

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA**



RELATÓRIO FINAL:

“Purificação de imunoglobulinas, pelo método do ácido caprílico, do peixe tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei - Serrasalminidae) e da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae)”.

Camilo Alberto Corrêa de Vasconcellos Dias

Manaus
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA



RELATÓRIO FINAL:

“Perfis dos constituintes proteicos e enzimáticos dos raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae)”.

Bolsista: Camilo Alberto Corrêa de Vasconcellos Dias

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina dos Santos

Relatório final apresentado ao Comitê Científico, do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) vinculado ao Departamento de Apoio à Pesquisa, da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus

2013

Sumário

INTRODUÇÃO	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
METODOLOGIA	9
RESULTADOS.....	11
REFERÊNCIAS	15

Purificação de imunoglobulinas, pelo método do ácido caprílico, do peixe tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei - Serrasalminidae) e da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae).

Introdução: As imunoglobulinas, também conhecidas como anticorpos, são proteínas presentes na maioria dos vertebrados superiores cuja função é neutralizar patógenos e impedir que o organismo seja infectado. As imunoglobulinas vêm sendo estudadas há muito tempo e em diversas espécies. Entretanto, quando se trata de peixes da Região Amazônica, a quantidade de dados é escassa ou ausente, havendo um predomínio de pesquisas envolvendo peixes ósseos e cartilagosos de águas salgadas.

Objetivos: Utilizar ácido caprílico para isolar e então caracterizar as imunoglobulinas de dois representantes da superclasse Gnathostomata, comuns na Região Amazônica: a arraia *Plesiotrygon iwamae*, representante dos Chondrichthyes (cartilagosos) e o peixe *Colossoma macropomum*, representante dos Osteichthyes (ósseos).

Metodologia: As amostras de sangue foram coletadas de animais adultos e jovens da espécie *Colossoma macropomum* no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e as amostras da espécie *Plesiotrygon iwamae* foram cedidas pelo Prof. Dr. Wallace Luiz Duncan Paxiúba, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As amostras de plasma foram armazenadas a -20°C até a utilização. Utilizou-se a metodologia de precipitação com ácido caprílico. O grau de pureza das imunoglobulinas foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, em amostras com e sem redução.

Resultados: Houve uma redução no número de bandas das amostras após a utilização de ácido caprílico e com separação de bandas pesadas em bandas mais leves com a redução pelo 2-mercaptoetanol. As bandas encontradas nas amostras purificadas de *Colossoma macropomum* apresentaram massas moleculares aproximadas de: 230 kDa, 190 kDa, 70 kDa, 60-45 kDa, 40 kDa, 30 kDa. As bandas encontradas nas amostras purificadas de *Plesiotrygon iwamae* apresentaram massas moleculares de aproximadamente: 57 kDa, 27 kDa, 19 kDa.

Discussão: A redução no número de bandas denota uma precipitação das proteínas plasmáticas com exceção das imunoglobulinas, como a diferenciação de bandas pesadas nas amostras sem a adição de 2-mercaptoetanol em bandas mais leves após a redução das cadeias das imunoglobulinas pelo agente redutor. As massas moleculares dessas bandas foram semelhantes às encontradas por outros autores em espécies diferentes de peixes ósseos e cartilagosos.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, *Plesiotrygon iwamae*, imunoglobulinas, ácido caprílico.

INTRODUÇÃO

A evolução do sistema imune permitiu o desenvolvimento, adaptação e a perpetuação de espécies animais e em todos os habitat terrestres e aquáticos (COOPER, 2010). Tal sistema vem sendo estudado com muito afinco em diversas espécies animais, com a finalidade de elucidar mecanismos, componentes celulares e moleculares que possam explicar como a evolução ocorreu e influenciou no desenvolvimento da imunidade dos vertebrados (BAILEY et al., 2013).

Didaticamente o Sistema Imune está dividido em dois tipos: Inato e Adaptativo. Tem-se como verdade que a imunidade adaptativa como conhecemos, com recombinação gênica VDJ, que dá origem a diversidade de imunoglobulinas (secretadas), de receptores de linfócitos T (TCR) e B (BCR- imunoglobulina de membrana), surgiu com os primeiros vertebrados mandibulados (gnatostomos) (TAKEZAKI et al., 2003), os placodermos, de acordo com descobertas feitas, no final do século passado (SCHLUTER et al., 1999). Os primeiros representantes com esse maquinário genético (VDJ) foram os peixes cartilagosos, seguidos pelos peixes ósseos (FLAJNIK, 2010). Exemplos de peixes cartilagosos são tubarões, arraias, quimeras, e de peixes ósseos, salmonídeos, bagres, pirarucu, tambaqui, dentre outros.

