



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE SILVA TOAZZA

**ARTINM COMO IMUNOESTIMULANTE DE NEUTRÓFILOS  
EM JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*OREOCHROMIS  
NILOTICUS*)**

CAROLINE SILVA TOAZZA

**ARTINM COMO IMUNOESTIMULANTE DE NEUTRÓFILOS  
EM JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*OREOCHROMIS  
NILOTICUS*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação (nível: Mestrado) em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

T627a Toazza, Caroline Silva.

Artimn como imunestimulante de neutrófilos em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Caroline Silva Toazza. – Londrina, 2011. 41 f. : il.

Orientador: Julio Cesar de Freitas.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Tilápia (Peixe) – Doenças – Prevenção – Teses. 2. Peixe – Bacterioses – Teses. 3. Peixe – Imunologia – Teses. 4. Lectinas – Teses. 5. *Streptococcus agalactiae* – Teses. 6. Aqüicultura – Teses. I. Freitas, Julio Cesar de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:597.583.4

CAROLINE SILVA TOAZZA

**ARTINM COMO IMUNOESTIMULANTE DE NEUTRÓFILOS EM  
JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção de título de Mestre em Ciência Animal  
(área de concentração Sanidade Animal) da  
Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. orientador Dr. Julio Cesar de Freitas  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Rogério Salvador  
UENP – Luiz Meneghel – PR

---

Prof. Dr. Wagner Loyola  
EMBRAPA – Londrina – PR

Londrina, 18 de março de 2011.

O presente trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Imunopatologia de Peixes, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto à agência e órgão de fomento à pesquisa abaixo relacionado:

**1.SETI: Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior/Paraná.**

## **DEDICATÓRIA**

À minha família com muito amor.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção e iluminação, por ter me guiado durante todos esses anos.

Aos meus pais Sonia e Walmor, pela vida, educação e amor incondicional. A eles, minha admiração.

À minha tia Beloni pelo apoio, incentivo e confiança em mim depositada.

Ao meu filho de quatro patas Fred que me acompanha nesta jornada há anos alegrando todos os dias de minha vida com seus latidos, lambidas e amor.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela oportunidade de realização de um sonho, troca de experiências, conhecimentos e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas por seus ensinamentos, seu profissionalismo, sua paciência e ajuda em todas as horas.

Aos professores, Dr. Rogério Salvador e Dr. Wagner Loyola, por suas sugestões e ensinamentos que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina Roque Barreira da USP de Ribeirão Preto pelas amostras de ArtinM gentilmente cedidas.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Cida Valério, da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP) - Campus Bandeirantes, pela colaboração na análise estatística.

À Helenice Kieski, também um exemplo de profissionalismo e parte fundamental para o sucesso do Programa de Ciência Animal. Foi sempre muito prestativa ajudando a resolver os vários problemas e situações originadas durante o período da pós-graduação.

Aos profissionais do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA), Róberson, Santiago e Nycolas, em especial a Dr<sup>a</sup> Fabiana Pilarski pela amizade, companheirismo e ajuda na hematologia de peixes.

Ao Laboratório de Imunopatologia de Peixes (LIPPE) pelo empréstimo de seus equipamentos e espaço físico, sem os quais não seria possível realizar o presente trabalho.

Aos colegas de laboratório Paulo Fernandes Marcusso, Geovana Rizzo Consenza, Pedro Oliveira Moreira e Leticia Carandina pelo auxílio na execução do experimento.

À Camila Dorigo pela amizade, dedicação e colaboração.

Às amigas Tatiane, Aninha, Dhâranâ, Pamela, Grazy e Paty pelos momentos de descontração.

A minha “família japonesa” Mirian, Michele e Tomico, por me acolherem de braços abertos em sua casa durante o tempo em que estive em Londrina, amenizando a saudade da minha família.

Ao meu amigo Eder pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e execução deste trabalho.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor. Mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iríamos ser, mas graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin Luther King

TOAZZA, Caroline Silva. **ArtinM como imunoestimulante de neutrófilos em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2011. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

## RESUMO

A aquicultura é um dos sistemas de produção que mais cresce no mundo. Neste contexto, o Brasil, se destaca como um dos países com grande potencial para a piscicultura, pois além de possuir vasto território pluvial, suas condições climáticas favorecem o implemento de cultivos de peixes. A tilápia é uma das principais espécies para a piscicultura nacional. Os sistemas intensivos usados na criação de tilápias, caracterizados pela alta taxa de estocagem, associados à práticas de manejo constantes e inadequadas e falhas nutricionais podem alterar a qualidade da água propiciando a ocorrência de doenças. A maior causa de perdas econômicas no cultivo de tilápias são as doenças de origem bacteriana como a estreptococose. Dentre as principais estratégias para controle da estreptococose está o uso de substâncias antimicrobianas, porém estes quimioterápicos induzem a seleção de bactérias resistentes, além de ser uma fonte de poluição ambiental. A utilização de substâncias químicas sintéticas e biológicas, fatores nutricionais, hormônios e citocinas, consideradas imunoestimulantes, favorecem os mecanismos de defesa nos animais, são importantes alternativas na prevenção e controle de patógenos na piscicultura podendo substituir o uso de antibióticos. Substâncias biológicas como as lectinas de extratos de plantas, têm apresentado bons resultados como imunoestimulantes, podendo ser encontradas em todos os tecidos vegetais. A ArtinM, uma glicoproteína, extraída da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*), é capaz de induzir a haptotaxia *in vivo* (em ratos) e *in vitro* (em células humanas), ativação de macrófagos e aceleração do processo de cicatrização ocular em coelhos. A haptotaxia induzida por ArtinM ocorre devido a lectina reconhecer glicanas presentes na superfície de células do sistema imune inato como, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos. O objetivo deste trabalho foi determinar a ação da ArtinM na haptotaxia de neutrófilos presentes no exsudato peritoneal de 120 juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculados por via intraperitoneal (i.p) com *Streptococcus agalactiae*. Para isto as tilápias foram divididas ao acaso em doze aquários submetidas a quatro tratamentos/grupos (G1: controle; G2: inoculada i.p. com ArtinM, G3: inoculada i.p. com *S. agalactiae*; G4: inoculada i.p. com ArtinM e desafiadas com *S. agalactiae*). Após seis e 24 horas da inoculação do estímulo as tilápias foram sacrificadas e amostras de exsudato peritoneal e sangue do vaso caudal foram coletadas. Para a determinação da concentração da ArtinM os resultados obtidos foram analisados pelo teste do Qui-quadrado no nível de 1% de significância, já para a determinação da inoculação experimental e desafio os resultados foram obtidos através do emprego do software SASM-Agri de Canteri et al. (2001), sendo aplicado o teste de Scott-Knott no nível de 5% de significância. Os resultados deste trabalho mostraram que a inoculação i.p. de 1,0 µg ArtinM/animal atua na haptotaxia de neutrófilos no exsudato peritoneal de juvenis de tilápias do Nilo. Desta forma, ArtinM pode ser uma alternativa na profilaxia de juvenis de tilápias do Nilo inoculadas com *S. agalactiae*.

**Palavras-chave:** Peixes. *Streptococcus agalactiae*. Haptotaxia. Lectinas. Leucócitos. ArtinM.

TOAZZA, Caroline Silva. **ArtinM as neutrophil immunostimulants in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2011. 41f. Dissertation (Master Degree in Animal Science – concentration area in Animal Sanity) – State University of Londrina, Londrina 2011.

