusiva de ambientes de água doce, apresenta sua maior diversidade na região Neotropical (NELSON et al., 2010; MALABARBA et al., 2014). O tambaqui, especificamente, é nativo das bacias Amazônica e Orinoco (GOULDING, 1980; GOULDING & CARVALHO, 1982; NOVOA et al., 1984; NOVOA, 1990) e pode ser encontrado também em outros países como Cuba e Panamá (REIS et al., 2003).

Devido ao seu tamanho e sabor, o tambaqui possui grande valor comercial, sendo a espécie nativa mais cultivada em vários estados do Brasil como, Rondônia e Roraima (PEIXE BR, 2024) desempenhando um papel crucial na economia de cidades como Manaus (ARAÚJO AND GOULDING, 1998). O potencial econômico de consumo para as espécies amazônicas regionais é forte, somente em uma feira, o Feirão do Pescado, em 2024, do Governo do Estado, que ocorreu nos dias 27 a 29 de Março de 2024, foram comercializadas 117 toneladas de peixes, movimentando 2,8 milhões segundo a Agência de Desenvolvimento Sustentável do Amazonas (ADS). Interessante notar que, apesar de ser uma única espécie, o tambaqui recebe diversos nomes populares ao longo de sua distribuição geográfica, como cachama na Venezuela e pacu na Bolívia (REIS et al., 2003).

A relevância econômica da espécie para o Brasil

Hoje, a maior produção de tambaqui encontra-se na região do Vale do Jamari (RO) e o peixe nativo mais exportado é o tambaqui, sendo 72% destinado ao Peru, gerando 798 mil dólares em 2023. Um crescimento importante de 809% de 2022 a 2023 (PEIXE BR, 2024). Em 2023, a produção de peixes no Brasil foi de 887.029 toneladas, um crescimento de 3,1% se comparado a 2022, sendo o peixe mais cultivado no Brasil a tilápia, *Oreochromis niloticus*, com 579.080 toneladas, representando 65,3% da produção nacional, e em seguida vem os peixes nativos com 29,7% da produção nacional (263.479 toneladas). Os maiores produtores de peixes nativos, no Brasil, estão na região Norte, sendo Rondônia o maior produtor com 56.500 toneladas de peixes nativos, Mato Grosso em segundo lugar com 40.500 toneladas e o Amazonas em quinto lugar com 20.500 toneladas. De 2014 a 2023 o setor no Brasil cresceu 53,25%, de 578.800 t para 887.029 t (PEIXE BR, 2024).

Proteína animal sustentável

O aumento populacional projetado para as próximas décadas, com a população mundial atingindo 9,1 bilhões de pessoas em 2050 (SOARES, 2019), intensificará a demanda

por alimentos, incluindo proteínas de origem animal. Essa crescente demanda, especialmente em países em desenvolvimento (SOARES, 2019), exige atenção especial à produção de alimentos de forma sustentável e segura. Nesse contexto, a piscicultura, ou aquicultura, surge como uma alternativa promissora para suprir a necessidade global por proteína animal, com menor impacto ambiental em comparação à pecuária tradicional (FERREIRA *et al.*, 2023).

A produção aquícola global deve crescer 10% na próxima década, impulsionada principalmente pela China (OECD; FAO, 2023). Esse aumento se dará, em grande parte, por meio de ganhos de produtividade e avanços tecnológicos relacionados a planejamento espacial, melhoramento genético, alimentação e manejo de doenças (OECD; FAO, 2023).

As projeções indicam que o consumo de pescado continuará a crescer, mas a um ritmo mais lento do que na década anterior (OECD; FAO, 2023). A FAO estima que a produção aquícola será responsável por quase dois terços do fornecimento global de pescado até 2030 (FERREIRA *et al.*, 2023), o que evidencia o papel fundamental da aquicultura na segurança alimentar global.

A sanidade animal na aquicultura é um fator crítico para o sucesso dessa atividade. Assim como na pecuária, a intensificação da produção aquícola aumenta o risco de disseminação de doenças. Por exemplo, o aparecimento de *Klebsiella pneumoniae* na produção de tilápias no Sudeste do Brasil (Rio Paraná, São Paulo) (VANECCI-SILVA *et al.*, 2022). A *Klebsiella pneumoniae* encontrada foi alvo de pesquisas, pois esteve presente em um surto que matou 90 mil peixes em 4 dias e é um importante vetor de genes de resistência a antimicrobianos, o que acaba sendo um risco potencial para a saúde pública (VANECCI-SILVA *et al.*, 2022). Os autores sugerem a implementação de sistemas de vigilância sanitária. Um dos sistemas que têm a capacidade de auxiliar o produtor rural a separar o estoque infectado e evitar a disseminação da doença na propriedade, minimizando perdas econômicas, é o teste de diagnóstico preciso e rápido conhecido como Imunoensaio de fluxo lateral (LFIA) (SHYAM *et al.*, 2022). Com um imunoensaio de fluxo lateral o diagnóstico não necessitaria de mão de obra qualificada como acontece nos métodos de diagnósticos convencionais de nível laboratorial. Exemplo de um Imunoensaio de fluxo lateral em desenvolvimento no Brasil para a tilápia, é o projeto de mestrado do Paulo Roberto de Oliveira, intitulado "*Francisella em tilápia: desafios no diagnóstico e perspectivas para a saúde aquática no Brasil*" com o objetivo de detectar rapidamente a *Francisella orientalis*, causadora de grandes prejuízos na tilapicultura brasileira, em parceria com o hub de inovação tecnológica AptaHub (CANALRURAL, 2024).

O primeiro passo para o desenvolvimento de um imunoenensaio é o entendimento sobre para quais patógenos o imunoenensaio ajudará a prevenir surtos de doenças, qual a letalidade dos surtos e a sua frequência. Para o Tambaqui uma revisão sistemática sobre os agentes patogênicos que o acometem foram relatados em uma revisão sistemática de literatura intitulada, *Infectious agents and parasites that affect tambaqui (Colossoma macropomum) and treatments used to control these pathogens: a systematic review*, um passo importante para o entendimento de quais patógenos foram relatados para a espécie *Colossoma macropomum* (SOUSA et al. 2020).

A FAO destaca a necessidade de aprimorarmos as nossas práticas de manejo, investir em tecnologias para prevenção e controle de doenças e promover o uso responsável de antibióticos na aquicultura, visando garantir a sustentabilidade da produção (FERREIRA *et al.*, 2023).

O investimento em pesquisa, inovação tecnológica e boas práticas de manejo serão muito importantes para o crescimento sustentável da produção aquícola brasileira, o que contribuirá para a segurança alimentar e o desenvolvimento socioeconômico do país.

As imunoglobulinas plasmáticas

As imunoglobulinas (anticorpos), principais componentes da imunidade humoral, participam nas respostas imunes neutralizando os agentes patogênicos e são produzidas pelos plasmoblastos e plasmócitos, que são células B (ou linfócitos B) diferenciadas.

As classes e subclasses de imunoglobulinas podem variar nos vertebrados superiores. Por exemplo, os humanos possuem cinco classes de imunoglobulinas: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE sendo que a IgA e a IgG apresentam subclasses como IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respectivamente. Já, nos peixes teleósteos, foram identificados os isotipos IgM, IgD e IgT ou IgZ.

O monômero de imunoglobulina é constituído por duas cadeias pesadas e duas leves unidas por ligações dissulfídicas. A IgM, a primeira a ser isolada, é a imunoglobulina funcionalmente mais conservada e presente em todos os vertebrados mandibulados (Gnatostomados) (SECOMBES et al. 2012). Em salmonídeos, ao analisar o plasma por eletroforese não redutora e desnaturante, foram identificados quatro isotipos de IgM: a monomérica (200 kDa), dimérica (400 kDa), trimérica (600 kDa) e tetrâmera (800 kDa) (BROMAGE *et al.*, 2004).

Essa diversidade estrutural da IgM pode estar relacionada com as suas funções desempenhadas (KAATTARI et al., 1998; YONG-AN; PIN, 2002; SECOMBES et al., 2012).

A IgM pode ser encontrada no plasma dos peixes em altas concentrações e exercer a ação de *receptores de reconhecimento de padrões* (PRR) – por reconhecerem *padrões moleculares associados aos patógenos* (PAMP) (MAGNADOTTIR et al., 2010; SECOMBES et al. 2012).

Os linfócitos B de peixes aparentam ter atividades fagocíticas, contra partículas de antígenos, indicando a possibilidade dessas células desempenharem diversas funções, além de produtoras de imunoglobulinas (LI et al. 2006; SECOMBES et al. 2012).

A segunda imunoglobulina a ser identificada foi a IgD no grupo de peixes com nadadeiras ('catfish') (WILSON et al. 1997). A IgD está presente como uma proteína integral de membrana com massa molecular de 125 kDa e no soro com 370 e 400 kDa. Quando a imunoglobulina com massa molecular de 370 kDa, passa pelo processo de redução são originados cadeias pesadas com massa molecular de 165 kDa e cadeias leves com 25 kDa e uma outra isoforma monomérica com 250 kDa sendo a cadeia pesada com 100 kDa e a leve com 25 kDa (RAMIREZ-GOMEZ et al., 2012).