O presente trabalho tem por finalidade isolar e caracterizar as imunoglobulinas de dois representantes da superclasse Gnathostomata, comuns na Região Amazônica: a arraia *Plesiotrygon iwamae*, representante dos Chondrichthyes (cartilagosos) e o peixe *Colossoma macropomum*, representante dos Osteichthyes (ósseos).

A arraia *Plesiotrygon iwamae* é um dos animais presentes nos rios da Bacia Amazônica com potencial de causar acidentes em humano. Isto ocorre devido à presença de ferrões em sua cauda com veneno, cujas propriedades ainda não foram totalmente elucidadas (LUCETTI et al., 2008). Em trabalho recente elaborado por pesquisadores de nosso grupo foi demonstrado que os mucos presentes no ferrão e no dorso de *Plesiotrygon iwamae* causam miotoxicidade local e sistêmica (VARJÃO-LAMEIRAS, 2013).

O tambaqui ou cachama (*Colossoma macropomum*) é um dos peixes de água-doce mais importantes da região Amazônica, e vem recebendo um grande valor econômico

dado à rentabilidade de sua criação em piscicultura, não restrita apenas à região Norte do Brasil (SALAZAR-LUGO et al., 2009).

Existem diversos trabalhos sobre os peixes Amazônicos citados, entretanto, visando principalmente aspectos da criação em cativeiro, no caso do *Colossoma macropomum*, (SALAZAR-LUGO et al., 2009) e a importância epidemiológica das arraias, com análises das propriedades de seus venenos (MAGALHÃES et al., 2008; NETO; HADDAD, 2009), ficando os componentes do sistema imune de ambas as espécies sem estudos. Em pesquisas realizadas nos bancos de dados: *Scopus*, *Scirus*, *Pubmed* e *SciVerse*, buscando dados de janeiro de 1987 até julho de 2013, não foram encontradas referências bibliográficas referentes às imunoglobulinas ou ao sistema imune das duas espécies alvo desta pesquisa.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O sistema imune adaptativo tem nas imunoglobulinas, também chamadas de anticorpos, uma das ferramentas mais eficazes quando se trata de neutralizar patógenos e impedir a sua disseminação no organismo. As imunoglobulinas são produzidas pelos linfócitos B1 ou B2, sendo expressas em sua superfície como receptores de antígenos ou, então, secretadas por essas células transformadas em plasmócitos (KENNEDY, 2010).

Há cinco classes de imunoglobulinas descritas para os seres humanos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e seis subclasses IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Entretanto, existem diferentes classes de imunoglobulinas, além dessas cinco, presentes em outras espécies animais como nos peixes Osteichthyes e Chondrichthyes. Nos ósseos foram descritas IgM (LLOYD-EVANS, 1993; BAGCHI et al., 2010), IgD (EDHOLM et al., 2010), IgT/IgZ (DANILOVA et al., 2005; HANSEN et al., 2005; ZHANG et al., 2010). Nos peixes cartilagosos, mais primitivos na escala evolutiva, foram descritas três classes de imunoglobulinas: IgNARC/IgX/IgW (DOOLEY, 2006; FLAJNIK, 2010), IgM (DOOLEY, 2006) e IgNAR (DOOLEY, 2006). Entretanto, o número de espécies estudadas tendo suas imunoglobulinas descritas ainda é pequeno e restrito às espécies não-Amazônicas.

O uso do ácido caprílico para precipitar as proteínas do soro, que não sejam imunoglobulinas, foi feito pela primeira vez por STEINBRUCH e AUDRAN (1969). O método foi eficiente para separar os anticorpos, devido ao seu baixo custo e maior rapidez (PEROSA et al., 1990). Entretanto, a metodologia não foi capaz de isolar todas as classes de imunoglobulinas (OGDEN; LEUNG, 1988). Diversos trabalhos já foram realizados utilizando tal metodologia com a finalidade de purificar imunoglobulinas a fim de caracterizar parcial ou totalmente (ATANASSOV; BOTEV, 1988; OGDEN; LEUNG, 1988; PEROSA et al., 1990).

WHITTINGTON (1993) caracterizou parcialmente imunoglobulinas da perca europeia (*Perca fluviatilis* L.), identificando uma população de imunoglobulinas de alto peso molecular (HMW) variando entre 730-800 kDa, com características de tetrâmero e uma população de baixo peso molecular (LMW) variando entre 220, 180 e 125 kDa. BAGCHI e colaboradores (2010) purificaram com sulfato de amônio e caracterizando IgM do bagre indiano (*Clarias batrachus*), encontrando anticorpos com 189 kDa,

confirmados pelo de anti-IgM obtidos para *Clarias batrachus*, com fragmentos de 189, 55 e 27 kDa.