## ABSTRACT

Aquiculture is one of the fastest growing production systems in the world. In this context, Brazil is highlighted as one of the countries with the greatest potential for pisciculture, since it not only has large pluvial territory, but also its climate conditions favor the implementation of fish culture. National pisciculture is based on the production of tilapia. Intensive systems used in the breeding of tilapia, characterized by high storage rates, associated to constant and inadequate handling practices and nutritional failure can alter the quality of water, enabling the occurrence of diseases. The greatest causes of economic losses in the culture of tilapia are diseases of bacterial origin, such as streptococose. Among the main strategies for the control of streptococose is the usage of antimicrobial substances. However, these chemotherapy products induce the selection of resistant bacteria, as well as being a source of environmental pollution. The usage of synthetic and biological chemical substances, nutritional factors, hormones and cytokines, considered immunostimulants, once these compounds favor the defense mechanism in animals is an important alternative in the prevention and control of pathogens in pisciculture, in substitution to the usage of antibiotics. Biological substances such as lectins from plant extracts have presented good results as immunostimulants, and can be found in all vegetable tissues. ArtinM, a glycoprotein, extracted from the seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia*), is able to induce haptotaxis *in vivo* (in mice) and *in vitro* (in human cells), activation of macrophages and acceleration of the process of eye cicatrization in rabbits. Haptotaxis induced by ArtinM happens due to the lectin recognizing glycans present in the surface of cells from the innate immune system such as neutrophil, macrofage, dendritic and mast cells. The aim of this paper is to determine the action of ArtinM in the haptotaxis of neutrophil present in the peritoneal exudate of one hundred and twenty juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intraperitoneally inoculated (i.p) with *Streptococcus agalactiae*. For this, tilapias were randomly divided in twelve aquariums submitted to four treatments/groups (G1: control; G2: i.p. inoculated with ArtinM, G3: i.p. inoculated with *S. agalactiae*; G4: i.p. inoculated with ArtinM and challenged with *S. agalactiae*). After six and 24 hours of inoculation of the stimulus, the tilapia were sacrificed and samples of peritoneal exudate and caudal vase blood were collected. The results obtained were analyzed by Chi-square test at 1% significance level; and to determine the experimental inoculation and challenge, the results were obtained using the software SASM-Agri from Canteri et al. (2001), and Scott-Knott tests with 5% significance level were applied. Results of this paper show that i.p. inoculation of 1,0 µg ArtinM/animal acts upon the haptotaxis of neutrophils in peritoneal exudate of juvenile Nile tilapia. In this manner, ArtinM can be an alternative in prophylaxis of juveniles in Nile tilapia innoculated with *S. agalactiae*.

**Key words:** Fish. *Streptococcus agalactiae*. Haptotaxis. Lectin. Leucocytes. ArtinM.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Taxa de sobrevivência em juvenis de tilápias do Nilo obtida com diferentes concentrações de ArtinM e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* ( $10^6$  UFC/mL), Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, 2010 ..... 41
- Tabela 2** – Número médio de leucócitos totais no exsudato inflamatório em juvenis de tilápias do Nilo inoculadas por via intraperitoneal com Artin M, *Streptococcus agalactiae* e com ArtinM e desafiadas com *S.agalactiae*, Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP),Bandeirantes, 2010 ..... 42
- Tabela 3** – Número médio de neutrófilos na cavidade peritoneal em juvenis de tilápias do Nilo inoculadas por via intraperitoneal com ArtinM, *Streptococcus agalactiae* e com Artin M e desafiadas com *S.agalactiae*, Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, 2010 ..... 43
- Tabela 4** – Número médio de neutrófilos no vaso caudal em juvenis de tilápias do Nilo inoculadas por via intraperitoneal com ArtinM, *Streptococcus agalactiae* e com Artin M e desafiadas com *S.agalactiae*, Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, 2010 ..... 44

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1.1 – IMUNOESTIMULANTES EM PEIXES .....	13
<b>Resumo</b> .....	13
1.2 – IMMUNOSTIMULANTS IN FISH.....	13
<b>Abstract</b> .....	13
1.3 – INTRODUÇÃO .....	14
1.4 – UTILIZAÇÃO DE IMUNOESTIMULANTES NA AQUICULTURA .....	15
1.5 – LECTINAS .....	17
1.5.1 – ARTINM .....	18
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 – OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	26
3.1 – ARTINM COMO IMUNOESTIMULANTE DE NEUTRÓFILOS EM JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS).....	26
3.2 – ARTINM AS NEUTROPHIL IMMUNOSTIMULANTS IN JUVENILE NILE TILAPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS) .....	26
<b>Resumo</b> .....	26
<b>Abstract</b> .....	26
<b>Introdução</b> .....	27
<b>Material e Métodos</b> .....	28
<b>Determinação da CL50</b> .....	28
<b>Determinação da Concentração da ArtinM</b> .....	28
<b>Inoculação Experimental e Desafio</b> .....	29
<b>Resultados</b> .....	30
<b>Discussão</b> .....	30
<b>Conclusão</b> .....	32
<b>Agradecimentos</b> .....	32

<b>Referências .....</b>	<b>32</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO A – Normas de Publicação do Periódico Ciência Rural .....</b>	<b>39</b>

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 – IMUNOESTIMULANTES EM PEIXES

**Resumo:** Na aquicultura, a piscicultura de água doce é a atividade que vem se mostrando mais promissora, sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) uma das espécies mais cultivadas mundialmente. Graças ao seu vasto território e condições climáticas favoráveis, o Brasil é um dos países com grande potencial para o desenvolvimento da piscicultura. O sistema de cultivo intensivo torna os peixes mais susceptíveis ao surgimento de enfermidades bacterianas. Entre elas a estreptococose é uma das mais impactantes, devido a taxa de mortalidade. O tratamento da estreptococose é realizado através da antibioticoterapia, no entanto o uso de antibióticos em sistemas de cultivo de peixes é bastante problemático, podendo causar o desenvolvimento de microorganismos resistentes além de grande impacto ambiental. Uma alternativa ao uso de antibióticos, os imunoestimulantes são capazes de atuar no sistema imunológico dos peixes e conferir maior resistência a esses animais frente à patógenos. Os imunoestimulantes são substâncias químicas e biológicas, fatores nutricionais, hormônios e citocinas. Dentre os imunoestimulantes biológicos, as lectinas, com ampla distribuição na natureza são encontradas em plantas, animais vertebrados, invertebrados e microorganismos. As lectinas de plantas estão presentes em todos os tecidos vegetais, porém as extraídas de sementes são as mais utilizadas devido à alta concentração. Entre as lectinas encontradas em semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*), a jacalina e a ArtinM, possuem propriedades biológicas distintas. As propriedades imunoestimulantes da ArtinM, descritas na literatura são indução da haptotaxia *in vivo* e *in vitro*, ativação de macrófagos e aceleração do processo de cicatrização ocular em coelhos. A capacidade da ArtinM melhorar o sistema imune dos animais pode indicar a utilidade desta proteína na profilaxia em juvenis de tilápias do Nilo.

**Palavras-chave:** Peixes. *Streptococcus agalactiae*. Haptotaxia. Lectinas. Leucócitos. ArtinM.

### 1.2 – IMMUNOSTIMULANTS IN FISH

**Abstract:** In aquaculture, fresh water pisciculture is a very promising activity, and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most widely cultivated species worldwide. Thanks to its vast territory and favorable climatic conditions, Brazil is one of the countries with great potential for the development of pisciculture. Intensive culture system render the fish more susceptible to the appearance of bacterial diseases. Among the bacterial diseases, streptococose is one of the most impacting, due to the high mortality rates. The treatment of streptococose is made through antibiotic therapy, however the use of antibiotics in fish cultivation system is very problematic, once it might lead to the development of resistant microorganisms, as well as causing great environmental impact. An alternative to the use of antibiotics, immunostimulants are able to act on the immunologic system of fish, granting more resistance to these animals towards pathogens. Immunostimulants are chemical and biological substances, nutritional factors, hormones and cytokines. Among biological immunostimulants, lectins, with wide distribution in nature, are found in plants, vertebrate, invertebrate animals and microorganisms. Plant lectins are presented in all vegetable tissues. However, those extracted from seeds are more used due to their abundance. Among lectins found in the seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia*), jackalin and ArtinM, have distinctive biological properties. Among the immunostimulating properties of ArtinM, those described

in literature are the induction of *in vivo* and *in vitro* haptotaxis, activation of macrophages and acceleration of eye cicatrization process in rabbits. The capacity of ArtinM in improving the immune system in animals shows the usage of this protein in the prophylaxis in Nile tilapia juveniles.