A IgT e a IgZ foram nomeadas diferentemente do convencional por terem sido isoladas em truta (*Oncorhynchus mykiss*) e em zebrafish (*Danio rerio*) respectivamente. Apesar, de ambas imunoglobulinas apresentarem homologia em quatro regiões constantes (HU; XIANG; SHAO, 2010), possuem aspectos genômicos diferentes quanto a organização e localização (DANILOVA et al., 2005; HU; XIANG; SHAO, 2010).

A IgT e a IgZ são expressas durante o desenvolvimento embrionário (DANILOVA et al., 2005; HU; XIANG; SHAO, 2010). Em peixes adultos a IgT é expressada em vários tecidos e a IgZ é limitada ao tecido linfóide primário (HU; XIANG; SHAO, 2010). A IgT é uma classe primitiva de imunoglobulina especializada na imunidade de mucosa, apresentando as massas moleculares de 180 kDa com cadeias pesadas de 75 kDa e leves de 25 kDa (ZHANG et al., 2010).

Na literatura científica podem ser encontradas informações sobre imunoglobulinas isoladas e caracterizadas de peixes teleósteis não nativos do Brasil. No entanto, o isolamento e a caracterização das imunoglobulinas são passos importantes para o desenvolvimento de ferramentas como as anti-imunoglobulinas usadas nos imunodiagnósticos, como em Imunoensaios já desenvolvidos para outros peixes (SHYAM et al., 2022).

REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico deste projeto foi desenvolvido com os dados de isolamentos e purificações de imunoglobulinas séricas de peixes teleósteos da revisão de literatura, com abrangência do ano de 1963 a 2024. A revisão de literatura é o Capítulo 1 desta tese de doutorado.

JUSTIFICATIVA

A elucidação da estrutura e função das imunoglobulinas séricas em *Colossoma macropomum* (tambaqui) constituirá um avanço para as estratégias de saúde e manejo na piscicultura. A caracterização das imunoglobulinas, essenciais para a resposta imune humoral, permitirão a identificação de novos biomarcadores e o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e profiláticas.

A aquicultura intensiva, embora fundamental para a segurança alimentar global, acaba expondo os peixes a uma série de patógenos ambientais quando em altas densidades de estocagem, podendo resultar em perdas econômicas substanciais. A compreensão da resposta imune do tambaqui frente a esses agentes infecciosos é, portanto, muito importante para a economia regional. Ao elucidarmos os mecanismos moleculares subjacentes à interação antígeno-anticorpo no tambaqui, poderemos projetar ferramentas de estudos histopatológicos importantes para a elucidação das interações dos patógenos com o sistema imune dessa espécie de peixe.

Além das implicações para a produção aquícola, o estudo contribuirá para o campo da imunologia comparada. A comparação das imunoglobulinas do tambaqui com as de outros teleósteos poderá revelar novas percepções sobre a evolução do sistema imune adaptativo e os seus mecanismos.

Em conclusão, a caracterização das imunoglobulinas do tambaqui representa um passo fundamental para a promoção da saúde e do bem-estar dos peixes, além de contribuir para o avanço do conhecimento científico na área da Imunologia. Os resultados obtidos poderão ser aplicados tanto na aquicultura, como no desenvolvimento de ferramentas para a elucidação das doenças na pesquisa básica, o que conseqüentemente poderá abrir novos horizontes para a pesquisa aplicada.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os diferentes métodos de isolamento de proteínas para a purificação de imunoglobulinas.

Objetivos Específicos

- A. Isolar as imunoglobulinas séricas com ácido caprílico, sulfato de amônio e ácido caprílico mais sulfato de amônio;
- B. Purificar as proteínas em colunas de afinidade;
- C. Avaliar a metodologia de isolamento das imunoglobulinas em colunas de afinidade de proteínas A e G;
- D. Avaliar a metodologia de isolamento das imunoglobulinas em colunas de cromatografia de exclusão molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de Estudo

Trata-se de estudo descritivo e retrospectivo, a fim de descrever as imunoglobulinas presentes na corrente sanguínea do *Colossoma macropomum*.

E é uma continuação do projeto de mestrado intitulado “Desenvolvimento de uma startup e de ferramentas para diagnósticos de doenças endêmicas de tambaqui (*Colossoma macropomum*)”.

O estudo obteve amostras de plasma de Tambaqui cedidas por piscicultores e por projeto em desenvolvimento na EMBRAPA Amazônia Ocidental com aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de n.04/2022.

Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Imunoquímica, no Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e na Fundação Ezequiel Dias em Minas Gerais.

A obtenção do plasma de Tambaqui, o isolamento inicial com ácido caprílico e sulfato de amônia foram desenvolvidos no Amazonas e a purificação em colunas de afinidade e exclusão foram todas realizadas Belo Horizonte, Minas Gerais, na Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias sob a orientação da Professora Doutora Consuelo Latorre Fortes Dias e auxílio da pesquisadora Paula Ladeira Ortolani.

População do Estudo

A população do estudo foi composta de Tambaquis com média de peso de aproximadamente 500 a 2000 gramas.

Amostragem

A amostragem foi não probabilística: buscou-se obter o maior número possível de amostras de soro de Tambaqui. A obtenção das amostras dependeu da viabilidade dos colaboradores de laboratório e dos piscicultores estarem dispostos a doarem o plasma gratuitamente.

Critérios de Elegibilidade

Critérios de inclusão: Tambaquis saudáveis.

Critérios de exclusão: Tambaquis que não passaram por uma coleta de sangue há duas semanas desde a coleta anterior.

Procedimentos de coleta de plasma de Tambaqui

Os peixes foram anestesiados com Eugenol 10% (1ml/L) em seguida os tambaquis foram colocados em uma mesa, e com uma seringa de 5mL com a agulha heparinizada foram retirados os volumes de sangue e armazenados em frascos de microtubos e em seguida foi realizado dois *pools* em até dois tubos falcon de 15 mL ou 50 mL a depender da disponibilidade de peixes e quantidade de plasma obtido na coleta.

Purificação das imunoglobulinas com Ácido Caprílico

A purificação das imunoglobulinas presentes no plasma de tambaqui foi realizada pelo método descrito por Steinbuch e Aundran (1969) e modificado por Dos- Santos e colaboradores (1989) e por DE VASCONCELLOS DIAS et al., (2015). Três tubos contendo 10 mL/tubo de plasma foram utilizados e os pH das amostras foram ajustados de 6 para 5,0, com o ácido acético 0,1 M. Após aferidos os pH, nas amostras foram adicionados, gota a gota, o ácido caprílico (Merck, Darmstadt) na concentração final de 8,7 %, sob agitação com a barra de agitação magnética por 30 minutos em um Béquer, a temperatura ambiente com a finalidade de precipitar todas as proteínas e manter as imunoglobulinas na fase líquida (sobrenadantes).

Purificação das imunoglobulinas com sulfato de amônio

Volumes iguais de plasma e Sulfato de Amônio saturado líquido filtrado pH7 são adicionados lentamente por gotejamento em um frasco de vidro, béquer, fora da geladeira. Após o gotejamento, o recipiente foi armazenado na geladeira sob agitação por 15 horas. Em seguida a amostra foi transferida para tubos cônicos cuja finalidade será a centrifugação à 3000 RPM. O líquido sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se PBS 1X com volume de 10% ou 50% do volume inicial da amostra e a parte sólida foi ressuspensa e homogeneizada. As purificações foram baseadas na referência (LI et al. 2007).

Diálise pós purificação com ácido caprílico e ou sulfato de amônio

O saco de diálise foi hidratado com água destilada por 10 minutos e em seguida a amostra de soro purificada ressuspensa foi adicionada ao saco. A amostra foi dialisada em temperatura de 10°C e a cada 4 horas e a solução de diálise foi trocada. Ao final do processo a amostra fica praticamente transparente.

Liofilização

Como procedimento as amostras de plasma de Tambaqui após os processos de purificação e diálise, foram congeladas em -20° C e enviadas para o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da UFAM para liofilização (modelo Alpha 1-2 LD Plus (Christ), para manter as características bioquímicas durante o transporte. Após a liofilização as amostras eram enviadas para Belo Horizonte, via Correios (Sedex) para a Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

Cromatografia molecular de exclusão

Superdex 200

Superdex 200 HR 10/300 GL (GE HealthCare Bioscience AB, Upsalla, Sweden). A corrida foi feita em HPLC Akta Purifier 10 (GE HealthCare Bioscience AB, Upsalla, Sweden), mantido em sala condicionada (25 °C). A coluna foi previamente calibrada com 7 proteínas de massa molecular conhecida, em volume de 200 µl: Blue dextran (2000 kDa), thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (230 kDa), aldolase (158 kDa), ovoalbumin (43 kDa) e RNase (13.7 kDa). Utilizou-se tanto uma mistura desses padrões quanto as proteínas individualmente, de forma a certificar dos volumes de retenção de cada uma. O tampão de eluição foi TRIS 0.1 M pH 8.0, sob fluxo de 0,5 ml/min.