Em outro estudo (MORRISON; NOWAK, 2001), com a espécie *Pagrus auratus*, o método de escolha para isolar as imunoglobulinas foi cromatografia de afinidade com proteína estafilocócica A, utilizando proteínas reduzidas e não-reduzidas em SDS-PAGE. Sem redução, foi encontrada uma população de imunoglobulinas com massa molecular de 766 kDa, que ao ser reduzida, apresentou duas cadeias pesadas com 71,8 e 67,7 kDa e duas cadeias leves com 30,2 e 29,0 kDa.

TOMONAGA e colaboradores (1984) e KOBAYASHI et al. (1984) analisaram amostras da espécie *Raja kenoei* e identificaram duas classes de imunoglobulinas, uma IgM de com massa molecular de 840 kDa e a outra com 320 kDa, utilizando SDS-PAGE.

Há uma grande quantidade de estudos mostrando as diferentes classes de imunoglobulinas isoladas de peixes sendo a grande maioria dessas pesquisas realizadas com peixes ósseos ou cartilagosos marinhos (DIAZ et al., 1998; ANDERSON et al., 1999), existindo uma lacuna no conhecimento sobre os peixes de água doce, especialmente os da região Amazônica.

Portanto o presente trabalho tem por finalidade isolar, pelo método do ácido caprílico, e caracterizar as imunoglobulinas presentes no tambaqui (*Colossoma macropomum*) e na arraia (*Plesiotrygon iwamae*), pois, além de ampliar os conhecimentos sobre os componentes do sistema imune de peixes, poderemos estimular o desenvolvimento de testes imunoenzimáticos, para o acompanhamento de esquemas de vacinação, usados frequentemente na piscicultura.

METODOLOGIA

Levantamento bibliográfico - para o levantamento bibliográfico, foram utilizadas as palavras-chaves: *Colossoma macropomum*; *immunoglobulin*; *IgM*; *IgT*; *antibody*; *antibodies*; *plesiotrygon iwamae*; *elasmobranchs*; *ray*; *fish*; *immune system*, nos bancos de dados *SciVerse*, *Scopus*, *Pubmed*, *Scirus*, no período de janeiro de 1987 a julho de 2013.

Coleta das amostras sangue de *Colossoma macropomum*

As amostras de sangue foram coletadas pelo MSc. Eduardo Ono, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os animais foram coletados dos tanques de criação, com auxílio de uma peneira (seis filhotes) ou com malhadeira (cinco adultos). Os animais foram anestesiados e, para isso, foram transferidos para tanques contendo Eugenol (Biodinâmica®, gentilmente cedido pelo Dr. Eduardo), na concentração de 50µL/L (filhotes) ou de 80µL/L (adultos). Após os animais se mostrarem anestesiados (flutuação lateral), foram pesados e tiveram amostras de sangue colhidas, na presença de heparina (Liquemine, Roche), da veia caudal. As amostras de sangue coletadas foram mantidas em geladeira a 4°C, por 24 horas e depois, centrifugadas 6.000rpm, a 25°C, por 5 minutos para a obtenção dos plasmas. As amostras individuais de plasmas foram armazenadas a -20°C, até o momento do uso.

Coleta da amostra de sangue de *Plesiotrygon iwamae*

A amostra de plasma de *Plesiotrygon iwamae*, gentilmente cedida pelo Professor Doutor Wallace Luiz Duncan Paxiúba, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), foi mantida a 20°C até o momento de uso.

Purificação das imunoglobulinas – A purificação das imunoglobulinas presentes nos plasmas foi realizada pelo método descrito por STEINBUCH E AUDRAN (1969) e modificado por DOS-SANTOS e colaboradores, em 1989. O pH das amostras de plasmas foi aferido para 5,0 com ácido acético 0,1M e, então, adicionou-se o ácido caprílico (Merck, Darmstadt) na concentração final de 87%, sob agitação por 30 min a temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm, os sobrenadantes foram filtrados em uma membrana de 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730) e estocados -20°C, até o momento do uso.