**Key words:** Fish. *Streptococcus agalactiae*. Haptotaxis. Lectin. Leucocytes. ArtinM.

### 1.3 – INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce no mundo. Dados da FAO (2009) mostram que a aquicultura mundial cresceu drasticamente nos últimos 50 anos, partindo de uma produção de 1 milhão de toneladas, nos anos 50, para uma produção superior a 52 milhões de toneladas em 2006. Apesar da estagnação do crescimento da pesca extrativista no mundo, a aquicultura mundial vem mantendo um crescimento de 6,1% em termos de quantidade produzida, e 11% em termos de valor capital movimentado com a atividade (FAO, 2009). Neste contexto, o Brasil é o país que apresenta o maior potencial para a produção de pescado através da aquicultura, tendo em vista a vastidão de seu território, com mais de 2/3 ocupando a região tropical e bacias hidrográficas privilegiadas, onde se destaca a bacia amazônica responsável por 20% da água doce do mundo (ANUALPEC, 2002).

A aquicultura nacional baseia-se essencialmente nas cadeias de produção da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*), sendo o segundo país sulamericano em produção, ficando atrás apenas do Chile (FAO, 2006). Atualmente os estados brasileiros que mais concentram a produção de tilápias são Paraná, Ceará, São Paulo, Bahia e Santa Catarina (KUBITZA, 2007).

Há em nosso país uma tendência à intensificação cada vez maior dos sistemas de produção de peixes (QUEIROZ; LOURENÇO; KITAMURA, 2002). A concentração dos animais e o manejo intenso inerentes aos sistemas intensivos de produção favorecem a disseminação de patógenos (CRIVELENT et al., 2006) e ocasionam surtos epizooticos com grande mortalidade de peixes, acarretando prejuízos ao produtor (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009). Das enfermidades que causam as maiores perdas econômicas na piscicultura, as de etiologia bacteriana estão entre as mais impactantes (LIMA, 2007).

O maior problema sanitário de origem bacteriana em sistemas de cultivo intensivo de tilápias é a estreptococose, considerada uma doença septicêmica (SALVADOR et al., 2005). Casos de infecção por *Streptococcus* spp foram descritas em mais de 20 espécies

de peixes de diferentes países dos vários continentes (OLIVARES-FUSTER et al., 2008; MIAN et al., 2009). No Brasil o primeiro relato de isolamento de *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) em tilápias do Nilo foi realizado por Salvador et al. (2005) no Estado do Paraná. Posteriormente esta bactéria também foi isolada nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo (FIGUEIREDO et al., 2006). Os estreptococos são bactérias oportunistas amplamente distribuídas no ambiente aquático que em condições favoráveis, tais como grande quantidade de matéria orgânica, multiplicam-se e provocam surtos nos peixes. Uma vez instalada a infecção, muito trabalho e tempo são necessários na tentativa de controlar o agente patogênico do sistema de produção (KUSUDA; KAWAI, 1998).

A principal estratégia para o controle das doenças bacterianas nos peixes é o uso de antimicrobianos como medida terapêutica e/ou preventiva (KUMMERER, 2004). Porém, o seu uso indiscriminado causa, inevitavelmente, a seleção de bactérias resistentes em relação ao agente ativo da substância utilizada, representando potencial risco à saúde humana (WHO, 2004).

A vacinação na aquicultura surge como alternativa ao uso de antimicrobianos, podendo ser administrada por inoculação, imersão ou administração oral (SACCHETIN et al., 2010), porém esses métodos apresentam diferentes vantagens e desvantagens quanto à eficiência da imunização, praticidade, efeitos colaterais e custo – benefício (GUDDING; LILLEHAUGA; EVENSEN, 1999). Apesar das vacinas contra *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* já serem produzidas e utilizadas em diversos países, no Brasil, apenas uma vacina contra vibriose foi registrada para uso na aquicultura (KUBITZA, 2008). Segundo Kubitza (2008), em breve, novos produtos deverão estar disponíveis, visto que as empresas e laboratórios que produzem vacinas para organismos aquáticos têm muito interesse no grande mercado representado pela tilapicultura no Brasil.

#### 1.4 – UTILIZAÇÃO DE IMUNOESTIMULANTES NA AQUICULTURA

Numerosos estudos têm mostrado que os imunoestimulantes podem ser usados na aquicultura para melhorar o desempenho zootécnico e a resistência à patógenos durante condições de estresse (SAKAI, 1999). Os imunoestimulantes são compostos de um grupo heterogêneo capaz de ativar o sistema imunológico. Dentre eles, destacam-se substâncias químicas sintéticas (levamisole, FK-565 – derivado de culturas de *Streptomyces olivaceogriseus*), substâncias biológicas (derivados de bactérias, polissacarídeos, extratos animais e vegetais), fatores nutricionais (vitaminas C e E), hormônios (prolactina e hormônio

do crescimento) e citocinas (SAKAI, 1999). Esses compostos são independentes em seu modo de ação, uma vez que cada imunostimulante age de maneira restrita à sua célula alvo. A maioria dos efeitos imunostimulantes atua sobre os mecanismos de imunidade inata mas, podem ter efeito positivo também na síntese de anticorpos (ANDERSON, 1992; SAKAI, 1999).

Seu uso pode ser de forma contínua ou em períodos de curta duração, sendo esta última a forma mais aconselhada. Quando fornecidos por curtos períodos (4-6 semanas) os imunostimulantes induzem aumento da resposta imune e retorno às condições normais após sua total metabolização (BRICKNELL; DALMO, 2005; SAKAI, 1999). Desta forma, o produtor tem maior flexibilidade no manejo da criação, uma vez que ele pode usar o aditivo em períodos de maior risco dos surtos epizooticos, como na primavera e outono em que há maior variação de temperatura, antes de algum manejo e em época de reprodução (BRICKNELL; DALMO, 2005; SAKAI, 1999).

Foi demonstrado que algumas vitaminas exercem efeitos imunostimulantes em peixes melhorando sua resposta à estímulos agressores. Segundo Lim, Yildirim-Aksoy e Klesius (2005), dietas suplementadas com níveis elevados de vitamina C têm sido utilizadas para aumentar a resposta imune e a resistência à doenças em salmonídeos. Trutas arco-íris (*Oncorhynchus myki*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) suplementados com dietas acima do recomendado para estas espécies (1000 mg de vitamina C/kg de dieta) tiveram aumento significativo de leucócitos em relação aos peixes que receberam 60 mg de vitamina C/kg da dieta (VERLHAC; GABAUDAN, 1994). Segundo Belo et al. (2005) a utilização de 450mg de vitamina E em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de cortisol, impedindo a imunossupressão nesses animais. A combinação de vitaminas também pode ser eficaz. Tilápias do Nilo suplementadas com vitaminas C e E e inoculadas intraperitonealmente com (LPS) de *Escherichia coli*, apresentaram redução no número total de neutrófilos circulantes no sangue e aumento na migração de leucócitos e trombócitos para o foco inflamatório (MARTINS et al., 2008).

