



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015014154-8 A2

(22) Data do Depósito: 16/06/2015

(43) Data da Publicação: 27/12/2016



* B R 1 0 2 0 1 5 0 1 4 1 5 4 A

(54) **Título:** RAÇÕES NUTRACÊUTICAS E SEUS USOS

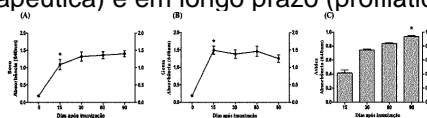
(51) **Int. Cl.:** A23K 1/16; A23L 3/3571

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** SILAS FERNANDES ETO; ANTONIO KUSUO ETO; FLÁVIO RUAS DE MORAES; JULIETA RODINI ENGRÁCIA DE MORAES; JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR; DAYANNE CARLA FERNANDES; GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO; ADRIANO MARQUES GONÇALVES; LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS SANTOS; ROGÉRIO SALVADOR; ADELINA NAOMI ETO; TIAGO SANTANA BALBUENA

(74) **Procurador(es):** FABIOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** RAÇÕES NUTRACÊUTICAS E SEUS USOS. A presente invenção refere-se a rações nutracêuticas contendo anticorpos policlonais IgY contra infecções bacterianas para uso terapêutico e profilático em organismos aquáticos. A tecnologia consiste na produção de uma ração nutracêutica, por meio da adição de anticorpos policlonais da classe IgY extraídos da gema de galinhas poedeiras, específica para proteínas de membranas bacterianas, por adsorção das moléculas na água. A funcionalidade da tecnologia é baseada em dois eventos: o primeiro é a absorção via oral e posteriormente sistêmica da imunoglobulina Y, e o segundo é a opsonização, neutralização da aderência e colonização do microrganismo nas células e tecidos alvos. Portanto sua aplicação é fundamentada na proteção imediata (terapêutica) e em longo prazo (profilática).



RAÇÕES NUTRACÊUTICAS E SEUS USOS

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Química, Farmácia, Medicina veterinária, Patologia animal e, mais especificamente, nas áreas de engenharia do alimento e produtos alimentícios especialmente adaptados para animais uma vez que se refere a rações nutracêuticas contendo anticorpos policlonais IgY contra infecções bacterianas para uso terapêutico e profilático em organismos aquáticos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Existem atualmente duas alternativas para o tratamento das infecções microbianas em peixes de água doce e marinho. Profilático com o uso de vacinas ativas, bacterinas ou compostas de proteínas de membrana ou citoplasmática de células bacterianas. Entretanto o manejo vacinal além de gerar custos na produção com alvenaria, equipamento e mão de obra, gera também níveis de estresse no peixe, respondendo com o aumento dos níveis plasmáticos de cortisol resultando na depressão do sistema imune e baixa resposta vacinal. O segundo método é o terapêutico com o uso de antibiótico na água, que representa um risco potencial na geração de resistência microbiana afetando organismos aquáticos, mamíferos, aves e humano.

[003] A oxitetraciclina é um dos antibióticos usados para o tratamento de bacterioses em peixes marinhos e de água doce; entretanto dois genes de resistência foram encontrados *tet* (M) e *tet* (S) em 151 isolados bacterianos intestinais de peixes marinhos cultivados no Japão e na Coreia. Entre os isolados foram encontrados, *Vibrio sp.*,

Lactococcus garvieae, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e outras bactérias Gram-negativas não identificadas.

[004] O uso de anticorpo IgY extraído da gema do ovo de galinhas poedeiras representa alternativa promissora no tratamento de bacterioses em organismos aquáticos. A inoculação via oral e intra-celomática em *rainbow trout* com anticorpos IgY específicos para antígenos bacterianos de *Vibrio anguillarum* protegeu os peixes com taxa de sobrevivência de 70% no grupo tratado.

[005] A produção de IgY tem baixo custo, pode ser produzida em grandes quantidades e não é necessário sacrificar a ave para obtê-la. Um ovo possui em média 100 mg de IgY na gema. Sabendo-se que as galinhas poedeiras produzem mais de 20 ovos por mês, a produção de IgY em 30 dias pode facilmente chegar a valores maiores de 2 g por animal.

[006] A transferência passiva de IgY como profilático contra doenças infecciosas neutraliza a aderência de agentes microbianos aos tecidos alvos, como observado em estudos sobre a profilaxia de diarreia de leitões por *Escherichia coli*, em úlcera gástrica causada por *Helicobacter pylori*, em micoses causadas por *Candida albicans*, a cinomose de cães e contra toxinas de venenos de animais peçonhentos. No Japão o tratamento com anticorpos da classe IgY, específicos para antígenos de *Edwardsiella*, administrados diretamente na água, conferiu níveis relevantes de proteção em enguias japonesas. Em trutas arco-íris a administração de IgY, anti-*Yersinia ruckeri* na ração resultou na proteção contra a infecção.

[007] A presente invenção é baseada na absorção via mucosa intestinal ou braquial das imunoglobulinas Y específicas para o patógeno microbiano, evitando o manejo vacinal ativo, via intracelomática. Portanto, a invenção proposta tem por objetivo diminuir o estresse vacinal, gerando a zona de bem estar animal e por consequência diminuir o custo do manejo imunoprofilático na cadeia produtiva do pescado, através da adição de anticorpos específicos para o patógeno na ração de organismos aquáticos e a adsorção das moléculas na água, evitando também o uso indiscriminado de antibióticos na água, minimizando a resistência microbiana e os efeitos residuais na carne. Além disso, a tecnologia engloba três cadeias produtivas, avicultura, maricultura e piscicultura, com a agregação dos valores na produção de ovos, fomentando tais cadeias de produção, resultando em acréscimo na economia global.

ESTADO DA TÉCNICA

[008] Os documentos (US2007104856; US2008199568; WO2010061018 e JP2005022206) referem-se ao acoplamento de nutrientes nutracêuticos na ração de animais de produção e companhia, com a finalidade de potencializar o sistema imunológico; entretanto para a funcionalidade das invenções citadas, é necessário que as mesmas sejam ingeridas, mas animais em estado patológico geralmente não se alimentam e, estritamente no caso de animais de produção como os peixes, os animais enfermos têm que submergir ou emergir pela competição de alimento e isso resulta em gastos energéticos. Além disso, os macro e micro nutrientes inseridos na ração dos inventos citados apenas têm a função