Análise das imunoglobulinas – o grau de pureza das imunoglobulinas, obtidas das espécies *Plesiotrygon iwamae* e *Colossoma macropomum*, foi verificado pelo método de eletroforese, em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme protocolo usado em LAEMMLI (1970). Foram aplicados 30 µl de cada amostra, no gel de poliacrilamida na concentração de 7,5%, sob condições redutoras e não-redutoras. Antes da eletroforese, as amostras foram misturadas na proporção de 1:1 (v/v) com os respectivos tampões de amostra na presença ou não de 2-mercaptoetanol. Miosina (205kD), β-galactosidase (121kD), Albumina (86kD), Ovalbumina (50,7kD), Anidrase carbônica (33,6kD), Inibidor soja tripsina (27,8kD), Lisozima (19,4kD) e Aprotinina (7,4kD) (Bio Rad Prestained Marker, Standards Broad Range, USA) foram usados como marcadores de massa molecular. Os géis foram corados com Coomassie brilhante Blue (Bio-Rad).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levantamento bibliográfico – para o período de janeiro de 1987 a julho de 2013, não foram encontradas referências bibliográficas quanto à purificação ou caracterização de imunoglobulinas de *Colossoma macropomum* ou de *Plesiotrygon iwamae*. A revisão buscou dados sobre espécies de peixe cujas imunoglobulinas já foram isoladas e/ou caracterizadas a fim de fornecer informações para discussão dos resultados.

Coleta das amostras de sangue de *Colossoma macropomum*: No Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com o auxílio do MSc Eduardo Ono, foram coletados dados sobre os animais que participaram do presente estudo. Os dados coletados incluíram peso e estágio de desenvolvimento, mostrados na Tabela 1. As amostras de sangue foram reunidas de acordo com o estágio de desenvolvimento: jovens, identificada pelo número 1 e adultos, identificada pelo número 2.

Tabela 1- Pesos e fases do desenvolvimento dos *Colossoma macropomum* utilizados no estudo

Animal	Tamanho	Peso
#1	Filhote	111g
#2	Filhote	118g
#3	Filhote	67g
#4	Filhote	102g
#5	Filhote	137g
#6	Filhote	95g
Média		105g
#7	Adulto	1462g
#8	Adulto	967g
#9	Adulto	1464g
#10	Adulto	1467g
#11	Adulto	1377g
Média		1347,4g

Massas moleculares do plasma de *Colossoma macropomum*: À análise do gel de eletroforese e SDS-PAGE (Figura 1) mostrou que as amostras de plasma (PG1 e PG2) apresentaram uma redução no número de bandas após a purificação com ácido caprílico, indicando que houve precipitação de proteínas do soro, que não as imunoglobulinas. Observou-se que ao fazer a redução com 2-mercaptoetanol o número de bandas aumentou, com uma diminuição das massas moleculares identificadas.

As bandas encontradas após a purificação pelo ácido caprílico foram semelhantes em ambos os grupos, tanto dos jovens quanto dos animais adultos, sem a redução (FG1NR e FG2NR), com uma massa aproximada de: 230 kDa, 190 kDa, 70 kDa*, 60-45 kDa, 40 kDa, 30 kDa*. (*= encontradas no grupo dos animais adultos e não nos jovens)

Com a redução, as bandas do FG1R diferiram das bandas do grupo de animais jovens sem redução, mostrando bandas com aproximadamente 80 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 60-53 kDa, 48-35 kDa, 28 kDa, 7,5 kDa. No grupo de animais adultos, após a redução da amostra filtrada e purificada pelo ácido caprílico, o resultado foi similar ao de FG1R, com o acréscimo de bandas de aproximadamente 34 kDa e 32 kDa.

Tais achados indicam que as imunoglobulinas isoladas, na presença de 2-mercaptoetanol, tiveram suas cadeias pesadas dissociadas das cadeias leves.

Resultados semelhantes foram encontrados em outras espécies de teleósteos, como *Latris lineata*, que apresentou imunoglobulinas íntegras com massa acima de 205 kDa e que, após a dissociação das cadeias pesadas das cadeias leves, apresentaram massas moleculares de aproximadamente 86 kDa e 28 kDa, respectivamente (COVELLO et al., 2009), a perca europeia, *Perca fluviatilis* L., cujas imunoglobulinas apresentaram cadeias leves na faixa de 27-28 kDa e pesadas de 72 kDa (WHITTINGTON, 1992), a *Scyliorhinus canícula*, com cadeias pesadas de 70 kDa e leves de 25 kDa, com uma massa molecular de 160-200 kDa sem a redução pelo 2-mercaptoetanol (LLOYD-EVANS, 1993).