Dentre as várias substâncias imunomoduladoras, a utilização de  $\beta$  glicanos de levedura é bastante conhecida. Nos peixes, a suplementação com  $\beta$ -glicano induz a ativação de macrófagos e estes por sua vez promovem a liberação de interleucina do tipo I (IL-I), a qual estimula a multiplicação de linfócitos T e a produção de interferon, desencadeando dessa maneira a defesa imune não específica (RAA et al., 1992). Segundo Salvador (2008) a suplementação com 0,3% de parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) associada à vacinação contra *Streptococcus agalactiae* foi importante por

incrementar a hematopoiese e leucopoiese. O efeito imunomodulatório do  $\beta$ -glucano pode ser diferente dependendo da espécie de peixe estudada, tempo de administração, via de administração, dose e associação com outros imunoestimulantes (RAA et al., 1992; YOSHIDA; KRUGER; INGLIS, 1995; DUNCAN; KLESIUS, 1996; SAKAI, 1999).

Outro composto utilizado como imunoestimulante na piscicultura é o levamisol, uma droga sintética com atividade antiparasitária. Segundo Jeney, Galeotti e Volpatti (1994) robalos (*Dicentrarchus labrax*) submetidos a banhos em concentrações de 1,0mg e 5,0 mg levamisol/L de água, durante 30 minutos, tiveram aumento no número de leucócitos e na atividade fagocitária. Porém quando usado para minimizar os efeitos estressores causados pelo transporte em matrinxã (*Brycon amazonicus*), o levamisol não foi capaz de minimizar a imunossupressão sobre leucócitos e trombócitos causadas pelos efeitos fisiológicos negativos do transporte (OLIVEIRA, 2008).

## 1.5 – LECTINAS

É crescente o interesse da utilização de extratos de plantas para prevenção ou controle de patógenos na aquicultura (CITARASU, 2010). Entre estas substâncias, as lectinas, têm apresentado os melhores resultados (POVINELI; FINARDI FILHO, 2002).

Amplamente distribuídas na natureza, as lectinas, são encontradas em plantas, animais vertebrados, invertebrados e microorganismos (LIS; SHARON, 1998; MODY; JOSHI; CHANEY, 1995; KENNEDY et al., 1995). As lectinas representam uma classe de glicoproteínas de origem não imune, com um ou mais sítios por subunidade, que pode ligar-se, específica e reversivelmente à açúcares, através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals (LIS; SHARON, 1998). Quando estas moléculas ligam-se a carboidratos, são capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações trocadas entre moléculas, células e organismos (SELL; COSTA, 2000).

Muitas lectinas vegetais são encontradas em sementes, embora sua presença já tenha sido observada em todos os tipos de tecidos vegetais, como casca, folha, caule, frutos e raízes (RATANAPO; NSAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 2001). Por serem mais abundantes, as lectinas produzidas em órgão de armazenamento, como as sementes, são as mais utilizadas (MOREIRA et al., 1991).

### 1.5.1 – ARTINM

Moreira e Ainouz (1978) analisaram o extrato salino de sementes de jaca (*Artocarpus intergrifolia*) e isolaram uma lectina com capacidade hemaglutinante de hemácias de vários mamíferos e aves. Esta lectina tem capacidade ligante a D-galactose e foi denominada de jacalina. Estudos subsequentes revelaram que sementes de jaca também continham uma pequena quantia de lectina D-manose-específica (MIRANDA-SANTOS et al., 1992) que foi primariamente nomeada como artocarpina, mas pesquisadores reivindicaram o nome, dizendo tê-lo usado anteriormente para designar uma outra lectina (CHOWDHURY; AHMED; CHATTERJEE, 1991). Como alternativa, foi então denominada provisoriamente KM+ (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994), mas outros autores continuaram referindo-se a ela como artocarpina (MISQUITH et al., 1994; RANI et al., 1999; 2000; PRATAP et al., 2002). Para padronizar a terminologia foi proposto por Pereira-da-Silva, Roque-Barreira e Van Damme (2008) uma nova terminologia. Para isto, utiliza-se o gênero da planta e a espécie da qual a proteína é derivada, neste caso, deriva-se da planta *Artocarpus integrifolia* e por ser uma D-manose ligante propuseram então o nome ArtinM.

ArtinM e jacalina apresentam distintas ações biológicas e especificidade na ligação aos carboidratos. Enquanto jacalina liga-se preferencialmente a um dissacarídeo, como a galactose (Gal $\beta$ 1–3GalNAc) (SASTRY et al., 1986), a ArtinM, liga-se a células que contenham resíduos de manose (Man $\alpha$ 1-3[Man $\alpha$ 1-6] Man) (MISQUITH et al., 1994). Rosa et al. (1999) estudaram esta especificidade na ligação à carboidratos apresentada pelas lectinas da semente de *A. integrifolia*, e demonstraram que jacalina e ArtinM compartilham 52% de homologia. Porém, ArtinM não sofre clivagem pós-transcricional em duas cadeias, em contraste com a jacalina, conservando um ligante rico em glicina, o qual consegue discriminar a ligação entre manose e galactose.

Em termos de ação biológica, jacalina induz a secreção de IL-6 por células monocíticas U937 (TAIMI et al., 1994) e potencializa a resposta humoral a trinitrofenol e *Trypanosoma cruzi* em camundongos (ALBUQUERQUE et al., 1999). ArtinM, por sua vez tem sido usado para estudar a haptotaxia da migração de neutrófilos (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994).

Santos-de-Oliveira et al., (1994) ao purificarem ArtinM observaram que esta lectina é capaz de atrair neutrófilos *in vitro* (em células humanas) e *in vivo* (em ratos) através de mecanismo haptotico. Segundo estes autores esta atração deve-se à interação entre o sítio de ligação a açúcar da lectina e um glicoconjugado da superfície do neutrófilo. Pereira-da-

Silva et al. (2006) demonstraram que ArtinM exerce ação estimulatória na indução e migração de neutrófilos através do reconhecimento de resíduos de manose presentes nos receptores para quimiocinas CXCR2, expresso nas superfícies de neutrófilos e monócitos inflamatórios. A participação de açúcares como receptores na superfície de neutrófilos abre novos caminhos na pesquisa para potencializar ou inibir reações inflamatórias (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2006).

ArtinM também é capaz de promover a ativação de macrófagos em camundongos e conseqüentemente induzir a produção e liberação de IL-12 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001), citocina que, por sua vez, estimula a secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos. Esta propriedade foi avaliada em estudos com camundongos da linhagem BALB/c infectados com *Leishmania major* que após serem inoculados com ArtinM modificaram seu padrão de secreção de citocinas Th2 para Th1, conferindo proteção contra a infecção por esse parasita (PANUNTO-CASTELO et al., 2001).

Outra propriedade biológica descrita é a capacidade de ArtinM acelerar o processo de cicatrização, como demonstrado por Chahud et al. (2009) ao tratarem com ArtinM coelhos com lesão de córnea. Estes autores observaram aumento de neutrófilos no local da lesão na fase inicial do processo, acelerando a cicatrização.

Os bons resultados observados em outras espécies de animais, faz com que a utilização de ArtinM possa ser experimentada como uma alternativa para melhorar a resposta imune de juvenis de tilápias do Nilo em situações adversas, uma vez que aumenta no sítio da lesão o número de neutrófilos, conferindo maior resistência a patógenos.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, D. A. et al. The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters**, v. 68, p. 375-381, 1999.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, n. 2, p. 281-307, 1992.
- ANUALPEC 2002. **Anuário da pecuária brasileira**. Instituto FNP. Ed. FNP Consultoria e Comércio. São Paulo/SP, 400p, 2002.
- BELO, M. A. A. et al. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 146-154, 2005.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 457-472, 2005.
- CHAHUD, F. et al. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits, **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 166-173, 2009.
- CHOWDHURY, S.; AHMED, H.; CHATTERJEE, B. P. Chemical modification studies of *Artocarpus lakoocha* lectin artocarpin. **Biochimie**, v. 73, p. 563-571, 1991.
- CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**, v. 18, p. 403-414, 2010.
- CRIVELENTI, L. Z. et al. Desempenho econômico da criação de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de produção intensiva. **Veterinária Notícias-Journal of veterinary science Federal University of Uberlândia**, v. 12, n. 2, p. 117-122, 2006.
- DUNCAN, P. L.; KLESIUS, P. H. Dietary immunostimulants enhanced non-specific immune response in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 8, p. 1-7, 1996.
- FISHERIES AND AQUICULTURE DEPARTMENT (FAO). **Produção pesqueira mundial, por captura e aquicultura, por país (2006)**. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/summ\_06/a-0a.pdf>. Acesso em: 09 set. 2010.
- \_\_\_\_\_. **The World States of Fisheries and Aquaculture 2008**. Food and Agriculture Organization of United Nations, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>. Acesso em: 14 set. 2010.
- FIGUEIREDO, H. C. P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006.