de gerar a bioenergética celular e não têm efeito protetor imediato dependendo do tempo de resposta do sistema imune do hospedeiro. Em contra partida, nenhuma das invenções tem o potencial de proteção imediata ou até mesmo profilática, já que não se trata de gerar proteção específica como ocorre na vacinação ativa. E nenhuma das referidas invenções é composta de anticorpos, que difere dos nutracêuticos citados por terem efeito em animais enfermos que não estejam se alimentado através da absorção braquial por difusão passiva da imunoglobulina dissolvida na água em organismos aquáticos. A tecnologia de acoplamento dos anticorpos difere das demais invenções por ser acoplada à ração protegida por micro vesículas lipídicas que mantêm sua isoforma molecular íntegra (sem sofrer alterações físicas ou químicas) e permitem que uma porcentagem das moléculas se dissolva na água, possibilitando a absorção passiva pelos peixes enfermos.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[009] A presente invenção refere-se a rações nutracêuticas contendo anticorpos policlonais IgY contra infecções bacterianas para uso terapêutico e profilático em organismos aquáticos. A tecnologia consiste na produção de uma ração nutracêutica, através da adição de anticorpos policlonais da classe IgY, extraídos da gema de galinhas poedeiras, específicos para proteínas de membranas bacterianas e exotoxinas, por adsorção das moléculas na água. A funcionalidade da tecnologia é baseada em dois eventos: o primeiro é a absorção via oral e posteriormente sistêmica da imunoglobulina Y, e o segundo é a opsonização, neutralização da aderência e colonização do microrganismo

nas células e tecidos alvos. Portanto, sua aplicação é fundamentada na proteção imediata (terapêutica) e em longo prazo (profilática).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[010] A Figura 1 representa graficamente a dinâmica e avaliação da produção dos anticorpos IgY específicos no soro e na gema de galinhas poedeiras imunizadas com proteínas citoplasmáticas e de membrana de *Phdp*; (A e B) Produção sistêmica de anticorpos no soro e taxa de transferência para a gema (n=7) em diferentes intervalos de tempo (0-90 dias), imunizadas com quatro doses do antígeno nos intervalos de 0, 15, 45 e 75 dias; (C) Potencial de avidéz dos anticorpos específicos, produzidos no pool de soro (n=7) nos intervalos entre 15, 30, 60 e 90 dias após as imunizações; cada ponto representa a média de sete análises (*), diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos de observação.

[011] A Figura 2 mostra o *Western blot* para a determinação da especificidade da IgY para as proteínas celulares microbianas de *PhPD*; (A) Gel de SDS-PAGE (SDS 9%) amostras das frações protéicas, aplicadas no volume de 30 μ l por poço na concentração de 7,7 μ g, a distribuição numérica das amostras é similar nas duas figuras (A e B); (P) Padrão de proteína Bio-Rad Precision Plus - (1) Fração total (citoplasma e membrana); (2) Fração citoplasmática e (3) Fração de membrana; (B) Western Blot, membrana de nitrocelulose (0.45 μ m), bandas protéicas do SDS-PAGE da transferidas e incubadas com extrato purificado de IgY anti-*Phdp* do pool de ovos 90 dias após a quarta imunização, na concentração de 1 mg/ml diluído na proporção de 1:500.

[012] A Figura 3 mostra a imunomarcação de anticorpos IgY opsonizados as células bacterianas de *Phdp* no baço (A - B) e rim caudal (C -D); no gráfico em coluna a concentração da IgY anti-*Phdp* no soro de *Rachycentron canadum* no tempo de 48 horas após a inoculação intracelomática da imunoglobulina, grupo IgY (48 horas) e 15 dias após o inóculo no grupo IgY (15 dias).

[013] A Figura 4 mostra as principais alterações morfológicas nas células sanguíneas de *Rachycentron canadum* infectado experimentalmente com *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*; (a) Grupo controle positivo (desafiado) 24 horas, intensa bacteremia, (seta) aponta para bastonetes, envolta de uma hemácia (*); (b) Controle positivo (desafiado) 48 horas, monócito em apoptose e alguns bastonetes; (c) macrófago atóxico (ponta da seta) e leucócitos polimorfos nucleares (setas pontilhadas); (d) IgY (48 horas) no tempo de 48 horas após infecção, monócitos ativado (ponta da seta) e um monócito com a morfologia celular normal (seta pontilhadas).

[014] A Figura 5 representa graficamente as médias (erro padrão; n=8) e análise de variância da concentração de EROS de leucócitos sanguíneos de *Rachycentron canadum*, inoculados com salina grupo Controle (-), desafiados com *Phdp* sem anticorpo terapia Controle (+), inoculados 15 dias antes do desafio com IgY específicas anti-*Phdp* (IgY 15 Dias) e inoculados 48 horas antes do desafio bacteriano, (IgY 48 horas).

[015] A Figura 6 mostra as principais alterações celulares no exsudato inflamatório celomático de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente com

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (a,b,c) Grupo controle positivo (desafiado) nos respectivos tempos 6, 24 e 48 horas após a infecção experimental, exsudato hemorrágico (*), leucócitos segmentados (setas), linfócitos (seta pontilhada) e macrófagos atóxicos, apresentando inúmeros vacúolos citoplasma (ponta da seta); (d, e, f) Grupo IgY (15 dias) e (g, h, i) grupo IgY (48 horas), ambos no tempos de 6, 24 e 48 horas; diminuição do número de hemácias em relação ao controle e presença de trombócitos (setas pontilhadas) e linfócitos (setas) no tempo de 6 horas, e no tempo de 48 horas os macrófagos normais (ponta da seta) no grupo IgY (48 horas).

[016] A Figura 7 representa graficamente a porcentagem (n=10) da disseminação bacteriana nos órgãos e tecidos de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente nos tempos de 6, 24 e 48 horas, desafiados com *Phdp* sem anticorpo terapia Controle (+), inoculados 15 dias antes do desafio com IgY específicas anti-*Phdp* (IgY 15 Dias) e inoculados 48 horas antes do desafio bacteriano, (IgY 48 horas); Setas apontam para as menores e maiores porcentagens de órgãos infectados por período de tempo.

[017] A Figura 8 mostra a progressão das lesões histopatológicas no coração de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (A) Grupo controle negativo (inoculado apenas com PBS), estrutura morfológica normal; (B, C e D) Grupo controle positivo (desafiado) nos respectivos tempos 6, 24 e 48 horas após a infecção, (setas) indicam áreas de necrose coagulativa se intensificando durante a cinética da

infecção, com aumento progressivo de infiltrados leucocitários e hemorrágicos no tecido cardíaco (*); (E) Grupo IgY (15 dias) e (F) grupo IgY (48 horas), no tempo de 48 horas, pós infecção.

[018] A Figura 9 mostra a progressão das lesões histopatológicas no rim cranial de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente com *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (A) Grupo controle negativo (inoculado apenas com PBS), estrutura morfológica normal; (B, C e D) Grupo controle positivo (desafiado) nos respectivos tempos 6, 24 e 48 horas após a infecção, progressão do quadro de necrose tubular aguda com aumento de células epiteliais tubulares necróticas, desprendimento progressivo da lâmina basal, eliminação das células para o lúmen tubular (setas) e lesão glomerular aguda, na figura (C) (seta pontilhada); Áreas de congestão hemorrágica e infiltrados celulares difusos no tecido hematopoiético (*); (E) Grupo IgY (15 dias) e (F) grupo IgY (48 horas), ambos no tempo de 48 horas pós infecção, (setas pontilhadas) apontam para centros de melanomacrófago.