O plasma liofilizado foi reconstituído ao seu volume original com H₂O gelada. Após microcentrifugação a 14,000rpm sob refrigeração, a amostra foi mantida em banho de gelo até sua aplicação na coluna cromatográfica.

Sephacryl s200

Para o fracionamento de maior volume de plasma, foram utilizadas duas colunas de vidro ligadas em série (d=1.6 cm, h=100 cm, com cerca de 180 cm³ cada, vol total 360 cm³) contendo Sephacryl S200 (GE HealthCare Bioscience AB, Upsalla, Sweden). As massas moleculares dos componentes eluídos dessa coluna foram estimadas por comparação com os volumes de retenção da coluna Superdex 200 calibrada.

Tanto a corrida quanto a coleta de frações (3 ml/fração) foram feitas sob refrigeração em geladeira, com tampão de eluição TRIS 0.1 M pH 8.0, sob fluxo de 30 ml/h. O volume de amostra aplicada não ultrapassou 2% do volume total da coluna.

Superose 6

Amostras processadas em Sephacryl S200 foram aplicadas em coluna Superose 6 HR 10/30 acoplada ao Akta Purifier 10 (GE HealthCare Bioscience AB, Upsalla, Sweden).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido a inexistência de estudos prévios sobre o isolamento de imunoglobulinas séricas de Tambaqui, buscamos estudos sobre este tema em outras espécies de peixes teleósteos na literatura científica. Mais detalhes, sobre os artigos disponíveis de isolamento de imunoglobulinas de peixes teleósteos, na revisão de literatura (vide capítulo I).

Nas tabelas abaixo podemos visualizar as colunas mais frequentemente usadas no isolamento de imunoglobulinas de peixes teleósteos encontrados na revisão de literatura:

COLUNAS	USOS EM ARTIGOS CIENTÍFICOS
SEPHADEX G200	14
SEPHAROSE 6	9
SEPHACRYL S300	6
SUPEROSE 6	4
SEPHACRYL S200	4
SEPHAROSE 4B	4
SEPHACRYL S400	3
LKB ULTRAGEL ACA 34	1
BIOPREP SE-1000/17	1

Tabela 3. Colunas de Exclusão molecular.

COLUNAS	USOS EM ARTIGOS CIENTÍFICOS
PROTEÍNA A	12
BSA-CL AGAROSE	4
MBP SEPHAROSE	2
BSA SEPHAROSE 4B	1
AGAROSE A-5M	1
ECONOPAC IG	1
IGG SEPHAROSE	1

Tabela 4. Colunas de Afinidade.

COLUNAS	USOS EM ARTIGOS CIENTÍFICOS
DEAE (CELULOSE; SEPHAROSE CL 6B; TOYO PEARL 65 OS)	4

Tabela 5. Colunas de Troca iônica.

COLUNAS	USOS EM ARTIGOS CIENTÍFICOS
COLUNA CM	1

Tabela 6. Coluna de Troca Catiônica.

Dentre as colunas de proteína de afinidade usadas para o isolamento de imunoglobulinas, temos a coluna de proteína de afinidade do tipo A devido a sua afinidade para imunoglobulinas de várias espécies. Essa coluna já foi usada na purificação de imunoglobulinas de Truta arco íris, *Ancorhynchus mykiss*, (ESTÉVEZ *et al.*, 1993), de Sea bass, *Dicentrarchus labrax*, (SCAPIGLIATI *et al.*, 1996), de Snaper, *Pagrus auratus*, (MORRISON AND NOWAK, 2001) de Barramundi, *Lates calcarifer* Bloch, (CROSBIC AND NOWAK, 2002), de Black rockfish, *Sebastes schlegeli* Higendorf, (SHIN *et al.*, 2006) de Grouper, *Epinephelus coioides*, (CHENG *et al.*, 2006), de African catfish, *Clarias gariepinus*, (VERMA *et al.*, 2018) e de Giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*, (LI *et al.*, 2021) e na dissertação de mestrado (SOUSA, 2019) usamos a purificação com o Ácido caprílico e a coluna de proteína G de bancada e obtivemos alguns resultados preliminares a serem posteriormente analisados no doutorado com o plasma de Tambaqui, por isso, começamos as análises com o plasma de Tambaqui pós Ácido Caprílico pH5 (AC), nas colunas de afinidade do tipo A e G.

Ambas as colunas **A** (Fig 1) e **G** (Fig 2) obtiveram baixa resolução com picos sem definição, em seguida testamos aumentar o volume da amostra de soro e passamos na coluna de proteína **G** e o resultado foram picos pequenos sem definição.

Proteína A soro pos caprilico desalinizado em NAP25 001

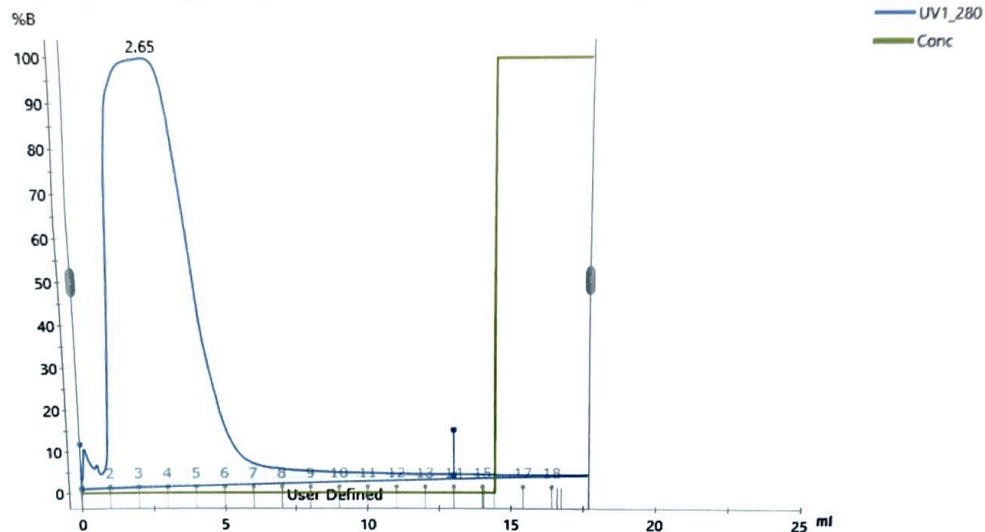
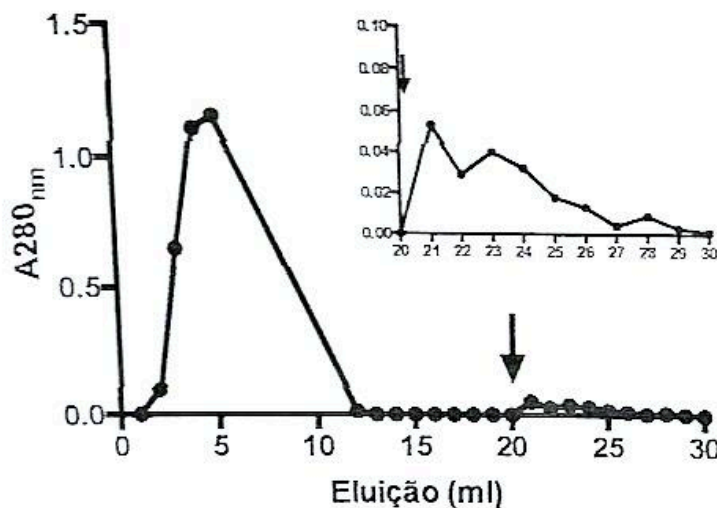


Fig 1. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui AC em coluna de afinidade de Proteína A.



Perfil cromatográfico de ppt com ácido caprílico de soro de tambaqui em Proteína G agarose convencional.
Amostra - 1 ml dil. 1:5 com tampão fosfatos pH 7.0. A seta aponta para a troca de tampão para glicina 0.1 M pH 8.0. Coleta 1 ml/fração.

Fig 2. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui AC em coluna de afinidade de Proteína G.

Os picos obtidos nas colunas de afinidade A e G foram passados na coluna **C4** de fase reversa e dessalinizadora (**Fig 3**) a fim de podermos passar as amostras na Espectrometria de massa, porém os resultados da Espectrometria de massas foi inconclusivo (dados não mostrados).