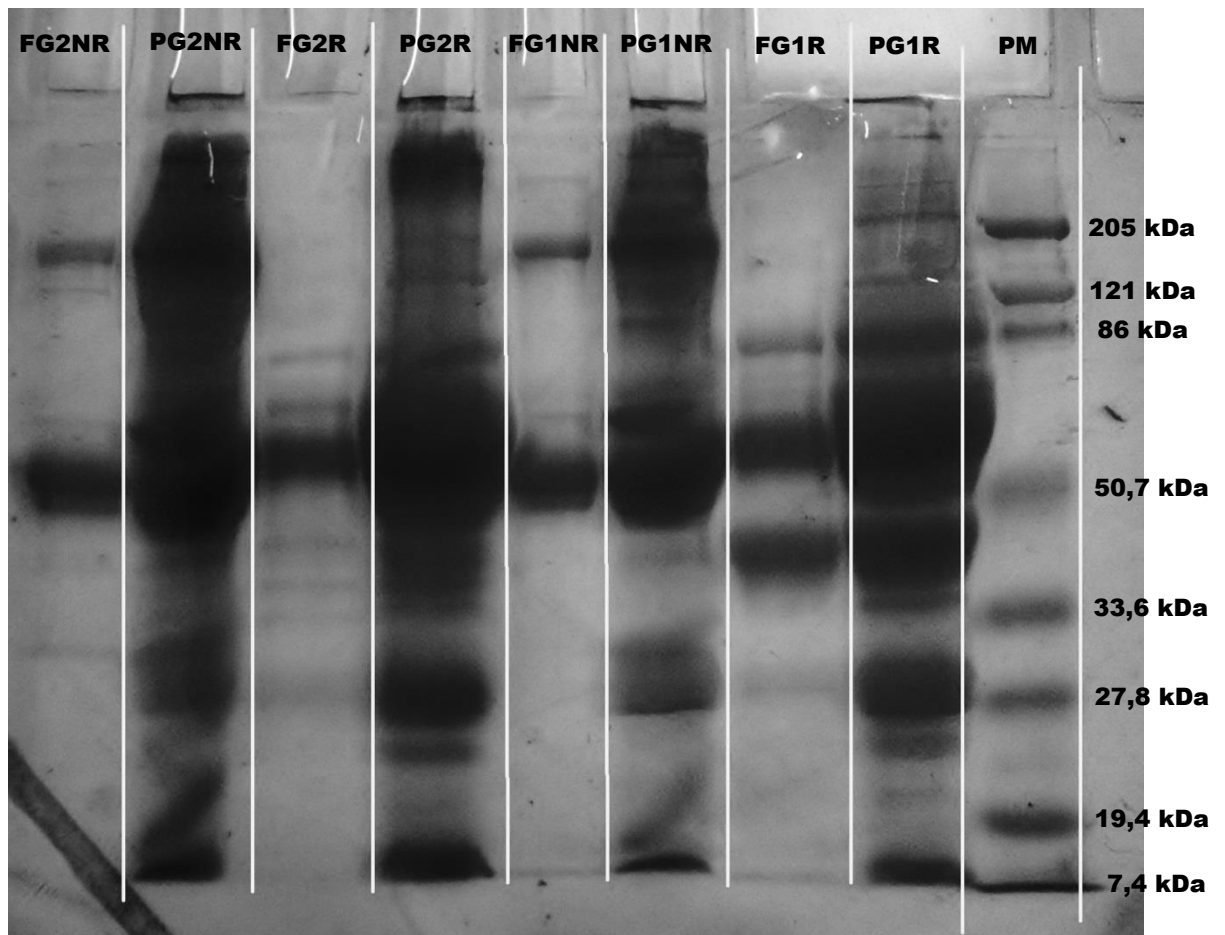


Figura 1 - Gel de eletroforese com amostras de *Colossoma macropomum*. PM= peso molecular BioRad®; PG1R= amostras íntegras do plasma do grupo jovem com redução; FG1R= amostra filtrada e purificada do grupo jovem com redução; PG1NR= amostras íntegras do plasma do grupo jovem sem redução; FG1NR= amostra filtrada e purificada do grupo jovem sem redução; PG2R= amostras íntegras do plasma do grupo adulto com redução; FG2R= amostra filtrada e purificada do grupo adulto com redução; PG2NR= amostras íntegras do plasma do grupo adulto sem redução; FG2NR= amostra filtrada e purificada do grupo adulto sem redução.

Massas moleculares do plasma de *Plesiotrygon iwamae*: No gel de eletroforese na presença de SDS (SDS-PAGE - Figura 2) foi identificada uma redução no número de bandas após a precipitação com o ácido caprílico, similar ao resultado obtido com as amostras de *Colossoma macropomum* (Fig.1) demonstrando que houve precipitação das proteínas plasmáticas, exceto as imunoglobulinas.