[019] A Figura 10 mostra a progressão das lesões histopatológicas no fígado de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente com *Photobacterium damsela spp. piscicida* (A) Grupo controle negativo (inoculado apenas com PBS), estrutura morfológica normal; (B, C e D) Grupo controle positivo (desafiado) nos respectivos tempos 6, 24 e 48 horas após a infecção, (setas) indicam áreas de necrose se intensificando durante progresso da infecção, com aumento intensivo de infiltrados leucocitários e hemorrágicos no tecido (*); (E) Grupo IgY (15 dias) e (F)

grupo IgY (48 horas), ambos no tempo de 48 horas pós infecção.

[020] A Figura 11 mostra a progressão das lesões histopatológicas no baço de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente com *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* (A) Grupo controle negativo (inoculado apenas com PBS), área de polpa vermelha (*) e (#) área de polpa branca, estrutura morfológica normal; (B, C e D) Grupo controle positivo (desafiado) nos respectivos tempos 6, 24 e 48 horas após a infecção, (setas) indicam áreas de necrose se intensificando durante progresso da infecção, com aumento intensivo de infiltrados leucocitários e hemorrágicos no tecido; (E) Grupo IgY (15 dias) e (F) grupo IgY (48 horas), ambos no tempo de 48 horas pós infecção.

[021] A Figura 12 mostra a imunomarcação positiva para *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* em órgãos e tecidos de *Rachycentron canadum* 48 horas após a infecção experimental; (A) coração (B) rim, (C) fígado e (D) baço.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[022] A presente invenção descreve rações nutracêuticas contendo entre 0,0007 e 0,0012% de anticorpos policlonais IgY, extraídos da gema de galinhas poedeiras, específica para proteínas de membrana e exotoxinas bacterianas do grupo consistindo de *Photobacterium damsela* subespécie *piscicida*; *Streptococcus agalactiae*; *Lactococcus garvieae*; *Aeromonas*; e *Flavobacterium columnare* e proteínas capsulares do vírus da mancha branca (*White Spot Syndrome*).

[023] A Tabela 1 descreve um exemplo de formulação das rações nutracêuticas. Os valores em porcentagem são

flexíveis, sofrem variação de um fabricante para outro e representam uma média. O extrato contendo os anticorpos, podendo ser acoplados a qualquer formulação independente da porcentagem ou da variável destas porcentagens.

Tabela 1: Formulação ração nutracêutica.

Nutrientes	Concentração (%)
Proteína bruta (PB)	28,0
Matéria seca (MS)	89,0
Fibra bruta (FB)	8,0
Extrato étereon (EE)	3,0
Extrato não nitrogenado (ENN)	40,0
Material mineral (MM)	10,0
Cálcio (Ca)	1,8
Fósforo (P)	0,60
Energia bruta (Kcal kg)	3,8
Imunoglobulina Y (mg/kg)	0,0012

[024] As rações nutracêuticas desenvolvidas são potencialmente aplicáveis na imunoprofilaxia e terapêutica de infecções bacterianas em organismos aquáticos.

Exemplo de concretização da invenção

Potencial de especificidade e avidéz dos IgY anti-*Photobacterium*

[025] A produção de anticorpos IgY específicos anti-*Phdp* teve início no 15º dia após a primeira dose do antígeno no soro das aves, com aumento significativo ($P < 0,05$) em relação ao dia zero e os títulos se mantiveram constantes durante os períodos experimentais que foram de 30, 60 e 90 dias (Figura 1A). O mesmo ocorreu com a taxa de transferência para a gema que obteve aumento significativo

no 15° dia ($P < 0,05$), entretanto os títulos nos demais tempos foram flutuantes (Figura 1B). Em contrapartida o potencial de avidéz dos anticorpos presentes nos soros foi progressivo, aumentando no 90° dia após a quarta imunização ($P < 0,05$), em relação aos demais tempos (Figura 1C).

Análise da especificidade da IgY anti-Phdp

[026] Na análise eletroforética das frações bacterianas seis bandas foram visualizadas na fração total com pesos moleculares entre (15 - 141 kDa), quatro na fração citoplasmática (49 - 86) e três na fração de membrana (16 - 52 kDa). Quando as bandas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose os anticorpos das aves apresentaram um potencial de especificidade amplo, reconhecendo oito bandas proteicas na fração total, quatro na fração citoplasmática e quatro de membrana (Figura 2).

Meia vida plasmática no soro e potencial opsonizante das IgY anti-Phdp nos órgãos de *Rachycentron canadum*

[027] Antes do início da infecção experimental a concentração de anticorpos IgY anti-Phdp foi determinada no soro do grupo IgY (15 dias) 15 dias após a injeção da imunoglobulina e no grupo IgY (48 horas) 48 horas após o inóculo. O segundo ensaio foi realizado após a infecção para detectar as imunoglobulinas Y, livres e opsonizadas ao antígeno bacteriano nos órgãos e tecidos (Figura 3). Os dois grupos foram injetados com dose única na concentração de 14 mg/mL em tempos diferentes e ambos apresentaram títulos de anticorpos no soro em relação ao soro pré-imune (antes do inoculação da IgY) ($P < 0,05$). Entretanto o grupo IgY (48 horas) apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) em relação ao grupo IgY (15 dias). Este dado é justificável

devido à proteólise ocorrida durante o percurso de tempo. Quando as imunoglobulinas Y foram monitoradas nos tecidos o resultado foi positivo, tanto para anticorpos livres como para bactérias opsonizadas foram imunomarcadas no rim e no baço dos grupos tratados. As imunoglobulinas livres apresentaram-se difusas no parênquima do órgão, enquanto os microrganismos opsonizados foram visualizados associados a áreas de melanomacrófagos, tanto no rim como no baço.

Efeito imunofarmacológico dos anticorpos IgY anti-Phdp nas variáveis hematológicas

[028] O perfil hematológico apresentou alterações discretas na contagem total das hemácias, com diminuição dos valores no grupo aumento discreto na concentração de hemoglobinas e no valor hematimétrico da hemoglobina corpuscular média (HCM) ($P < 0.05$), progredindo o quadro clínico para anemia hemolítica aguda (Tabela 2).

[029] Todos os grupos experimentais apresentaram aumento do número de leucócitos totais e diferenciais em relação ao grupo controle negativo (C-), entretanto o grupo controle positivo (C+) teve aumento significativo ($P < 0,05$) no tempo de 6 horas após a infecção, comparado aos grupos IgY (15 dias) e IgY (48 horas) (Tabela 3).

[030] A dinâmica das células leucocitárias iniciou-se no tempo de 6 horas com o aumento do número de granulócitos sanguíneos, acentuado no grupo (C+) diferenciando-se ($P < 0.05$) dos grupos IgY (15 dias) e IgY (48 horas). Entretanto em 24 horas ocorreu diminuição significativa ($P < 0.05$) do número de granulócitos no grupo IgY (48 horas). O número de trombócitos se manteve normal no grupo IgY (48 horas) no tempo de 6 horas, com médias

paralelas ao grupo (C-) e diferenciais ($P < 0,05$) entre os demais grupos, nos tempos 24 e 48 horas. O número de monócitos e linfócitos foi aumentando gradativamente nos grupos desafiados. O número de linfócitos aumentou significativamente no grupo IgY (15 dias) no tempo de 48 horas (Tabela 3).