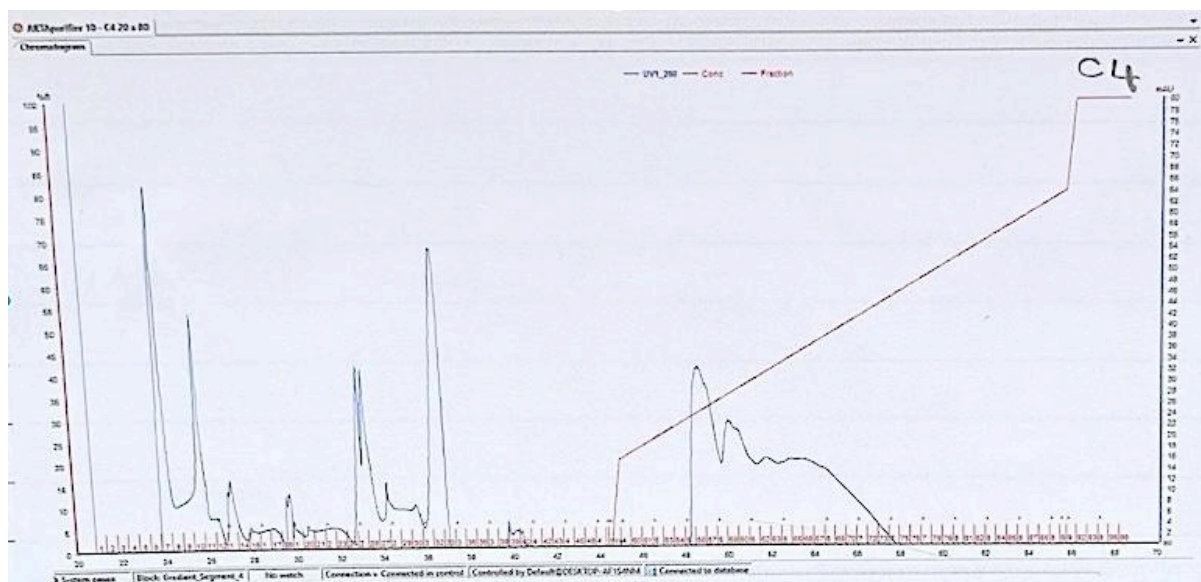


Fig 3. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tabaqui AC em coluna de fase reversa C4.

C8 soro pos caprilico NAP25 proteina A 001

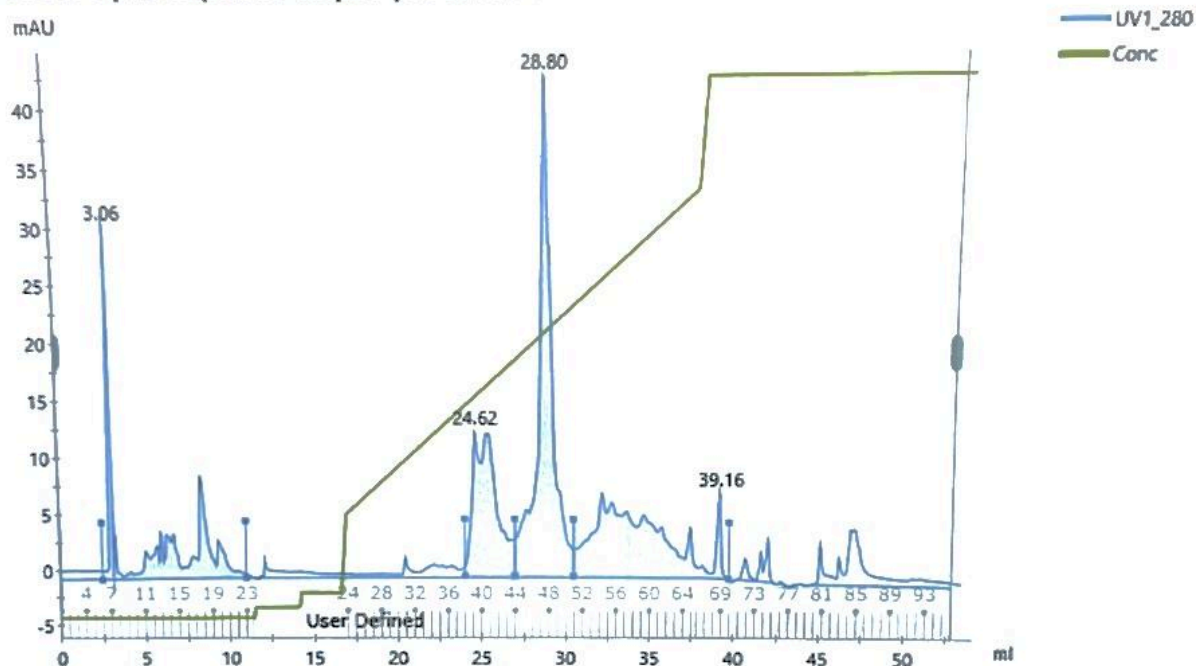


Fig 4. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tabaqui AC em coluna de fase reversa C8.

Outro teste conduzido foi passar a amostra de Soro pós Ácido Caprílico pH5 na coluna de dessalinização **NAP** (coluna com troca de tampões de base aquosa) e aplicarmos o eluato na coluna de proteína **A**. Obtivemos picos pequenos e irregulares. A seguir a amostra passou na coluna **C8** (**Fig 4**) para testarmos outra coluna de dessalinização de mesma finalidade que a **C4**. Porém, estávamos verificando se os resultados poderiam estar relacionados a problemas com a coluna **C4**. Após passar a amostra na coluna **C8**, enviamos para a Espectrometria e os resultados foram os mesmos da coluna **C4**, inconclusivos.

Achamos que as colunas de afinidade não estavam dando resultados satisfatórios, por isso, decidimos rever o nosso processo de isolamento e purificação do Plasma de Tambaqui. Dessa maneira partimos para uma fase, mais exploratória, onde buscamos comparar os resultados de purificação do plasma e colunas de exclusão molecular.

O principal objetivo da fase exploratória, foi analisar como o Plasma de Tambaqui, se comportaria nas colunas de exclusão molecular: **Superdex 200 HR10/30** (coluna analítica), **Sephacryl S200** (coluna preparativa), **Sephacryl S400** e **Superose 6 HR10/30**, tendo em vista que as colunas de afinidade não nos deram bons resultados (picos de boa resolução).

As escolhas das colunas de exclusão molecular também foram baseadas na literatura científica. A coluna de exclusão molecular Sephadex S200, já foi usada para purificar imunoglobulinas de Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii*, (RAISON *et al.*, 1978), de Pike, *Esox Lucius*, (CLERX *et al.*, 1980) de Salmão do Atlântico, *Salmo Salar*, (SIGVE HAVARSTEIN *et al.*, 1988), de Truta arcoíris, *Ancorhynchus mykiss*, (SZALAI *et al.*, 1996) e de Giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*, (LI *et al.*, 2021).

A coluna Sephadex S400 já foi usada em Cod, *Gadus morhua*, (PILSTROM AND PETERSSON, 1991) em Turbot, *Scophthalmus maximus*, (KOFOD *et al.*, 1994) e Gulf Menhaden, *Brevoortia patronus*, (SHELBY *et al.*, 2002).

E a coluna Superose 6 já foi usada para purificar imunoglobulinas de Salmão do Atlântico, *Salmo Salar*, (SIGVE HAVARSTEIN *et al.*, 1988) (PETTERSEN *et al.*, 1995) e de Seabass, *Dicentrarchus labrax*, (BOURMAUD *et al.*, 1995).

Para o começo da fase exploratória nas colunas de exclusão, foram analisados e selecionados três métodos de isolamento de imunoglobulinas, a fim de compararmos os plasmas com os três métodos de purificação. Purificamos os plasmas de Tambaqui com três métodos de purificação: Ácido Caprílico em pH5, Sulfato de Amônio e Ácido Caprílico mais Sulfato de Amônio. Em seguida, passamos as amostras na coluna **Superdex 200 HR10/30** (coluna analítica).

A amostra purificada com Ácido Caprílico (**Fig 5**) em comparação com Sulfato de Amônio (**Fig 6**) obtiveram resultados diferentes e possivelmente o termo correto seja complementares (**Fig 7**) pois os picos da amostra pós Ácido Caprílico mostraram proteínas com predominância de baixa massa molecular e um pico de alta massa molecular (**Fig 5**).

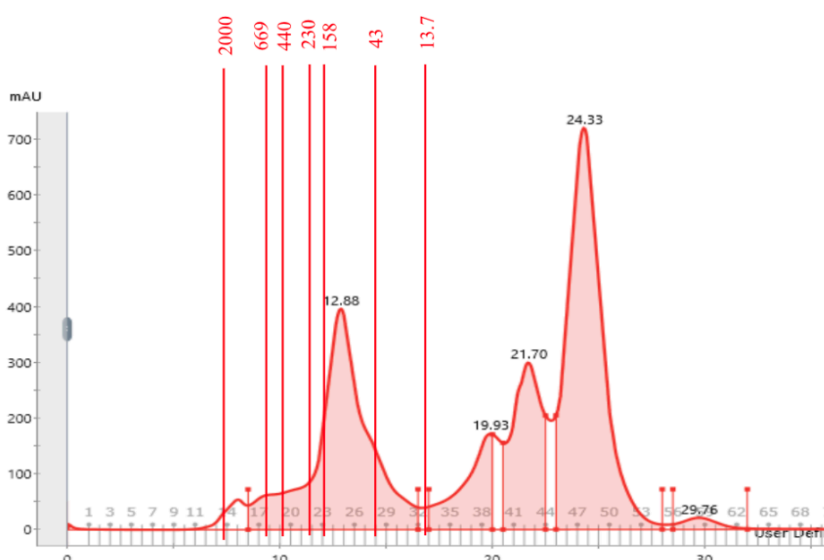


Fig 5. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de tambaqui AC em Superdex 200 HR10/30. Volume total da coluna 24 ml. Fluxo 0.5 ml/min. Tampão Tris 0.1 M pH 8.0. As linhas contínuas em vermelho mostram os volumes de eluição corrigidos (pela curva de regressão) das proteínas padrão e as respectivas massas moleculares (em KDa).