Nas amostras precipitadas com o ácido caprílico, evidenciou-se a presença de uma banda de massa molecular acima da faixa de 205 kDa, que não pôde ser quantificada, de bandas entre 65 e 40 kDa e uma banda fraca entre 19 e 30 kDa.

Ao comparar a amostra precipitada pelo ácido caprílico sem redução com a amostra reduzida pelo 2-mercaptoetanol, evidenciou-se o desaparecimento da banda acima da faixa de 205 kDa e o surgimento de mais bandas entre o intervalo de 50,7 kDa e 86 kDa, que, em uma análise preliminar, tem uma massa molecular de aproximadamente

54 kDa. Houve também o surgimento de bandas mais fortes próximo às faixas de 23 e 30 kDa.

Essa mudança também foi detectada nas amostras íntegras de plasma, com e sem a redução, sendo compatível com a ação do 2-mercaptoetanol sobre imunoglobulinas de dissociar as cadeias pesadas das cadeias leves.

Assim como os resultados com o *Colossoma macropomum*, os resultados encontrados com a espécie *Plesiotrygon iwamae* é consistente com os dados encontrados na literatura a respeito de imunoglobulinas de peixes cartilagosos.

A espécie *Raja kenoei* possui anticorpos com uma cadeia pesada de aproximadamente 45-50 kDa, assim como uma massa de 320 kDa antes da dissociação das cadeias pesadas das leves (KOBAYASHI et al., 1984). A espécie *Clamydoselachus anguineus* possui uma imunoglobulinas com massas de 900 kDa, 300 kDa e 150 kDa, que quando dissociadas pelo 2-mercaptoetanol apresentam-se como bandas de 68 kDa e 45-50 kDa (cadeias pesadas) e 22-24 kDa (cadeias leves) (KOBAYASHI et al., 1992). Imunoglobulinas isoladas de *Ginglymostoma cirratum* foram medidas e à análise, apresentaram cadeias pesadas de 50 kDa, 72 kDa e leves de 23 kDa (FULLER et al., 1978).