[031] As principais alterações na morfologia das células sanguíneas foram observadas no grupo (C+), como a presença de bastonetes, granulócitos, linfócitos e monócitos ativados, com vacúolos citoplasmáticos atóxicos indicando o período de septicemia entre os tempos de 6, 24 e 48 horas pós-infecção, não sendo observado nos grupos IgY (15 dias) e IgY (48 horas) (Figura 4).

Tabela 2: Valores médios¹ (respectivos erro padrão) e análise de variância do perfil hematológico de *Rachycentron canadum* submetidos à infecção experimental com *P. damsela* subespecie *piscicida*.

Variáveis	Tratamento	Tempo (horas)											
		24 horas				24 horas				24 horas			
	Controle Negativo	29.7	±	1.6	ns	32.0	±	1.2	ns	33.0	±	1.6	ns
	Controle Positivo	30.0	±	2.0	ns	30.0	±	1.4	ns	31.2	±	1.9	ns
VG (%)	IgY (15 Dias)	31.8	±	1.1	ns	27.0	±	1.5	ns	31.4	±	1.8	ns
	IgY (48 horas)	31.8	±	3.4	ns	24.8	±	2.0	ns	27.2	±	1.9	ns
	Controle Negativo	2.1	±	0.1	ns	2.2	±	0.2	ns	2.3	±	0.2	ns

VCM (fl)	Controle Positivo	1.7	±	0.1	ns	2.3	±	0.1	ns	3.5	±	0.1	ns
	IgY (15 Dias)	2.3	±	0.1	ns	1.8	±	0.1	ns	3.1	±	0.4	ns
	IgY (48 horas)	2.8	±	0.3	ns	1.7	±	0.1	ns	3.9	±	0.4	ns
	Controle Negativo	5.7	±	0.4	ns	5.9	±	0.1	ns	6.7	±	0.8	ns
HCM (pg)	Controle Positivo	4.7	±	0.1	ns	7.1	±	0.1	ns	12.9	±	0.8	*
	IgY (15 Dias)	7.1	±	0.8	ns	5.0	±	0.1	ns	10.6	±	0.9	ns
	IgY (48 horas)	7.0	±	0.6	ns	5.5	±	0.1	ns	7.5	±	1.0	ns
	Controle Negativo	28.2	±	2,6	ns	28.6	±	0.1	ns	28.7	±	2.4	ns
CHCM (g/dl)	Controle Positivo	27.6	±	1.0	ns	30.3	±	0.1	ns	36.9	±	2.6	ns
	IgY (15 Dias)	30.4	±	4.0	ns	27.4	±	0.1	ns	32.8	±	1.5	ns
	IgY (48 horas)	32.0	±	3.5	ns	29.7	±	0.1	ns	26.5	±	1.3	ns
Hemácias (milhões/mm ³)	Controle Negativo	148	±	16	ns	153	±	0.1	ns	143	±	13	ns
	Controle Positivo	174	±	6.4	ns	128	±	0.1	ns	88	±	3.9	ns
	IgY (15 Dias)	137	±	7.8	ns	143	±	0.1	ns	99	±	8.7	ns
	IgY (48 Horas)	136	±	4.1	ns	101	±	0.1	ns	125	±	1.6	*

Hemoglobina (g/dl)	Controle Negativo	8.3	±	0.6	ns	9.1	±	0.1	ns	9	±	0.4	ns
	Controle Positivo	8.2	±	0.4	ns	9.0	±	0.1	ns	11	±	0.4	*
	IgY (15 Dias)	9.6	±	0.9	ns	8.0	±	0.1	ns	10	±	0.4	ns
	IgY (48 horas)	9.8	±	0.7	ns	7.5	±	0.1	ns	9	±	0.5	ns

¹Médias (n=7) que apresentam (*) se diferem significativamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey (P>0,05). Controle Negativo (Não Desafiado), Controle Positivo (Desafiado), IgY (15 dias) Inoculação da imunoglobulina Y, 15 dias anteriores ao desafio, IgY (48 horas) Inoculação da imunoglobulina Y, 48 horas, anteriores ao desafio. VG= Volume globular médio; VCM=Volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM; Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 3: Valores médios¹ (respectivos erro padrão) e análise de variância do perfil leucocitário de *Rachycentron canadum* submetidos à infecção experimental com *P. damsela* subespecie *piscicida*.

Variáveis (células/ mm ³)	Tratamento	Tempo (horas)											
		6 horas			24 horas			48 horas					
Leucócitos Totais	Cont. (N)	8.267	±	1.038	*	9.354	±	420	*	8.144	±	627	*
	Cont. (P)	18.492	±	1.016	*	14.092	±	1.005	ns	9.983	±	654	ns
	IgY 15 D	16.583	±	1.075	ns	11.292	±	523	ns	9.800	±	768	ns
	IgY 48 hs	14.433	±	577	*	12.883	±	993	ns	12.550	±	494	*
Linfócitos absolutos	Cont. (N)	7.604	±	292	*	7.918	±	305	*	7.080	±	225	*
	Cont. (P)	15.423	±	1.617	ns	13.924	±	2.666	ns	15.574	±	1168	*
	IgY 15 D	13.568	±	1.771	ns	12.607	±	1.328	ns	12.175	±	1.793	ns
	IgY 48 hs	12.203	±	521	ns	10.776	±	628	ns	10.628	±	1.166	ns
Granulócito-	Cont. (N)	326	±	89	*	565	±	168	*	674	±	356	*

citos abso- lutos	Cont. (P)	1.592	±	563	*	1.965	±	147	ns	1.052	±	535	ns
	IgY 15 D	858	±	364	ns	1.944	±	606	ns	1.417	±	779	ns
	IgY 48 hs	717	±	260	ns	969	±	182	*	1.424	±	1.021	ns
Trombó - citos abso- lutos	Cont. (N)	295	±	171	*	746	±	25	*	832	±	200	*
	Cont. (P)	640	±	220	ns	463	±	73	ns	693	±	720	ns
	IgY 15 D	1.008	±	107	ns	317	±	35	ns	739	±	267	ns
	IgY 48 hs	217	±	67	*	357	±	59	ns	790	±	430	ns
Monó- citos abso- lutos	Cont. (N)	329	±	107	*	306	±	77	*	384	±	85	*
	Cont. (P)	531	±	230	ns	1.877	±	459	ns	1.222	±	198	ns
	IgY 15 D	613	±	331	ns	1.044	±	490	ns	2.250	±	563	ns
	IgY 48 hs	680	±	143	ns	1.654	±	410	ns	1.173	±	383	ns

¹Médias (n=7) que apresentam (*) se diferem significativamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey (P>0,05). Controle Negativo (não Desafiado), Controle Positivo (Desafiado), IgY (15 dias) inoculação da imunoglobulina Y, 15 dias anteriores ao desafio, IgY (48 horas) inoculado, 48 horas antes do desafio.