GANIKO L. et al. Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1, n. 3, p. 152-63, 2005.

GUDDING, R.; LILLEHAUGA, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 203-212, 1999.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D. Effects of immunostimulation on the nonspecific immune response of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. In: ABSTRACT FROM THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AQUATIC ANIMAL HEALTH. 1994. **Anais...** Seattle, Washington, 1994. p. 4-8.

KUBITZA, F. Tilápias na bola de cristal. **Panorama Aqüicultura**, v. 17, n. 99, p. 15-21, 2007.

\_\_\_\_\_. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama Aqüicultura**, v. 18, n. 107, p. 28-37, 2008.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KUMMERER K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 311-320, 2004.

KUSUDA, R.; KAWAI, K. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. **Fish Pathology**, v. 33, n. 4, p. 221-227, 1998.

LIMA, L. C. Doenças de importância econômica na piscicultura. In: III SEMINÁRIO DE AQUICULTURA, MARICULTURA E PESCA. 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2007.

LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P. H. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 1., 2005, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2005. p. 46-83.

LIM C.; WEBSTER C. D. **Tilapia**: Biology, culture and nutrition, Na Imprint of the Haworth Press, New York. p. 678, 2006.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

MARTINS, M. L. et al. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. **Ciencia Rural**, n. 38, p. 213-218, 2008.

MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 180-183, 2009.

MIRANDA-SANTOS, I. K. F. et al. A. A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. **Immunology Letters**, v. 31, p. 65-72, 1992.

MISQUITH, S.; RANI, P. G.; SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 48, p. 30393-30401, 1994.

MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 1995.

MOREIRA, R. A.; AINOUIZ, I. L. Isolectins from jack fruit *Artocarpus intergrifolia* seeds. **Plant physiology**, v. 61, p. 650, 1978.

MOREIRA, R. A. et al. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswald Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

OLIVARES-FUSTER, O. et al. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 277–283, 2008.

OLIVEIRA, S. R. **Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse ao transporte em matrinxã (*Brycon amazonicus*)**, 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazônia. 2008.

PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 12:1035-42, 2001.

PEREIRA-DA-SILVA, G. et al. Neutropkil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, n. 1, p. 86-94, 2006.

PEREIRA-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; VAN DAMME, E. J. M. Artin M: A rational substitution for the names artocarpin and KM+. **Immunology Letters**, v. 119, p. 114-115, 2008.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. The multiple functions of plant lectins. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 24, p. 135-156, 2002.

PRATAP, J. V. et al. Crystal Structures of Artocarpin, a Moraceae Lectin with Mannose Specificity, and its Complex with Methyl- $\alpha$ -D-mannose: Implications to the Generation of Carbohydrate Specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, p. 237-247, 2002.

QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. **A Embrapa e a aqüicultura: demandas e prioridades de pesquisa**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.

RAA, J. et al. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R. (Ed.), **Diseases in Asian Aquaculture**, Manila: Fish Health Section. Asian Fisheries Society, 1992, p. 39–50.

RANI, P. G. et al. Thermo-dynamic studies of saccharide binding to artocarpin, a B cell mitogen, reveals the extended nature of its interaction with mannotriose [3,6-Di-O-(alpha-D-mannopyranosyl)-D-mannose]. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 29694-29698, 1999.

\_\_\_\_\_. Isothermal titration calorimetric studies on the binding of deoxytrimannose derivatives with artocarpin: implications for a deep-seated combining site in lectins. **Biochemistry**, v. 39, p. 10755–10760, 2000.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739-744, 2001.

ROSA, J. C. et al. KM<sup>+</sup>, a mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the  $\beta$ -prism fold. **Protein Science**, v. 8, p. 13–24, 1999.

SACCHETIN, P. S. C. et al. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 263-268, 2010.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63–92, 1999.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R. et al. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 1798-1807, 1994.

SALVADOR, R. et al. Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp. do grupo B em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na região norte do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, nov-dez, 2005.

SALVADOR, R. **Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae***, 2008. 136f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.

SASTRY, M. V. et al. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-d-Gal(1–3)d-GalNAc). **The Journal of Biological Chemistry**, 261:11726–33, 1986.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

TAIME, M. et al. Involvement of CD4 in interleukin-6 secretion by U937 monocytic cells stimulated with the lectin jacalin. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, p. 214-220, 1994.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim Instituto da Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p. 21-36, 1994.

YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, p. 195-208, 1995.

WHO, 2004. World Organization for Animal Health. Organization International des Epizooties, World Health Organization, and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004a. Joint FAO/OIE/WHO **1st Expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance**: scientific assessment. Geneva, Switzerland, 1-5. December 2003. <http://www.who.int/foodsafety/publicat>.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 – OBJETIVO GERAL

Determinar a ação imunoestimulante da ArtinM em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

### 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a ação da ArtinM na haptotaxia de neutrófilos em juvenis de tilápias do Nilo

Determinar a concentração da ArtinM para a proteção em juvenis de tilápias do Nilo.

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO<sup>1</sup>

#### 3.1 – ARTINM COMO IMUNOESTIMULANTE DE NEUTRÓFILOS EM JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

#### 3.2 – ARTINM AS NEUTROPHIL IMMUNOSTIMULANTS IN JUVENILE NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

**Resumo:** A estreptococose é uma das mais importantes enfermidades na aquicultura, causando altas taxas de mortalidade em peixes. A ArtinM, com atividade imunoestimulatória, é obtida de extrato de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) atuando no sistema imunológico melhorando a resposta do sistema imune inato. O objetivo deste estudo foi verificar a ação da ArtinM na haptotaxia de neutrófilos presentes no exsudato peritoneal de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas, por via intraperitoneal (i.p.), com *Streptococcus agalactiae*. Após a determinação da CL50 do *S.agalactiae* e da concentração da ArtinM foram estudadas 120 tilápias distribuídas ao acaso em doze aquários submetidas a quatro tratamentos/grupos (G1: controle; G2: inoculada i.p. com ArtinM; G3: inoculada i.p. com *S. agalactiae*; G4: inoculada i.p. com ArtinM e desafiadas com *S. agalactiae*). Após seis e 24 horas da inoculação do estímulo, tilápias foram sacrificadas e amostras de exsudato peritoneal e sangue do vaso caudal foram coletadas para análise leucócitos totais e neutrófilos. Para a determinação da concentração da ArtinM os resultados obtidos foram analisados pelo teste do Qui-quadrado no nível de 1% de significância. Para determinação da inoculação experimental e desafio os resultados foram obtidos através do emprego do software SASM-Agri de Canteri et al. (2001), sendo aplicado o teste de Scott-Knott no nível de 5% de significância. Os resultados deste trabalho mostraram que a inoculação i.p. de 1,0 µg ArtinM/animal atua na haptotaxia de neutrófilos no exsudato peritoneal de juvenis de tilápias do Nilo. Desta forma, ArtinM pode ser boa alternativa na profilaxia para juvenis de tilápias do Nilo inoculadas com *Streptococcus agalactiae*.