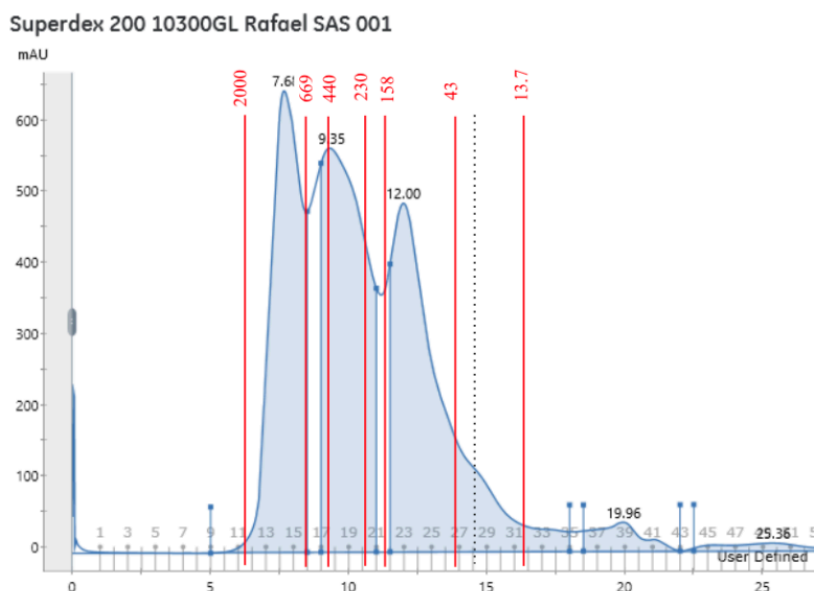


Fig 6. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de *Colossoma macropomum* SAS em Superdex 200 HR10/30. Volume total da coluna 24 ml. Fluxo 0.5 ml/min. Tampão Tris 0.1 M pH 8.0. As linhas contínuas em vermelho mostram os volumes de eluição corrigidos (pela curva de regressão) das proteínas padrão e as respectivas massas moleculares (em KDa).

Mais dados interessantes foram obtidos nas figuras 5 e 6. Na figura 5 o pico de maior massa molecular tem proteínas que variam de 158 a 48 kD em massa molecular. Em alguns peixes teleósteos, imunoglobulinas de conformação monomérica de massa molecular semelhante, já foram isoladas, são eles: *Eptatretus Burgeri*, com massa 160-150 kD e 160-90kD (KOBAYASHI, *et al.*, 1985); *Oncorhynchus keta*, com massa 150 kD (FUDA *et al.*, 1992); *Perca fluviatilis*, com massa 150 kD (WHITTNGTON, 1993); *Acipenser transmontanus*, com massa 170 kD (ADKISON *et al.* 1996); *Thunnus Maccoyii*, com 168 kD (WATTS *et al.*, 2001).

Na Fig 6 os três picos também apresentaram uma variação de massas moleculares (pico 1, 2000-665kD; pico 2, 669-230, pico 3, 158-43) semelhantes a várias conformações (pentamérica, tetrâmera, trimérica, dimérica e monomérica) de imunoglobulinas encontradas em outras espécies de peixes teleósteos como em *Oncorhynchus keta*, com massas de 730 kD, 560 kD, 494 kD, 360 kD, 190 kD, 150 kD (FUDA *et al.*, 1992; KOBAYASHI *et al.*, 1982); *Ictalurus nebulosus*, com massas de 600 e 584 kD (ISBELL AND PAULEY, 1983); *Rainbow trout*, com massas de 900 kD, 700 kD, 540 kD, 360 kD, 180 kD e 160 kD (ESTÉVEZ *et al.*, 1993; SÁNCHEZ AND DOMÍNGUEZ, 1991); *Oreochromis mossambicus* com massa de 900

kD (RAJAVARTHINI *et al.*, 2000); *Cirrhinus mrigala* com massa de 900 kD (KHANDIGE *et al.*, 2022) e *Oreochromis niloticus* com massa de 850 kD (DIAS *et al.*, 2023).

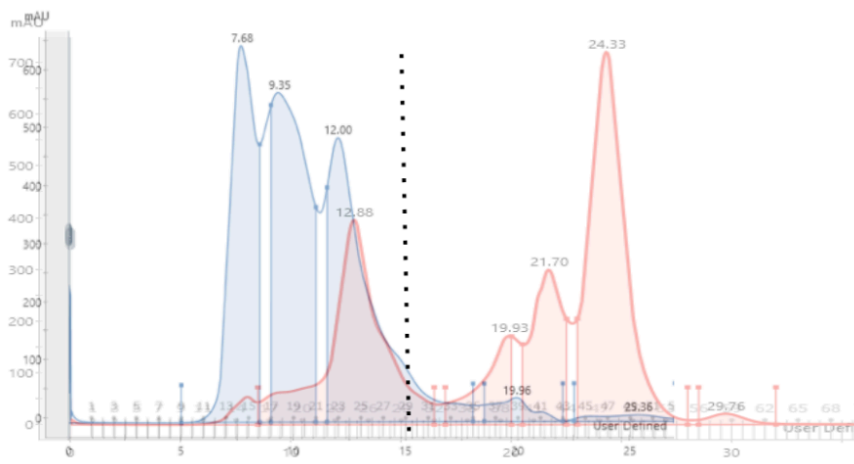


Fig 7. Superposição de perfis cromatográficos de amostras de plasma de *Colossoma macropomum* SAS e AC recém reconstituídas em Superdex 200 HR10/30. Vermelho - amostra AC; azul - amostra SAS. Volume total da coluna 24 ml. Fluxo 0.5 ml/min. Tampão Tris 0.1 M pH 8.0.

Já a amostra purificada com o Sulfato de Amônio, apresentou picos de proteínas de apenas altas massas moleculares (**Fig 6**) e a amostra que passou pelo isolamento com Ácido Caprílico e Sulfato de Amônio não apresentou resultados satisfatórios, tendo em vista que os picos foram de baixa resolução e sem uma predominância por proteínas de alta massa e baixa massa molecular (**Fig 8**), como acontece em comparação às figuras 5 e 6.

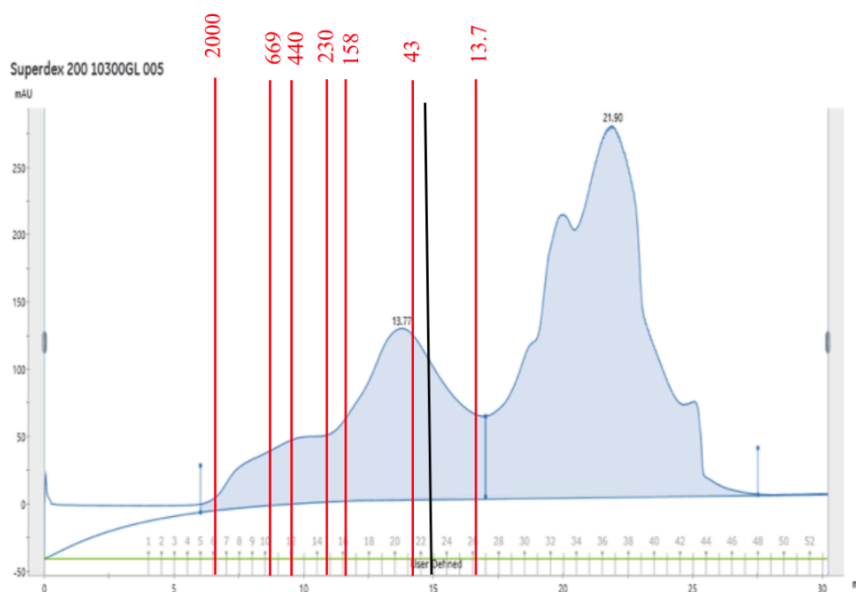


Fig 8. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de *Colossoma macropomum* purificada com SAS e AC, em Superdex 200 HR10/30. Volume total da coluna 24 ml. Fluxo 0.5 ml/min. Tampão Tris 0.1 M pH 8.0. As linhas contínuas em vermelho mostram os volumes de eluição corrigidos (pela curva de regressão) das proteínas padrão e as respectivas massas moleculares (em KDa).

A fim de obtermos melhores resoluções dos picos obtidos em nossos resultados atuais (Fig 5, 6 e 8) e podermos aplicar uma maior quantidade de amostra do que na coluna analítica **Superdex 200 HR10/30** seguimos com as amostras na coluna preparativa **Sephacryl S200**, utilizando duas colunas ligadas em série.