Determinação da atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos

[032] A atividade respiratória dos leucócitos aumentou em todos os grupos desafiados, entretanto o grupo controle negativo apresentou níveis basais reduzidos, durante os três tempos experimentais. No grupo IgY (48 horas) observou-se diminuição significativa (P<0,05) dos valores nos tempos de 24 e 48 horas pós-infecção em relação ao grupo IgY(15 dias), controle positivo e negativo (Figura 5).

Exsudato inflamatório: componente celular

[033] Em todos os peixes do grupo controle positivo foi observado exsudato hemorrágico na cavidade celomática no momento da coleta de 6 horas, que impediu a contagem dos leucócitos devida à grande quantidade de

hemácias presentes nas amostras (Tabela 4). Em contrapartida, nos tempos de 24 e 48 horas, o número de leucócitos gradativamente em relação aos outros grupos. O grupo IgY (48 horas) apresentou valores reduzidos no número de linfócitos no tempo de 6 e 24 horas e de trombócitos no tempo de 48 horas, ambos significativos. O número de trombócitos e macrófagos aumentou no tempo de 24 horas no grupo (controle positivo) em relação aos grupos IgY (15 dias) e IgY (48 horas).

[034] As alterações celulares foram mais evidentes no grupo (C+), com a presença inicial dos trombócitos e hemácias confirmando o quadro hemorrágico e de bastonetes livres e fagocitados por agrupamentos de monócitos ativados e atóxicos (Figura 6).

Tabela 4 - Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem total e diferencial de células presentes no exsudato inflamatório de *Rachycentro canadum* desafiados com *Photobacterium damsela* subspecie *piscicida*

Variáveis (células/mm ³)	Tratamento	Tempo (horas)											
		6 horas				24 horas				48 horas			
Leucócitos Totais	Controle Positivo	0.00	±	0.00	Δ	3.308	±	699	*	3.063	±	333	ns
	IgY (15 Dias)	1.652	±	176	ns	1.477	±	271	ns	1.919	±	101	ns
	IgY (48 horas)	2.276	±	706	ns	2.386	±	395	ns	2.411	±	184	ns
Linfócitos absolutos	Controle Positivo	0.00	±	0.00	Δ	460	±	211	ns	591	±	105	*
	IgY (15 Dias)	994	±	940	ns	1081	±	146	ns	1186	±	212	ns
	IgY (48 Horas)	737	±	655	*	159	±	273	*	1461	±	240	ns
Granulócitos absolutos	Controle Positivo	0.00	±	0.00	ns	452	±	211	ns	114	±	333	ns
	IgY (15 Dias)	657	±	164	ns	812	±	286	ns	441	±	691	ns
	IgY (48 horas)	366	±	835	*	147	±	587	*	602	±	197	ns
Trombócitos	Controle Positivo	0.00	±	0.00	Δ	1275	±	556	*	1237	±	501	ns

absolutos	IgY (15 Dias)	681	±	161	ns	403	±	794	ns	1328	±	402	ns
	IgY (48 horas)	474	±	159	ns	579	±	137	ns	761	±	158	*
Monócitos absolutos	Controle Positivo	0.00	±	0.00	Δ	935	±	430	*	119	±	212	ns
	IgY (15 Dias)	533	±	191	ns	176	±	338	ns	145	±	141	ns
	IgY (48 horas)	561	±	101	ns	174	±	337	ns	176	±	367	ns

¹ Médias (n=7) que apresentam (*) se diferem significativamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey (P>0,05). (Δ) Amostras que apresentaram processo exsudativo hemorrágico, com aumento do número de eritrócitos. Controle Negativo (não Desafiado), Controle Positivo (Desafiado), IgY (15 dias) inoculação da imunoglobulina Y, 15 dias anteriores ao desafio, IgY (48 horas) inoculado, 48 horas antes do desafio.

Dinâmica da disseminação bacteriana

[035] A cronologia da disseminação bacteriana no hospedeiro foi avaliada em seu curso fisiopatológico natural observado no grupo (C+) sem interferência dos tratamentos soroterápicos e comparada com os grupos tratados (Figura 7).

[036] A disseminação foi ampla em todos os órgãos e tecidos, com a distribuição de porcentagens diferentes para cada órgão, tratamento e período do tempo experimental. Em 6 horas pós-infecção, 80% dos rins do grupo (C+) e IgY (15 dias) foram positivos para o crescimento bacteriano, com a exceção do grupo IgY (48 horas) que apresentou uma porcentagem menor de 50% em relação aos dois grupos. O baço e o fígado no mesmo período de tempo apresentaram positividade de 50% nos grupos (C+) e IgY (48 horas), com diminuição de 30% no grupo IgY (15 dias). Após 24 horas, a disseminação para o baço progrediu para 100% nos grupos C+ e IgY (15 dias) em contra partida o grupo IgY (48 horas) manteve o mesmo valor de 50% no rim e

20% no fígado, diferindo-se dos dois grupos. Na progressão final de 48 horas 100% dos rins foram positivos no grupo C+, 70% no grupo IgY (15 dias) e 0% no grupo IgY (48 horas) e no fígado a porcentagem da disseminação reduziu para 30% no grupo IgY (15 dias) e 0% no grupo IgY(48 horas).

Alterações anatomopatológicas e bioquímicas

[037] Os efeitos deletérios nos órgãos e tecidos causados pela inoculação do *Phdp* na cavidade celomática e a ação protetora dos anticorpos IgY anti-*Phdp* foram avaliados por meio de exame histopatológico. O grau da lesão celular também foi determinado pela dosagem de enzimas citoplasmáticas séricas.

[038] O grupo C+ apresentou evolução progressiva e intensa nas lesões histopatológicas nos tempos pré-determinados de 6, 24 e 48 horas após infecção experimental, no coração, rim, fígado e baço, enquanto os grupos IgY (15 dias) e IgY (48 horas) no tempo de 48 horas apresentaram lesões moderadas no primeiro e leves no segundo grupo. No tecido cardíaco do grupo C+ foi observado infiltrado leucocitário com 6 horas, que aumentou progressivamente com 24 horas e progrediu para necrose coagulativa nas fibras do miocárdio com 48 horas, nos demais órgãos a progressão da quantidade de leucócitos e do grau de lesão estruturais foi a mesma, mas com diferenças fisiopatológicas ultraestruturas e morfológicas. No rim foi observado processo degenerativo seguido de necrose coagulativa dos túbulos renais. No fígado ocorreu degeneração hepatocelular e no baço, focos de necrose coagulativa no parênquima do órgão. A etiologia do agente causador das lesões foi confirmada pelo método de

imunohistoquímica (IHC), que foi positivo para a imunomarcagem do *Phdp*, no coração, fígado, rim e baço dos grupos desafiados, além da confirmação do agente na localização das colônias no tecido se correlacionaram com as lesões encontradas no exame histopatológico (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12). As lesões foram menos abrangentes nos órgãos e tecidos dos grupos IgY (15 dias) e diminuíram drasticamente no grupo IgY (48 horas) demonstrando o efeito protetor dos anticorpos tanto como uso profilático como terapêutico.