**Palavras-chave:** Peixes. Sistema imune. Proteína. Lectina. Haptotaxia.

**Abstract:** Streptococose is one of the most important diseases in aquiculture, causing high mortality rates in fish. ArtinM, with immunostimulating activity, is obtained from the extract of seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) acting on the immunologic system, improving the response of the innate immune system. The objective of this study is to verify the action of ArtinM in the haptotaxis of neutrophils presented in the peritoneal exudate of juvenils of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) inoculated, intraperitoneally (i.p.) with *Streptococcus agalactiae*. After determining CL 50 from *S.agalactiae* and the determination of ArtinM concentration were studied of 120 tilapias randomly distributed in twelve aquariums submitted to four treatments/groups (G1: control; G2: i.p. inoculated with ArtinM; G3: i.p. inoculated with *S. agalactiae*; G4: i.p. inoculated with ArtinM and challenged with *S. agalactiae*). After six and 24 hours of inoculation of stimulus, the tilapias were sacrificed and samples from peritoneal exudate and blood from caudal vase were collected for the analysis of total leucocytes and neutrophiles. In order to determine ArtinM concentration, the results

<sup>1</sup> Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico Ciência Rural.

obtained were analyzed by Chi-square test at 1% significance level; and to determine the experimental inoculation and challenge, the results were obtained using the software SASM-Agri from Canteri et al. (2001), and Scott-Knott tests with 5% significance level were applied. The results of this paper show that i.p. inoculation of 1.0 µg ArtinM/animal acts on the haptotaxis of neutrophils on the peritoneal exudate of juvenile Nile tilapia. Therefore, ArtinM can be a good alternative in the prophylaxis of Nile tilapia juveniles inoculated with *Streptococcus agalactiae*.

**Key words:** Fish. Immune system. Protein. Lectin. Haptotaxis.

## Introdução

A produção de tilápias tem apresentado um crescimento acelerado no Brasil e no mundo (LOPERA BARRERO et al., 2006), principalmente em sistemas intensivos de criação devido a aceitação do mercado, rusticidade e alta produtividade (KUBITZA, 1997). Este tipo de sistema associado à práticas de manejo inadequadas e a falhas nutricionais podem alterar a qualidade da água propiciando a ocorrência de enfermidades infecciosas (BARCELLOS; SOUZA; WOEHL, 2000). Os antibióticos são produtos mais utilizados no tratamento de infecções em peixes porém o seu uso indiscriminado favorece a seleção de bactérias, acarreta grande impacto ambiental e pode deixar resíduos nos alimentos destinados ao consumo humano (HÖLMSTROM et al., 2003). Uma alternativa à utilização destas drogas são as substâncias imunoestimulantes obtida de extratos de plantas ou animais, derivados de bactérias, polissacarídeos, hormônios e compostos químicos (SAKAI, 1999).

O acúmulo de leucócitos no local de uma injúria proporcionado pela mobilização adequada e em tempo hábil da microcirculação para o foco inflamado é fundamental para a defesa do organismo e é a principal característica da inflamação (GARCIA-LEME, 1989). Apesar da literatura ser controversa ao descrever o componente celular da infecção em peixes, estudos demonstraram a presença de neutrófilos e macrófagos em diferentes espécies de peixes submetidas a variadas substâncias imunoestimulantes (MACARTHUR et al., 1984; ENDO et al., 1997; SALVADOR, 2008).

Estudos demonstraram que as lectinas de extratos vegetais são capazes de estimular o sistema imune dos vertebrados, mantendo a integridade dos leucócitos (LIS; SHARON, 1986; KENNEDY et al., 1995; PEREIRA DA SILVA et al., 2006). A lectina ArtinM, anteriormente conhecida como KM+ ou artocarpina, extraída da semente da jaca (*Artocarpus intergrifolia*), exerce ação estimulatória induzindo a migração de neutrófilos.

Tendo em vista a expansão da piscicultura, a aceitação comercial da tilápia e os prejuízos econômicos causados pela estreptococose nestes peixes, o presente trabalho teve

como objetivo avaliar o recrutamento de neutrófilos para o local do processo infeccioso agudo, após seis e 24 horas da aplicação de ArtinM em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

## **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Imunopatologia de Peixes (LIPPE) da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes. Ao todo, foram utilizadas 270 juvenis de tilápias do Nilo em todos os experimentos realizados. As tilápias foram mantidas em aquários de vidro com volume útil de 80 L, contendo 10 peixes em cada, abastecidos com água de poço artesiano com vazão de 1L/min e aeração contínua. Diariamente, a temperatura ( $28,0 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ ) da água foi aferida e, semanalmente, o potencial hidrogeniônico ( $7,3 \pm 0,3$ ) e a concentração de oxigênio dissolvido ( $5,54 \pm 0,82\text{mg/L}$ ), permanecendo na faixa de conforto (BOYD, 1990). Em dias alternados as caixas foram limpas por sifonagem.

### **Determinação da CL 50**

Para a determinação da CL50 foi utilizado *S. agalactiae* isolado de tilápias naturalmente infectadas e identificado segundo Vandamme et al. (1997) e Salvador et al. (2005). Foram utilizados 30 tilápias distribuídas ao acaso em três aquários, contendo 10 peixes cada. Um grupo de peixes recebeu por via intraperitoneal (i.p.)  $10^4$ , o outro grupo  $10^6$  e o outro  $10^8$  UFC/mL de *S. agalactiae*. Após observação por 15 dias foi determinado a CL50 para o *S. agalactiae* (SALVADOR, 2008).

### **Determinação da Concentração da ArtinM**

Foram utilizadas 120 juvenis de tilápias do Nilo distribuídas em 12 aquários. Os animais foram divididos ao acaso em quatro grupos (n=40) submetidos a tratamentos com três repetições (n=30), contendo 10 peixes cada. O grupo controle (T1) foi inoculado i.p. com 1,0 mL de solução tampão fosfato – salina (PBS), o grupo 2 (T2), grupo 3 (T3) e grupo 4 (T4) foram inoculados i.p. nas concentrações 0,5, 1,0 e 1,5  $\mu\text{g}$  ArtinM/animal respectivamente. Após 24 horas, os peixes de todos os grupos foram desafiados com 1,0 mL de *S. agalactiae* ( $10^6\text{UFC/mL}$ ) e avaliados por 15 dias para a obtenção do coeficiente de

mortalidade diária. A concentração da ArtinM que levou à maiores taxas de sobrevivência foi utilizada na inoculação experimental e desafio.

### **Inoculação Experimental e Desafio**

Outras 120 juvenis de tilápias do Nilo foram distribuídas em 12 aquários. Os animais foram divididos ao acaso em quatro grupos (n=40) submetidos a tratamentos com três repetições (n=30), contendo 10 peixes cada.

- Grupo 1 (G1) – inoculados i.p. 1,0 µl de PBS e 24 horas após inoculado com 1,0 mL de PBS;
- Grupo 2 (G2) – inoculados i.p. com 1,0 µg de ArtinM diluídos em 0,5 mL de solução salina estéril e 24 horas após inoculados com 1,0 mL de PBS;
- Grupo 3 (G3) – inoculados i.p. com 1,0 µl de PBS e 24 horas após inoculado com 1,0 mL de solução de *S. agalactiae* na concentração  $10^6$  UFC/mL;
- Grupo 4 (G4) - inoculados i.p. com 1,0 µg de ArtinM diluídos em 0,5 mL de solução salina estéril e 24 horas após inoculado com 1,0 mL de solução de *S. agalactiae* na concentração  $10^6$  UFC/mL.