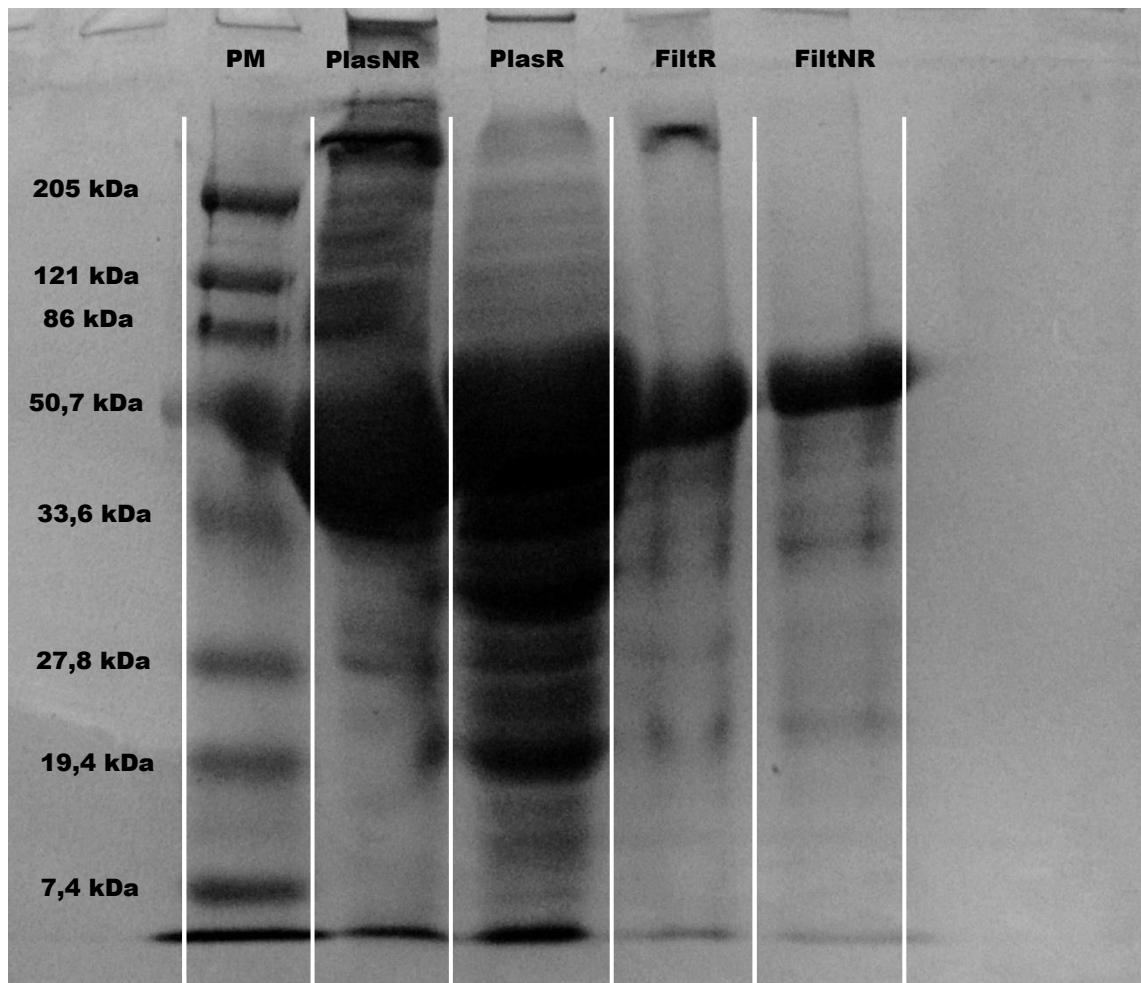


Figura 2 - Gel de eletroforese com amostras de *Plesiotrygon iwamae*. PM= peso molecular BioRad®; PlasNR= amostras íntegras do plasma sem redução; PlasR= amostras íntegras do plasma com redução; FiltNR= amostras filtradas com o ácido caprílico sem redução; FiltR= amostras filtradas com o ácido caprílico com redução.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados são consistentes com o esperado do projeto e com os dados presentes na literatura. Houve uma redução do número de bandas após o uso do ácido caprílico nas amostras de plasmas e uma substituição de bandas pesadas por bandas mais leves após a utilização do 2-mercaptoetanol, que age quebrando as ligações entre as cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas. Isso indica que o ácido caprílico foi capaz de isolar as imunoglobulinas das amostras de plasma após a precipitação das outras proteínas plasmáticas.

Mais estudos estão em andamento a fim de complementar os resultados encontrados por esta pesquisa, de modo que as imunoglobulinas isoladas pelo uso do ácido caprílico possam ser devidamente caracterizadas, tanto em massa molecular quanto em sua composição de aminoácidos.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. K.; STRONG, S. J.; LITMAN, R. T.; LUER, C. A.; AMEMIYA, C. T.; RAST, J. P., *et al.* **A long form of the skate IgX gene exhibits a striking resemblance to the new shark IgW and IgNARC genes.** Immunogenetics, v. 49, p. 56-67, 1999.

ATANASSOV, C. L.; BOTEV, B. A. **Isolation and parcial 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 Phisiology, v. 89B, n. 4, p. 737-741, 1988.

BAGCHI, R. A.; PARIKH, P. H.; ROY, N.; PEHLATHIA, R.; MUKHERJEE, J.; BAGCHI, A. K. **Purification and Characterisation of Indian catfish (*Clarias batrachus*) IgM.** World Journal of Zoology, v. 5, n. 3, p. 205-209, 2010.

BAILEY, M.; CHRISTOFORIDOU, Z.; LEWIS, M. **Evolution of immune systems: Specificity and autoreactivity.** Autoimmunity Reviews, v. 12, n. 6, p. 643-647, 2013.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

COOPER, E. L. **Evolution of immune systems from self/not self to danger artificial immune systems (AIS).** Physics of Life Reviews, v. 7, n. 1, p.55-78, 2010.

COVELLO, J. M.; MORRISON, R. N.; BATTAGLENE, S. C.; NOWAK, B. F. **Purification and partial characterisation of striped trumpeter (*Latris lineata*) systemic immunoglobulin for the purpose of polyclonal anti-serum production.** Aquaculture, v. 287, p. 11-17, 2009.

DANILOVA, N.; BUSSMANN, J.; JEKOSCH, K.; STEINER, L. A. **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, 2005.

DIAZ, M.; GREENBERG, A. S.; FLAJNIK, M. K. **Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does not generate the**

repertoire: possible role in the antigen-driven reactions in the absence of germinal centers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 95, n. 24, p. 14343-14348, 1998.

DOOLEY, H.; FLAJNIK, M. F. **Antibody repertoire development in cartilaginous fish.** Developmental and Comparative Immunology, v. 30, p. 43-56, 2006.

DOS SANTOS, M. C.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; FURTADO, G. C.; COLLETO, G. M. D. D.; KIPNIS, T. L.; DIAS DA SILVA, W. **Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: A fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield.** Toxicon, v. 27, n. 3, p. 297-303, 1989.