[039] O estado funcional dos órgãos e o nível de proteção dos anticorpos foram confirmados pela determinação das enzimas celulares, creatinina quinase total sérica (CK), transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). O grupo C+ apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) nas enzimas CK, TGO e TGP em todos os tempos experimentais em relação aos grupos IgY (15 dias) e IgY (48 horas) correlacionando-se com os dados histopatológicos. Estes fatos confirmam o efeito protetor que foi mais evidente no grupo IgY (48 horas) que obteve as menores médias em relação ao dois grupos desafiados, porém não foi significativo estatisticamente. A glicemia se manteve em níveis de normalidade no tempo de 6 horas e diminuiu drasticamente em todos os grupos desafiados e tratados após 24 e 48 horas (Tabela 5).

Tabela 5: Valores médios¹ (respectivos erro padrão) e análise de variância do perfil bioquímico de *Rachycentron canadum* submetidos à infecção experimental com *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*

Variáveis	Tratamento	Tempo (horas)											
		6 horas				24 horas				48 horas			
CK (U/L)	Cont. (N)	132	±	4.972	ns	128	±	4.972	ns	130	±	4.9	ns
	Cont. (P)	454	±	15	*	865	±	45	*	1.402	±	92.91	*
	IgY 15 D	241	±	6.387	ns	347	±	24.6	ns	476	±	71.44	ns
	IgY 48 hs	124	±	7.497	ns	198	±	35.2	ns	210	±	20.58	ns
TGO (U/L)	Cont. (N)	7.8	±	0.4	ns	8.5	±	0.4	ns	8	±	0.4	ns
	Cont. (P)	15	±	0.6	*	19.8	±	1	*	15	±	1.3	*
	IgY 15 D	9.5	±	0.6	ns	13.5	±	0.8	ns	10	±	1.1	ns
	IgY 48 hs	10.5	±	0.6	ns	12.3	±	1.2	ns	6.7	±	1	ns
TGP (U/L)	Cont. (N)	4.2	±	1	ns	5.2	±	0.8	ns	4.9	±	0.8	ns
	Cont. (P)	3	±	0.4	*	4.6	±	0.9	ns	12	±	1.2	*
	IgY 15 D	6.5	±	0.6	ns	5.6	±	1.3	ns	6	±	0.9	ns
	IgY 48 hs	5.5	±	0.6	ns	4.7	±	1.2	ns	3.8	±	0.4	ns
Ferro sérico µg/dL)	Cont. (N)	216.5	±	15	*	189.5	±	12	*	234.5	±	14	*
	Cont. (P)	59.25	±	5.9	ns	35.8	±	5.0	ns	13	±	18	ns
	IgY 15 D	47.5	±	15.4	ns	73.25	±	12.7	ns	16	±	6.3	ns
	IgY 48 hs	59.18	±	19.0	ns	71.5	±	17.5	ns	34	±	7	ns
Gli- cose (g/dL)	Cont. (N)	104	±	1.87	ns	101	±	1.05	*	96	±	2.03	*
	Cont. (P)	100	±	1.35	ns	34.8	±	3.35	ns	25	±	2.70	ns
	IgY 15 D	99	±	1.14	ns	33.0	±	4.06	ns	26	±	2.93	ns
	IgY 48 hs	106	±	2.44	ns	34.8	±	4.54	ns	24	±	2.69	ns

¹Médias (n=7) que apresentam (*) se diferem significativamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey (P>0,05). Controle Negativo (não Desafiado), Controle Positivo (Desafiado), IgY (15 dias) inoculação da imunoglobulina Y, 15 dias anteriores ao desafio, IgY (48 horas) inoculado, 48 horas antes do desafio. Creatinina quinase total sérica (CK), Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e Transaminase glutâmico-Pirúvica (TGP).

REIVINDICAÇÕES

1. Rações nutracêuticas **CARACTERIZADAS POR** compreenderem entre 0,0007 e 0,0012% de anticorpos policlonais IgY, extraídas da gema de galinhas poedeiras, específicas para proteínas de membrana e exotoxinas bacteriana e para as proteínas capsulares do vírus da mancha branca.

2. Rações, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADAS POR** as proteínas de membrana e exotoxinas bacterianas serem do grupo consistindo de *Photobacterium damsela* subespécie *piscicida*; *Streptococcus agalactiae*; *Lactococcus garvieae*; *Aeromonas*; ou *Flavobacterium columnare*.

3. Uso das rações nutracêuticas, conforme descritas nas reivindicações 1 e 2, **CARACTERIZADAS POR** ser para imunoprofilaxia e terapêutica de infecções bacterianas em organismos aquáticos.