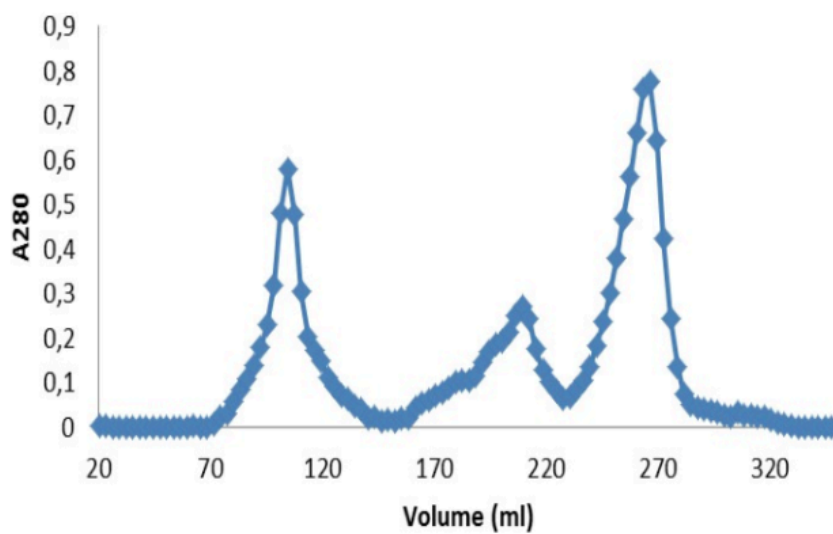


Fig 9. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de *Colossoma macropomum* AC em Sephacryl S200. Duas colunas em série com volume total de 360 cm³. Tampão TRIS 0.1 M pH 8.0. Fluxo 12 ml/h. Os volumes de eluição estão aproximados devido à variação no volume das frações (entre 2.5 e 3 ml).

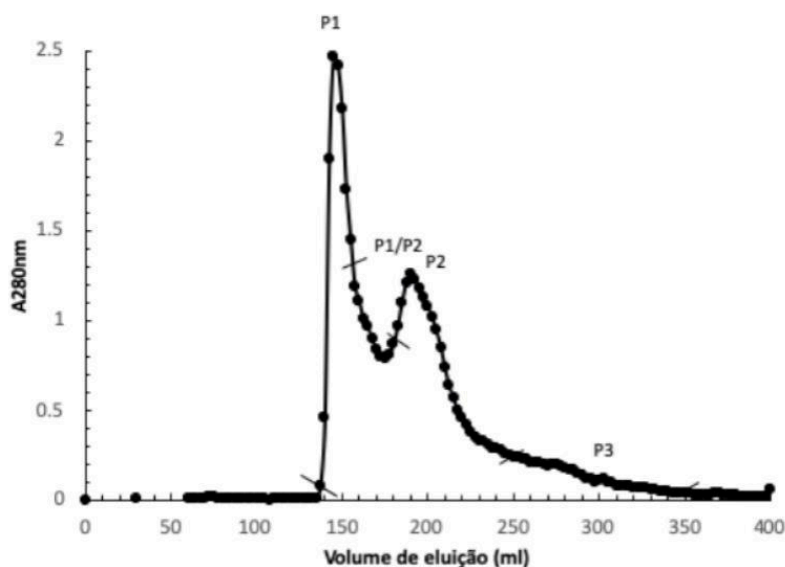


Fig 10. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de *Colossoma macropomum* SAS+AC em Sephacryl 200 HR10/30. Duas colunas em série com volume total de 360 cm³. Tampão TRIS 0.1 M pH 8.0.

A amostra pós Ácido Caprílico pH5 obteve três picos de boa resolução (**Fig 9**) e a amostra Ácido Caprílico mais sulfato de amônio dois picos de baixa resolução (**Fig 10**). A amostra pós Sulfato de Amônio foi passada na coluna **Sephacryl S400** e não na **Sephacryl S200** como nas outras purificações, pois os picos obtidos anteriormente com o Sulfato de Amônio foram de alta massa molecular e a **Sephacryl S200** é similar em resolução à **Superdex 200 HR10/30**, o que poderia acabar nos dando a mesma resolução e uso de amostra. O resultado foi uma pior resolução tendo em vista que os três picos obtidos anteriormente se uniram em um só pico (**Fig 11**).

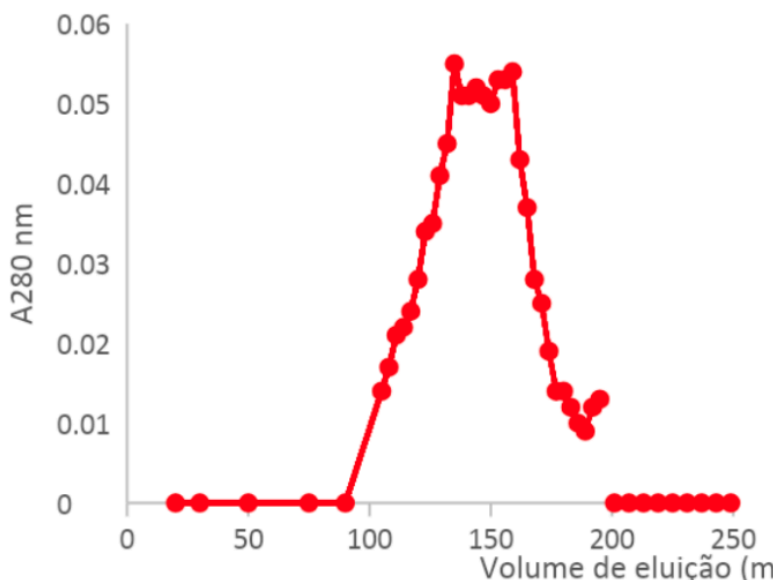


Fig 11. Perfil cromatográfico de amostra de plasma de *Colossoma macropomum* SAS em Sephacryl 400. Dimensões da coluna d=1.6 cm, h=100 cm, vol cerca de 180 cm³. Tampão TRIS 0.1 M pH 8.0. Fluxo 12 ml/h. B.

Em seguida os picos das amostras pós Ácido Caprílico e pós Ácido Caprílico mais sulfato de Amônio foram passados na coluna de exclusão molecular **Superose 6 HR10/30**. Como resultado a amostra pós Ácido Caprílico obteve um resultado de alta resolução (**Fig 12**) semelhante ao encontrado no artigo de Nakamura e colaboradores (2006) de isolamento de imunoglobulina de ovário da espécie de teleósteo, *Neoditrema ransonneti* (NAKAMURA *et al.*, 2006) (**Fig 13**). O resultado da amostra pós Ácido Caprílico mais Sulfato de Amônio foi de baixa resolução e não conclusivo para uma proteína específica (**Fig 14**). E a amostra de Sulfato de Amônio ainda não foi testada na coluna de exclusão Superose 6 HR10/30.

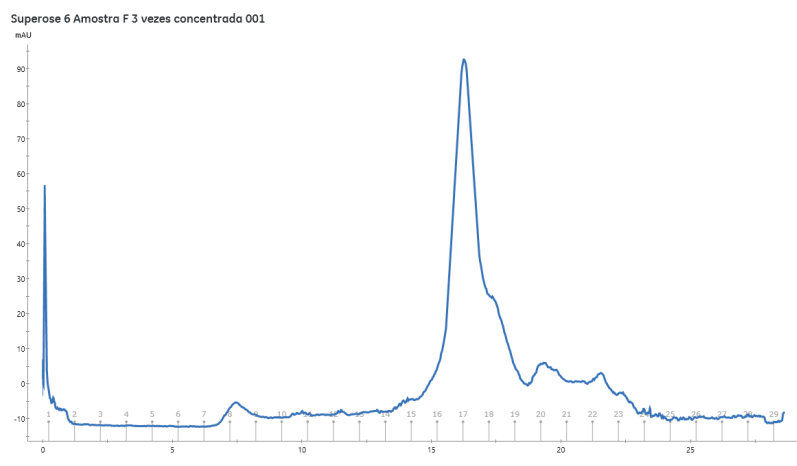


Fig 12. Perfil cromatográfico de P1 da Sephacryl S200, de plasma previamente processado com AC, em Superose 6. Tampão 0.1 M TRIS pH 8.0. Fluxo 0.5 ml/min.