EDHOLM, E.S.; BENGTEEN, E.; STAFFORD, J.L.; SAHOO, M.; TAYLOR, E.B.; MILLER, N.W.; WILSON, M. **Identification of two IgD⁺ B cell populations in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*.** Journal of Immunology, v. 185, n. 7, p. 4082-4094, 2010.

FLAJNIK, M. F. **All GOD's creatures got dedicated mucosal immunity.** Nature Immunology, v. 11, p. 777-779, 2010.

FULLER, L.; MURRAY, J.; JENSEN, J. A. **Isolation from nurse shark serum of immune 7S antibodies with two different molecular weight H-chains.** Immunochemistry, v. 15, p. 251-259, 1978.

HANSEN, J. D.; LANDIS, E. D.; PHILLIPS, R. D. **Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, p. 6919-6924, 2005.

KENNEDY, M. A. **A Brief Review of the Basics of Immunology: the Innate and Adaptive Response.** Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v. 40, p. 369-379, 2010.

KOBAYASHI, K.; TOMONAGA, S.; KAJII, T. **A second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of a cartilaginous fish, the skate, *Raja kenoei*: Isolation and Characterization.** Molecular Immunology, v. 21, n. 5, p. 397-404, 1984.

KOBAYASHI, K.; TOMONAGA, S.; TANAKA, S. **Identification of a second immunoglobulin in the most primitive shark, the frill shark, *Chlamydoselachus anguineus***. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 16, n. 4, p. 295-299, 1992.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LLOYD-EVANS, P. **Development of the lymphomieloid system in the dogfish *Scyliorhinus canicular***. *Developmental and Comparative immunology*, v. 17, p. 501-514, 1993.

LLOYD-EVANS, P. **Purification and characterization of high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) immunoglobulins from the serum of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*, and the identification of antibody forming tissues**. *International Journal of Biochemistry*, v. 25, n. 12, p. 1823-1833, 1993.

LUCHETTI, N.; MARQUES, F.; CHARVET-ALMEIDA, P. **A new species of *Potamotrygonocestus* Brooks & Thorson, 1976 (Eucestoda: Tetraphyllidea) from *Plesiotrygon iwamae* Rosa, Castello & Thorson (Myliobatoidea: Potamotrygonidae) and a redescription of *Potamotrygonocestus chaoi* Marques, Brooks & Araujo, 2003**. *Systematic Parasitology*, v. 70, n. 2, p. 131-145, 2008.

MAGALHÃES, M. R.; SILVA JR, N. J.; ULHOA, C. J. **A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization**. *Toxicon*, v. 51, p. 1060–1067, 2008.

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

NETO, G.; HADDAD J. V. **Acidentes por raias**. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CM, Haddad Jr V, (orgs) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2ª edição, São Paulo: Editora Sarvier; p. 295-305. 2009.

OGDEN, J. R.; LEUNG, K. **Purification of murine monoclonal antibodies by caprylic acid**. *Journal of Immunological Methods*, v. 111, p. 283-284, 1988.

PEROSA, F.; CARBONE, R.; FERRONE, S.; DAMMACCO, F. **Purification of immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate.** Journal of Immunological Methods, v. 128, p. 9-16, 1990.

SALAZAR-LUGO, R.; ESTRELLA, A.; OLIVEROS, A.; ROJAS-VILLARROEL, E.; DE-B, L. V.; LEMUS, M. **Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 27, p. 321-326, 2009.

SCHLUTER, S. F.; BERNSTEIN, R. M.; BERNSTEIN, H.; MARCHALONIS, J. J. **'Big Bang' emergence of the combinatorial immune system.** Developmental and Comparative Immunology, v. 23, p. 107-111, 1999.

STEINBUCH, M.; AUDRAN, R. **The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v.134, p. 279-284, 1969.

TAKEZAKI, N.; FIGUEROA, F.; ZALESKA-RUTCZYNSKA, Z.; KLEIN, J. **Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes.** Molecular Biology and Evolution, v. 20, p. 287-292, 2003.

TOMONAGA, S.; KOBAYASHI, K.; KAJII, T.; AWAYA, K. **Two populations of immunoglobulin-forming cells in the skate *Raja kenojei*: their distribution and characterization.** Developmental And Comparative Immunology, v. 8, p. 803-812, 1984.

ZHANG, Y.; SALINAS, I.; SUNIER, J. O. **Recent findings on the structure and the function of teleost IgT.** Fish and Shellfish Immunology, v. 31, n. 5, p. 627-634, 2010.

WHITTINGTON, R. J. **Purification and parcial characterization of serum immunoglobulin of the European perch (*Perca fluviatilis L.*).** Fish and Shellfish Immunology, v. 3, p. 331-343, 1993.