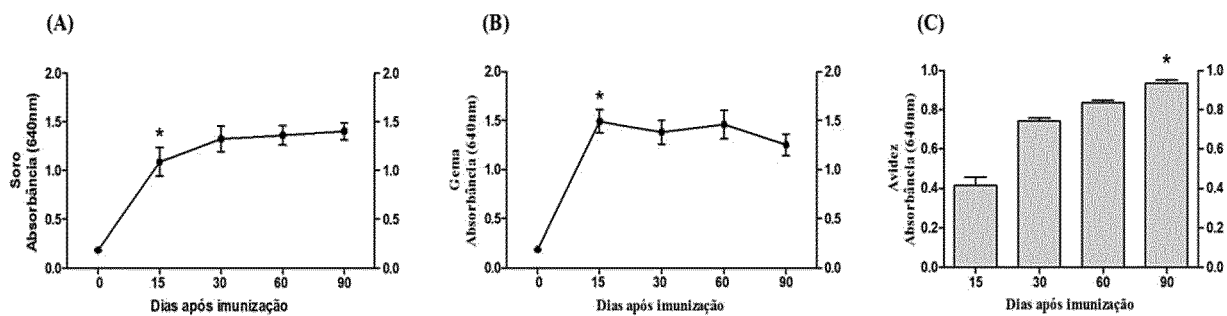


Figura 1

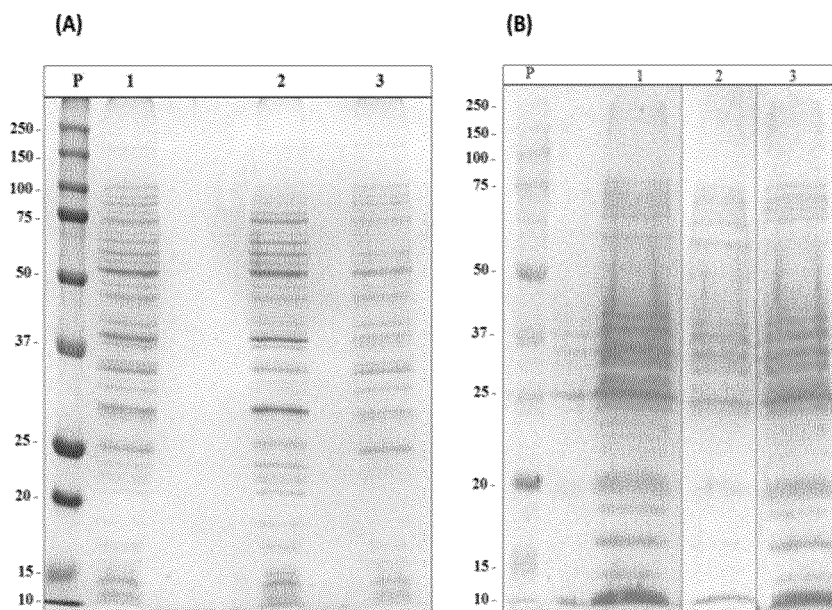


Figura 2

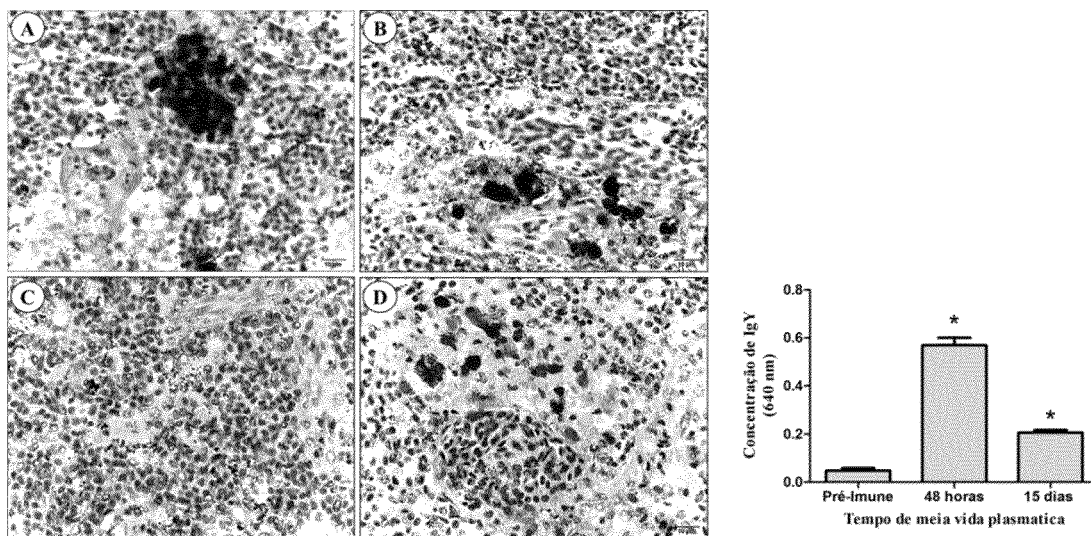


Figura 3

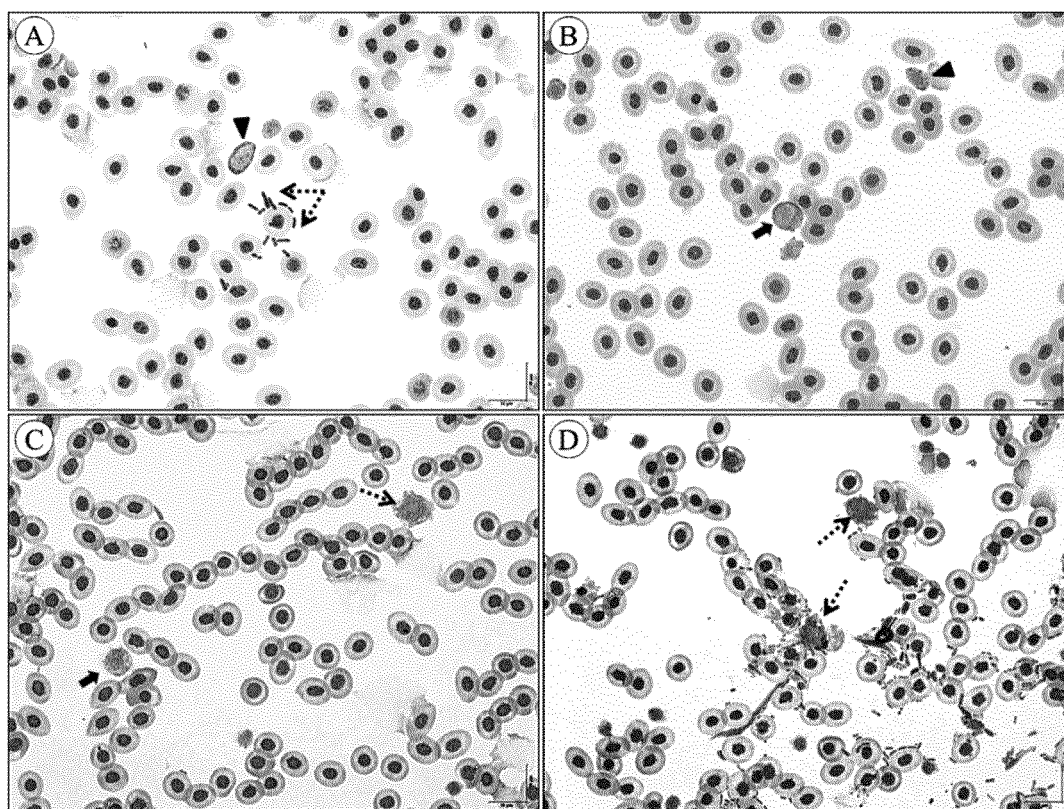


Figura 4