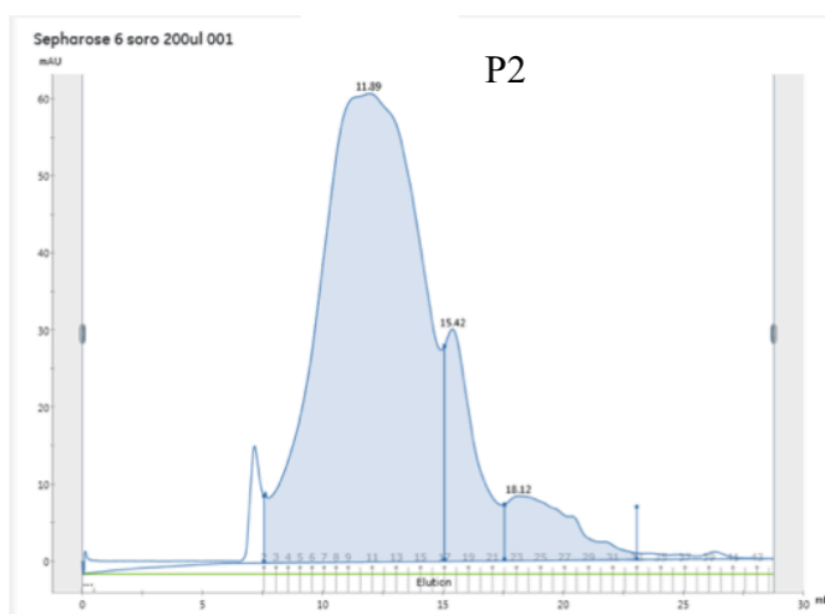


Fig 14. Perfil cromatográfico de P1 da Sephacryl S200 eluída de plasma de *Colossoma macropomum* processado com SAS+AC. Tampão 0.1 M TRIS pH 8.0. Fluxo 0.5 ml/min.

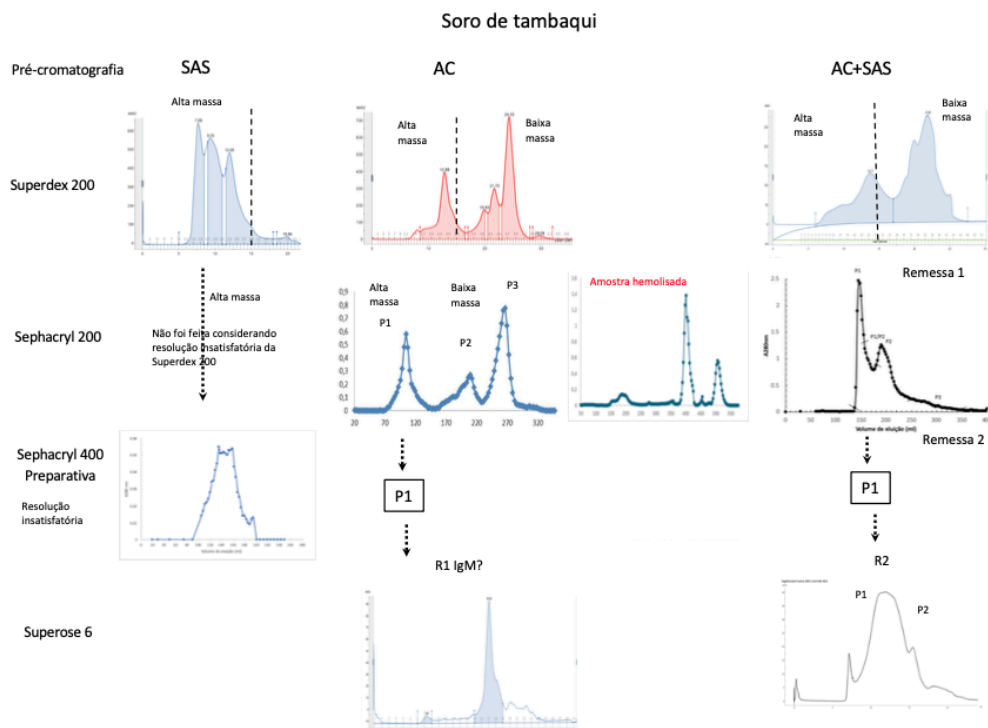


Fig 15. Resumo de todos os resultados cromatográficos obtidos com as colunas de exclusão molecular deste capítulo de tese. Superose 6 mostra os perfis mais purificados, porém não conclusivos para anticorpos ainda. São necessários novos experimentos para continuar o delineamento experimental.

CONCLUSÕES

- O tambaqui apresentou diferenças nos processos de purificação das imunoglobulinas séricas.
- A purificação do plasma de Tambaqui com o Ácido Caprílico tende a isolar proteínas de altas e baixas massas moleculares.
- A purificação do plasma de Tambaqui com o Sulfato de Amônio tende a isolar proteínas de altas massas moleculares.
- Apesar dos perfis de purificação de Ácido Caprílico e Sulfato de Amônio serem complementares em relação às massas das proteínas isoladas, a realização de ambos os processos de purificação em uma mesma amostra de plasma não resulta em um isolamento com boa resolução nos picos cromatográficos, o que o torna um processo de purificação não recomendável.
- A hemólise do soro do Tambaqui após a coleta no peixe afeta o perfil de proteínas purificadas, demonstrando que a hemólise não é recomendada no momento de coleta de sangue.

- A melhor padronização de purificação para as imunoglobulinas do tambaqui até esse estudo é, Ácido caprílico pH5 + coluna Superdex 200 + Sephacryl 200 + Superose 6.
- O resultado obtido na coluna de exclusão molecular Superose 6 foi um pico de alta resolução cuja análise em gel nativo com redução necessita ser padronizada para averiguarmos se sua composição corresponde à IgM de alta massa molecular semelhante à encontrada na literatura científica em outros peixes teleósteos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKISON, M. A.; BASURCO, B.; HEDRICK, R. P. Humoral immunoglobulins of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: partial characterization of and recognition with monoclonal antibodies. *Developmental and comparative immunology*, v. 20, n. 4, p. 285–298, 1 jul. 1996.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, p. 186, 1998.

BOURMAUD, C.-F.; ROMESTAND, B.; BOUIX, G. Isolation and partial characterization of IgM-like seabass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) immunoglobulins. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), v. 132, n. 1-2, p. 53–58, abr. 1995.

BROMAGE, E. S. et al. Use of staphylococcal protein A in the analysis of teleost immunoglobulin structural diversity. *Developmental and comparative immunology*. v. 28, n. 7-8, p. 803–814, jun. 2004.

CANALRURAL. Pesquisa desenvolve kit de diagnóstico rápido para doença que afeta tilápias. Canal Rural, 24 ago. 2024. Disponível em: <<https://www.canalrural.com.br/aves-e-suinos/peixes/pesquisa-desenvolve-kit-de-diagnostico-rapido-para-doenca-que-afeta-tilapias/>>. Acesso em: 7 set. 2024.

CHENG, C.-A.; JOHN, J. A. C.; WU, M.-S.; LEE, C.-Y.; LIN, C.-H.; LIN, C.-H.; CHANG, C.-Y. Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 109, n. 3-4, p. 255–265, 15 fev. 2006.

CLERX, J. P. et al. Isolation and characterization of the immunoglobulin of pike (*Esox lucius* L.). *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 1, n. 2, p. 125–144, fev. 1980.

CNA. CNA Jovem. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/projetos-e-programas/cna-jovem>>. Acesso em: 9/2024.

CROSBIC, P.B.B.; NOWAK, B.F. Production of polyclonal antisera against barramundi

(Lates calcarifer Bloch) serum immunoglobulin derived from affinity columns containing mannanbinding protein or staphylococcal protein A. *Aquaculture*, v. 211, n. 1-4, p. 49-63, 2002.

DANILOVA, N. et al. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature Immunology*, v. 6, n. 3, p. 295–302, 30 mar. 2005.

DIAS, D. De C.; TACHIBANA, L.; BACH, E. E. Isolation and Characterization of the Immunoglobulin (IgM) from *Oreochromis niloticus* in Brazil. *European Journal of Aquatic Sciences*, v. 2, n. 1, p. 6–10, 30 jun. 2023.

ESTÉVEZ, J.; SÁNCHEZ, C.; DOMÍNGUEZ, J.; LEIRO, J.; SANMARTÍN, M. L.; UBEIRA, F. M. Protein-a binding characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunoglobulins. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 173–180, 1993.

FERREIRA, H. G. R. et al. O PARADIGMA DO CONSUMO DE PROTEÍNA ANIMAL E O RISCO PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR HUMANA. *Revista Formação (Online)*. v. 30, n. 57, p. 347–367, 26 set. 2023.

FUDA, H.; HARA, A.; YAMAZAKI, F.; KOBAYASHI, K. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Developmental and comparative immunology*, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 415–423, 1992.

GOULDING, M. *The Fishes and the Forest: Explorations in Amazon Natural History*. University of California Press, Berkeley. p. 280, 1980.

GOULDING, M.; CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): na important amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*. v.2, p. 107-133, 1982.

HU, Y.-L.; XIANG, L.-X.; SHAO, J.-Z. Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish: Implications for a distinct B cell receptor in lower vertebrates. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 4, p. 738–746, 2010.

ISELL, G. L.; PAULEY, G. B. Characterization of immunoglobulins from the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) produced against a naturally occurring bacterial pathogen,

Aeromonas hydrophila. Developmental and comparative immunology, Verão. 1983. v. 7, n. 3, p. 473–482.

KAATTARI, S.; EVANS, D.; KLEMER, J. Varied redox forms of teleost IgM: an alternative to isotypic diversity? . Immunological Reviews, v. 166, p. 133–42, dec. 1998.