Após seis horas da inoculação 40 peixes (10 peixes de cada grupo) foram anestesiados com solução de eugenol (VIDAL et al., 2008) e eutanasiadas por secção medular (PEDRAZZANI et al., 2007). O mesmo procedimento foi repetido com 24 horas. Após abertura da cavidade abdominal foi administrado 1,5 mL de RPMI 1640 (HIMEDIA<sup>®</sup>) estéril na cavidade e coletado 1,0 mL do exsudato com pipeta Pasteur. O material obtido foi colocado em tubos Falcon estéreis e centrifugado a 4000 xg (0°C)/6 minutos e então coletado o sedimento que foi adicionado em lamínulas em contato com placa de cultivo celular estéril.

Após incubação em estufa de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 29°C por 30 minutos, as lamínulas foram coradas com May-Grunwald-Giemsa-Wright, por 10 minutos, e com Giemsa, por 20 minutos (LOYOLA, 2008). A contagem total e diferencial de leucócitos foi realizada em 20 campos com objetiva de imersão.

Imediatamente antes do sacrificio dos animais, foi coletado de cada peixe ±1,0 mL de sangue por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis contendo EDTA (10%) para confecção de esfregaços sanguíneos que foram corados pelo método de

Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada com objetiva de imersão e os leucócitos totais e trombócitos foram quantificados indiretamente segundo Hrube e Smith (1998).

Para a determinação da concentração da ArtinM os resultados obtidos foram analisados pelo teste do Qui-quadrado no nível de 1% de significância, e para a determinação da inoculação experimental e desafio os resultados foram analisados através do emprego do software SASM-Agri de Canteri et al. (2001), sendo aplicado o teste de Scott-Knott no nível de 5% de significância.

## Resultados

A concentração de 1,0 µg da ArtinM/peixe mostrou a maior taxa de sobrevivência de peixes desafiados por via i.p. com *S. agalactiae* (Tabela 1).

As maiores médias de leucócitos totais (Tabela 2) obtidas no exsudato peritoneal ocorreram em todos os grupos com 24 horas de inoculação, exceto para o G1 (controle).

As maiores médias de neutrófilos (Tabela 3) obtidas no exsudato peritoneal foram encontradas com 24 horas nos grupos inoculados com ArtinM (G2) e com ArtinM e desafiados com *S. agalactiae* (G4).

Na amostra de sangue coletada do vaso caudal não ocorreu diferença significativa da média de neutrófilos entre todos os grupos estudados (Tabela 4).

## Discussão

Os dados existentes na literatura sobre a ArtinM são provenientes de estudos realizados em outras espécies animais, não havendo dados do uso desta proteína em peixes. Neste estudo, a aplicação de 1,0 µg de ArtinM/animal por via i.p. proporcionou a maior taxa de sobrevivência nos juvenis de tilápias do Nilo desafiadas com *S. agalactiae*. Dose inferior (0,5 µg/peixe) e superior (1,5 µg/peixe) não resultou em ação protetora da proteína nos peixes. Estudos com a ArtinM em diferentes espécies animais demonstraram que a dose imunomoduladora ideal bem como seu efeito é variável para as espécies. A inoculação *air pouch* de 50 µg ArtinM/animal em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* induziu a maior migração de leucócitos em 24 horas (TEIXEIRA et al., 2006), enquanto camundongos infectados com *Paracoccidiodes brasiliensis* e tratados com 0,5 µg ArtinM/animal apresentaram maior resistência à infecção, através da produção de IL-12, do

que camundongos não tratados (COLTRI et al., 2008). Em coelhos com lesão de córnea, experimentalmente provocada, a aplicação de uma solução de 2,5 µg/ mL de ArtinM acelerou o processo de cicatrização corneana (CHAHUD et al., 2009).

Neste trabalho a aplicação de 1,5 µg de ArtinM/peixe (T4) mostrou resultado inferior na taxa de sobrevivência dos animais ao comparado com a dose de 1,0 µg de ArtinM/peixe (T3). Pesquisas relatam que a utilização de doses mais elevadas de imunostimulantes pode causar imunossupressão em peixes (SAKAI, 1999). Segundo este autor, o efeito de compostos imunostimulantes é diretamente dependente de uma dose ideal, pois doses altas podem não melhorar e até mesmo inibir a resposta imunológica. Assim, a utilização de testes com diferentes doses é uma estratégia chave para a descoberta de doses que possam ser mais efetivas durante eventos associados ao estresse, tais como no transporte e no ciclo reprodutivo dos animais aquáticos (BRICKNELL; DALMO, 2005).

De modo geral, o emprego de ArtinM melhora o sistema imune inato dos animais, devido à ativação e haptotaxia de neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos (GANIKO et al., 1998; PANUNTO-CASTELO et al., 2001; MORENO et al., 2003; GANIKO et al., 2005; PEREIRA-DA-SILVA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; COLTRI et al., 2008). Segundo Carandina et al. (2009) a inoculação i.p. em tilápias do Nilo de extrato bruto de sementes de *A. integrifolia* aumentou o número de células fagocíticas no local da injúria com 24 horas. Neste ensaio, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos inoculados, exceto no grupo controle, as maiores médias de leucócitos totais no exsudato peritoneal foram obtidas com 24 horas.

Os neutrófilos são células abundantes no sangue e importantes na imunidade inata podendo reconhecer, fagocitar e destruir vários patógenos sem a ajuda da resposta adaptativa (LOYOLA et al., 2002). Ganiko et al. (1998) postularam que ArtinM induz haptotaxia de neutrófilos por interação simultânea desta lectina com uma glicoproteína na superfície do neutrófilo e com componentes da matrix extra celular da parede dos vasos. Ganiko et al. (2005) demonstraram que a laminina, presente na parede dos vasos, ao se ligar a ArtinM potencializa a atividade desta proteína em neutrófilos, promovendo a migração destas células por haptotaxia. No presente trabalho houve aumento significativo de neutrófilos na coleta do exsudato inflamatório realizada 24 horas após a inoculação nos grupos que receberam ArtinM (G2) e ArtinM e desafiados com *S. agalactiae* (G4).

Nos peixes, a composição sanguínea é dependente de fatores fisiológicos e ecológicos, tais como o sexo, estágio de desenvolvimento gonadal, estresse, infecções e desequilíbrios ambientais (MARINO et al., 2001; TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO;

PERECIN, 2002). Além disso, deve se considerar que nestes animais a resposta inflamatória não tem a mesma magnitude e nem é padronizada, como ocorre nos mamíferos (GARCIA LEME, 1989). Na coleta de sangue do vaso caudal, realizada com seis e 24 horas, após a aplicação da ArtinM não foi observada diferença significativa entre as médias de neutrófilos dos grupos estudados, o que demonstra a ação local e não sistêmica da ArtinM.

## **Conclusão**

A ArtinM, aplicada por via i.p., foi capaz de aumentar a migração de neutrófilos para esta cavidade e este processo foi dependente da concentração da proteína e do tempo, porém os mecanismos envolvidos na haptotaxia de neutrófilos devem ser avaliados posteriormente. Esta capacidade de ativar a resposta imune inata poderia ser utilizada como imunostimulante para controle de infecções na fase aguda. Este fato abre perspectivas para a utilização estratégica da proteína, principalmente nos períodos que antecedem o manejo dos peixes.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina Roque Barreira da USP de Ribeirão Preto pelas amostras de ArtinM gentilmente cedidas, imprescindíveis para a realização deste projeto.

## **Referências**

- BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G.; WOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causa e consequência (Revisão). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.
- BOYD, C. E. Water quality in ponds for aquaculture. **Alabama Agricultural Experiment Station**, Auburn University, AL, USA, 1990.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, n. 05, p. 457-472, 2005.
- CANTERI, M. G. et al. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CARANDINA, L. et al. Avaliação da ação imunomoduladora de extratos de sementes de *Artocarpus integrifolia* em infecções experimentais em tilápias do Nilo. IN: XVIII EAIC, 2009, Guarapuava. **Anais...** Guarapuava: UNICENTRO, 2009.