KHANDIGE, P. S.; SHANKAR, K. M.; BABU, P. S.; SADANANDA, V.; GOWRISH, S. Isolation, production, and characterization of serum immunoglobulin M (IgM) of Indian major carp *Cirrhinus mrigala* (MRIGAL). Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences, [s. l.], v. 2022, p. 2339924, 2022.

KOBAYASHI, K.; HARA, A.; TAKANO, K.; HIRAI, H. Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Molecular immunology, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 95–103, 1982.

KOBAYASHI, K.; TOMONAGA, S.; HAGIWARA, K. Isolation and characterization of immunoglobulin of hagfish, *Eptatretus burgeri*, a primitive vertebrate. Molecular immunology, v. 22, n. 9, p. 1091–1097, 1 set. 1985.

KOFOD, H.; PEDERSEN, K.; LARSEN, J. L.; BUCHMANN, K. Purification and characterization of IgM-like immunoglobulin from turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Acta veterinaria scandinavica, v. 35, n. 1, p. 1–10, 1 mar. 1994.

LI, J.; BARREDA, D. R.; ZHANG, Y.; BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; LAPATRA, L. S.; TORT, L.; SUNYER, J.; ORIOL, S. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. Nature Immunology, v. 7, n. 10, p. 1116–24, 2006.

LI, Q.; ZHAN, W.; XING, J.; SHENG, X. Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish & shellfish immunology, v. 23, n. 5, p. 982–990, Elsevier BV, 2007.

LI, A.; THWAITE, R.; STUART, K. B.; BARNES, A. C. Fish and Shellfish Immunology Serum IgM heavy chain sub-isotypes and light chain variants revealed in giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) via protein A affinity purification, mass spectrometry and genome sequencing. Fish & shellfish immunology, v. 113, p. 42–50, 2021.

MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. Mar Biotechnol (NY), v. 12, n. 4, p. 361–79, 2010.

MORRISON, R. N.; NOWAK, B. F. Affinity purification and partial characterisation of systemic immunoglobulin of the snapper. *ELSEVIER Aquaculture*, v. 201, p. 1–17, 2001.

NAKAMURA, O.; KUDO, R.; AOKI, H.; WATANABE, T. IgM secretion and absorption in the materno-fetal interface of a viviparous teleost, *Neoditrema ransonneti* (Perciformes; Embiotocidae). *Developmental and comparative immunology*, v. 30, n. 5, p. 493–502, 2006.

NELSON, J. S.; SCHULTZE, H. P.; WILSON, V. H.. Origin and phylogenetic interrelationships of teleosts : honoring Gloria Arratia : proceedings of the international symposium at the ASIH Annual Meeting in St. Louis, Missouri, 2007. [s.l.] Verlag Dr. Friedrich Pfeil, 2010.

NOVOA, D.R. El río Orinoco y sus pesquerías: Estado atual, perspectivas y las investigaciones necesarias. In: Wübezahn, F.; Alvarez, H.; Lewis Jr. (Eds.) *El Río Orinoco como Ecosistema*. Universidad Simón Bolívar, Fondo Editorial Acta Científica Venezolana, EDELCA, CAVN. p. 430, 1990.

NOVOA, D.R.; RAMOS, F.; CARTAYA, E. Las pesquerías artesanales del río Orinoco sector Caicara-Cabruta. Parte I. *Memoria de Ciencias Naturales La Salle XLIV*. p. 163- 215, 1984.

OECD; FAO. *OECD-FAO agricultural outlook 2023-2032*. [S.l.]: OECD, 2023.

PEIXEBR. *ANUÁRIO 2024 Peixe BR da Piscicultura*. Associação Brasileira da Piscicultura, [S.l.], 2024. p. 1–63.

PETTERSEN, F. E.; FYLLINGEN, I.; KAVLIE, A.; MAASEIDE, N. P.; GLETTE, J.; ENDRESEN, C.; WERGELAND, H. I. Monoclonal antibodies reactive with serum IgM and leukocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar*L.). *Fish & shellfish immunology*, v. 5, n. 4, p. 275–287, 1 maio 1995.

PILSTRÖM, L.; PETERSSON, A. Isolation and partial characterization of immunoglobulin from cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental and comparative immunology*, v. 15, n. 3, p. 143–152, Primavera 1991.

RAISON, R. L.; HULL, C. J.; HILDEMAN, W. H. Characterization of immunoglobulin

from the Pacific hagfish, a primitive vertebrate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 75, n. 11, p. 5679–5682, nov. 1978.

RAJAVARTHINI, P. B.; ARUNKUMAR, R. I.; MICHAEL, R. D. Partial characterization of serum immunoglobulins of *Oreochromis mossambicus*. Indian journal of experimental biology, v. 38, n. 6, p. 549–553, jun. 2000.

RAMIREZ-GOMEZ, F. et al. Discovery and Characterization of Secretory IgD in Rainbow Trout: Secretory IgD Is Produced through a Novel Splicing Mechanism. The Journal of Immunology, v. 188, n. 3, p. 1341–1349, 1 fev. 2012.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O.; FERRARIS, Jr. Check list of the freshwater of the south and central américa. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 729, 2003.

SÁNCHEZ, C.; DOMÍNGUEZ, J. Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies. Molecular immunology, v. 28, n. 11, p. 1271–1277, 1 nov. 1991.

SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; PICCHIETTI, S.; MAZZINI, M.; MASTROLIA, L.; SCALIA, D.; ABELLI, L. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. Fish & shellfish immunology, v. 6, p. 383–401, 1996.

SECOMBES, C.J.; WANG, T. The innate and adaptive immune system of fish. Oxford, Cambridge, Philadelphia, New Delhi: Woodhead Publishing Limited, p. 3-68, 2012.

SHELBY, R. A.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Isolation, purification, and molecular weight determination of serum immunoglobulin from gulf menhaden: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to assess serum immunoglobulin concentrations from Atlantic menhaden. Journal of aquatic animal health, v. 14, n. 4, p. 254–262, dez. 2002.

SIGVE HÅVARSTEIN, L.; AASJORD, P. M.; NESS, S.; ENDRESEN, C. Purification and partial characterization of an IgM-like serum immunoglobulin from Atlantic salmon (*Salmo salar*). Developmental and comparative immunology, v. 12, n. 4, p. 773–785, 1 set. 1988.

SHIN, G.; LEE, H.; PALAKSHA, K. J.; KIM, Y.; LEE, E.; SHIN, Y.; LEE, E.; PARK, K.; JUNG, T. Production of monoclonal antibodies against serum immunoglobulins of black rockfish (*Sebastes schlegeli* Higendorf). Journal of veterinary science, v. 7, n. 3, p. 293–295, set. 2006.

SHYAM, K. U. et al. Antibody-based lateral flow chromatographic assays for detecting fish and shrimp pathogens: A technical review. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). v. 558, n. 738345, p. 738345, set. 2022.

SOARES, C. O. PROTEÍNA QUE MOVE O MUNDO. [S.l.]: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 2019.

SOUSA, R. L.. Desenvolvimento de uma startup e de ferramentas para diagnósticos de doenças endêmicas de tambaqui (*Colossoma macropomum*). 2019. 128 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2019.

SZALAI, A. J.; BANOUB, J.; NAKHLA, N. A.; KEOUGH, K. M. W. An alternative procedure for isolation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, serum immunoglobulin. Journal of applied aquaculture, v. 5, n. 3, p. 33–45, 14 fev. 1996.

VANECI-SILVA, D. et al. Klebsiella pneumoniae causing mass mortality in juvenile Nile tilapia in Brazil: Isolation, characterization, pathogenicity and phylogenetic relationship with other environmental and pathogenic strains from livestock and human sources. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). v. 546, n. 737376, p. 737376, jan. 2022.

VERMA, V. K.; SEHGAL, N.; PRAKASH, O. Isolation and characterization of immunoglobulin from African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Indian Journal of Experimental Biology, v. 56, p. 402–410, 1 jun. 2018.

WATTS, M.; MUNDAY, B. L.; BURKE, C. M. Isolation and partial characterisation of immunoglobulin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* Castelnau. Fish & shellfish immunology, v. 11, n. 6, p. 491–503, ago. 2001.

WHITTINGTON, R. J. Purification and partial characterisation of serum immunoglobulin of the European perch (*Perca fluviatilis* L.). Fish & shellfish immunology, v. 3, n. 5, p. 331–343,

set. 1993.

WILSON, M.R.; BENGTON, E.; MILLER, N.; CLEM, L.W.; DU PASQUIER, L.; WARR, G.W. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 94, p. 4593–4597, 1997.

HU, Y.-L.; XIANG, L.-X.; SHAO, J.-Z. Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish: Implications for a distinct B cell receptor in lower vertebrates. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 4, p. 738–746, 2010.

YONG-AN, Z.; PIN, N. Serum immunoglobulin of the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* with development of polyclonal antibody. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, v. 20, n. 4, p. 332–337, dez. 2002.

ZHANG, Y.-A. et al. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, v. 11, n. 9, p. 827–835, 1 set. 2010.