CHAHUD, F. et al. The lectin KM<sup>+</sup> induces corneal epithelial wound healing in rabbits. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 166-173, 2009.

COLTRI, K. C. et al. Therapeutic Administration of KM lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 2, p. 423- 432, 2008.

ENDO, M. et al. Swim bladder as a site for administration of chemical agents: application to fish immunology. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 7, p. 85-87, 1997.

GANIKO, L. et al. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM<sup>+</sup>. **Glycoconjugate journal**, v. 15, p. 527–530, 1998.

\_\_\_\_\_. Lectin KM<sup>+</sup>-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 152-163, 2005.

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

HÖLMSTROM, K. et al. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International journal of food science and technology**, v. 38, p. 255-266, 2003.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**, 5. ed. Sydney: W.W.Lippincott., p. 1120-1125, 1998.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KUBITZA, F. Qualidade do alimento, qualidade da água e manejo alimentar na produção de peixes. IN: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1997. p. 63-101.

LIS, H.; SHARON, N. Lectin as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 35-67, 1986.

LOPERA BARRERO, N. M. Tilapicultura semi-intensiva em tanques: alternativas de fertilização e produção – revisão. **Arquivos de. Ciências Veterinária e Zootecia**, v. 9, n. 1, p. 67-76, 2006.

LOYOLA, W. et al. Concanavalin A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, p. 201-208, 2002.

LOYOLA, W. **Ação protetora de extrato de sementes de *Artocarpus integrifolia* contra infecção por *Candida albicans* através do aumento das funções de fagócitos**, 2008. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

MACARTHUR, J. I. et al. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, v. 25, p. 69-81, 1984.

MARINO, G. et al. Changes in serum cortisol, metabolites, osmotic pressure and eletrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, p. 115-120, 2001.

MORENO, A. N. et al. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 132, p. 221-230, 2003.

PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, p. 1035-1042, 2001.

PEDRAZZANI, A. S. et al. Senciência e bem-estar de peixes: uma visão de futuro do mercado consumidor. **Panorama da Aquicultura**, v. 102, p. 24-29, 2007.

PEREIRA-DA-SILVA, G. et al. Neutropkil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, n. 1, p. 86-94, 2006.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

SAKAI, M. Current reserch status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, v. 172, p. 63-92, 1999.

SALVADOR, R. et al. A. Isolation and characterization of group B *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding in hapas nets and in earth nurseries in the north region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

SALVADOR, R. **Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. 136f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M. I.; PERECIN, D. Total leukocyte counts in fishes by direct or indirect methods? **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, n. 2, p. 155-161, 2002.

TEIXEIRA, C. R. et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, p. 3001-3008, 2006.

VANDAMME, P. et al. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, tipe Ib *Streptococcus*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 1, p. 81-85, 1997.

VIDAL, L.V.O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008.

**Tabela 1** – Taxa de sobrevivência em juvenis de tilápias do Nilo inoculadas por via intraperitoneal com diferentes concentrações de ArtinM e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* ( $10^6$  UFC/mL), Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, 2010.

Grupos	Taxa de sobrevivência (%)
T1 (controle)	33,3 b
T2 (0,5 µg/animal)	46,7 b
T3 (1,0 µg/animal)	63,3 a
T4 (1,5 µg/animal)	36,7 b

Percentuais de sobrevivência seguidos de letras distintas diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 2** – Número médio de leucócitos totais no exsudato inflamatório em juvenis de tilápias do Nilo inoculadas por via intraperitoneal com ArtinM, *Streptococcus agalactiae*, ArtinM e desafiadas com *S.agalactiae*, Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, Paraná, 2010.

Grupos	6 horas	*	24 horas	*
G1 (Controle)	1,6 A B	1,07	3,3 b B	2,95
G2 (ArtinM)	1,0 A C	0,67	9,1 a A	2,51
G3 ( <i>S.agalactiae</i> )	1,3 A B	1,16	7,8 a A	2,15
G4 (ArtinM+ <i>S.agalactiae</i> )	1,3 A B	1,16	8,8 a A	1,99

Médias seguidas de mesma letra minúscula para cada grupo e maiúscula para cada horário não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). \* Desvio Padrão.

**Tabela 3** – Número médio de neutrófilos na cavidade peritoneal em juvenis de tilápias do Nilo inoculadas por via intraperitoneal com ArtinM, *Streptococcus agalactiae* e com ArtinM e desafiadas com *S.agalactiae*, Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, 2010.

Grupos	6 horas	*	24 horas	*
G1 (Controle)	1,6 a B	1,07	2,8 b A	1,81
G2 (ArtinM)	1,0 a C	0,67	6,1 a A	1,52
G3 ( <i>S.agalactiae</i> )	1,3 a B	1,16	3,9 b A	1,91
G4 (ArtinM + <i>S.agalactiae</i> )	1,3 a B	1,16	4,8 a A	1,75

Médias seguidas de mesma letra minúscula para cada grupo e maiúscula para cada horário não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). \*Desvio Padrão.

**Tabela 4** – Número médio de neutrófilos no vaso caudal em juvenis de tilápias do Nilo inoculadas por via intraperitoneal com ArtinM, *Streptococcus agalactiae* e com ArtinM e desafiadas com *S.agalactiae*, Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, 2010.

<b>Grupos</b>	<b>6 horas</b>		<b>24 horas</b>	
G1 (Controle)	91,7	a A	101,4	a A
G2 (ArtinM)	99,9	a B	72,8	a B
G3 ( <i>S.agalactiae</i> )	108,0	a A	73,5	a A
G4 (ArtinM+ <i>S.agalactiae</i> )	89,1	a B	67,0	a B

Médias seguidas de mesma letra minúscula para cada grupo e maiúscula para cada horário não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que:

- A aplicação intraperitoneal de 1,0 µg da ArtinM/ peixe conferiu maior resistência em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) contra o *S. agalactiae*;
- A aplicação intraperitoneal de ArtinM induziu a haptotaxia de neutrófilos no exsudato peritoneal de juvenis de tilápias do Nilo;
- A aplicação intraperitoneal de ArtinM não induziu a haptotaxia de neutrófilos no sangue coletado do vaso caudal de juvenis de tilápias do Nilo.

**ANEXO**

## ANEXO A

## Normas de Publicação do Periódico Ciência Rural

Normas

Página 1 de 3

Revista  
Editorial  
Sobre nós





Português | Inglês

Página inicial | Artigos publicados | Assinatura | Indexação | Consultores  
Normas | Situação do artigo | Sobre nós | Submissão online | Taxas

## Normas para publicação

1. **CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os **artigos científicos**, **revisões** e **notas** devem ser encaminhados via **eletrônica** e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. **O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, quando for necessário o uso, devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito, quando apropriado, que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

4. **A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito, quando apropriado, que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e, que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

5. **A nota deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, caso existam devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito, quando apropriado, que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

## 9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

**9.4. Artigo completo:**

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Product Research*, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. *Ciência Rural*, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

**9.5. Resumos:**

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. *Anais...* Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

**9.6. Tese, dissertação:**

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

**9.7. Boletim:**

ROGIG, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

**9.8. Informação verbal:**

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

**9.9. Documentos eletrônicos:**

MATERA, J.M. **Afeções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. *Maturitas*, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

**10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos.** A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 800 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

**11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).**

**12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão.** O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

**13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).**

**14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.**

**15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.**

**16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.**

Normas

Página 3 de 3

Ciência Rural  
Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais  
Prédio 42, Sala 3104 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil  
E-mail: [cienciarural@mail.ufsm.br](mailto:cienciarural@mail.ufsm.br)  
Fone/Fax: (55) 32208698  
Fax: (55) 32208695