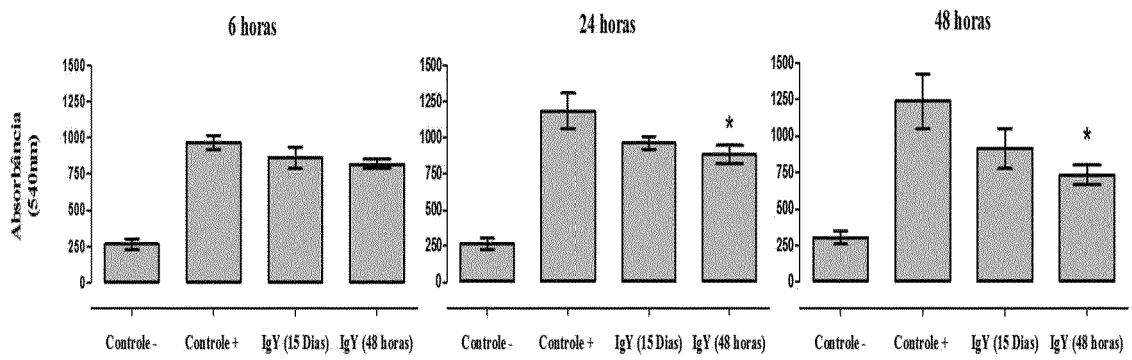


Figura 5

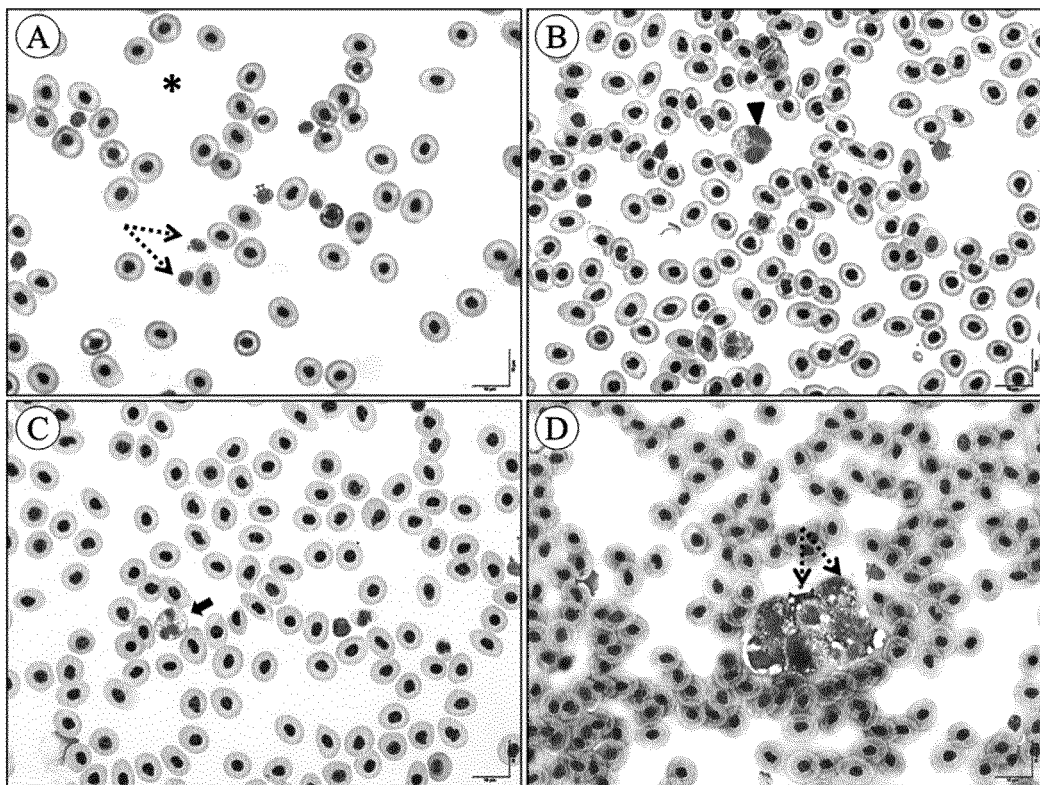


Figura 6

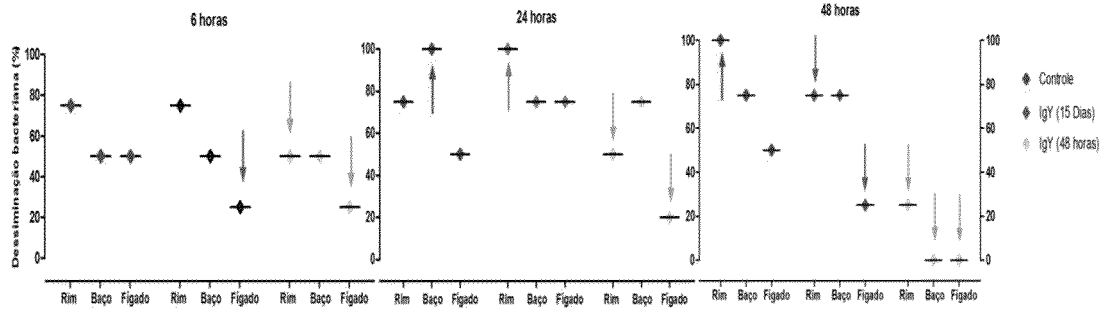


Figura 7

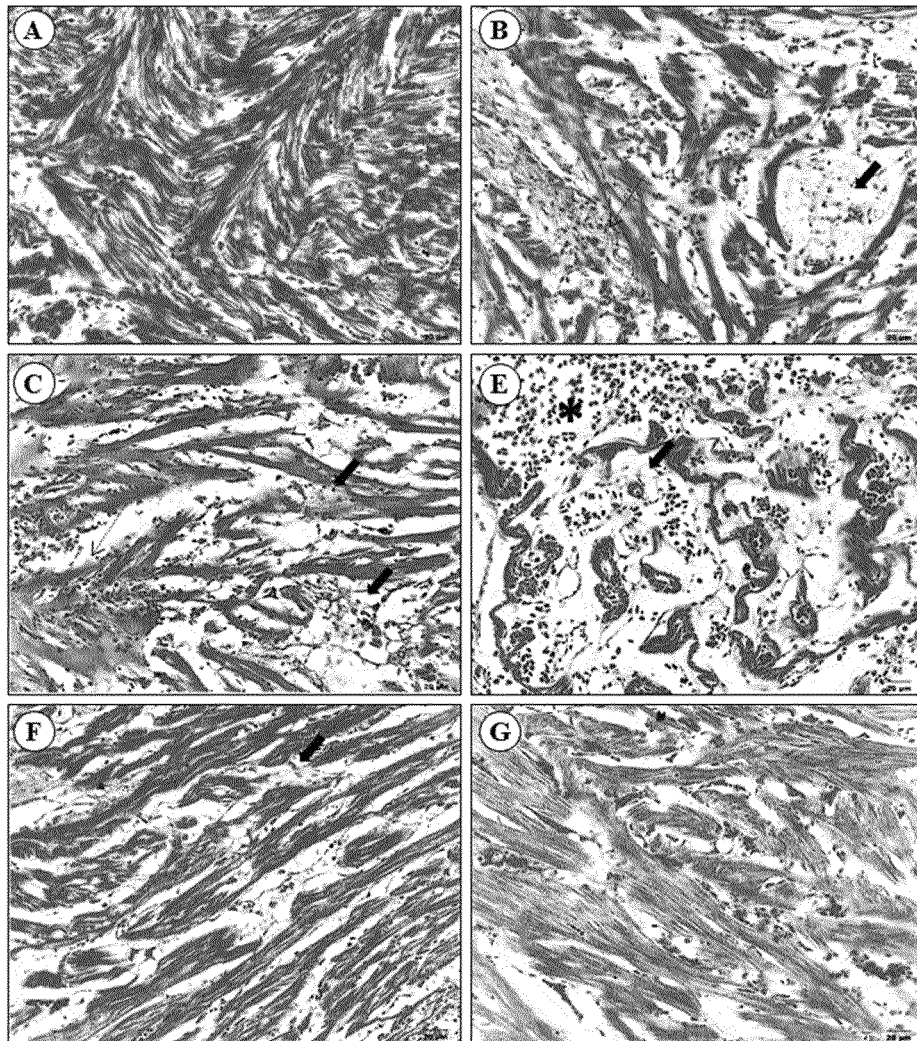


Figura 8

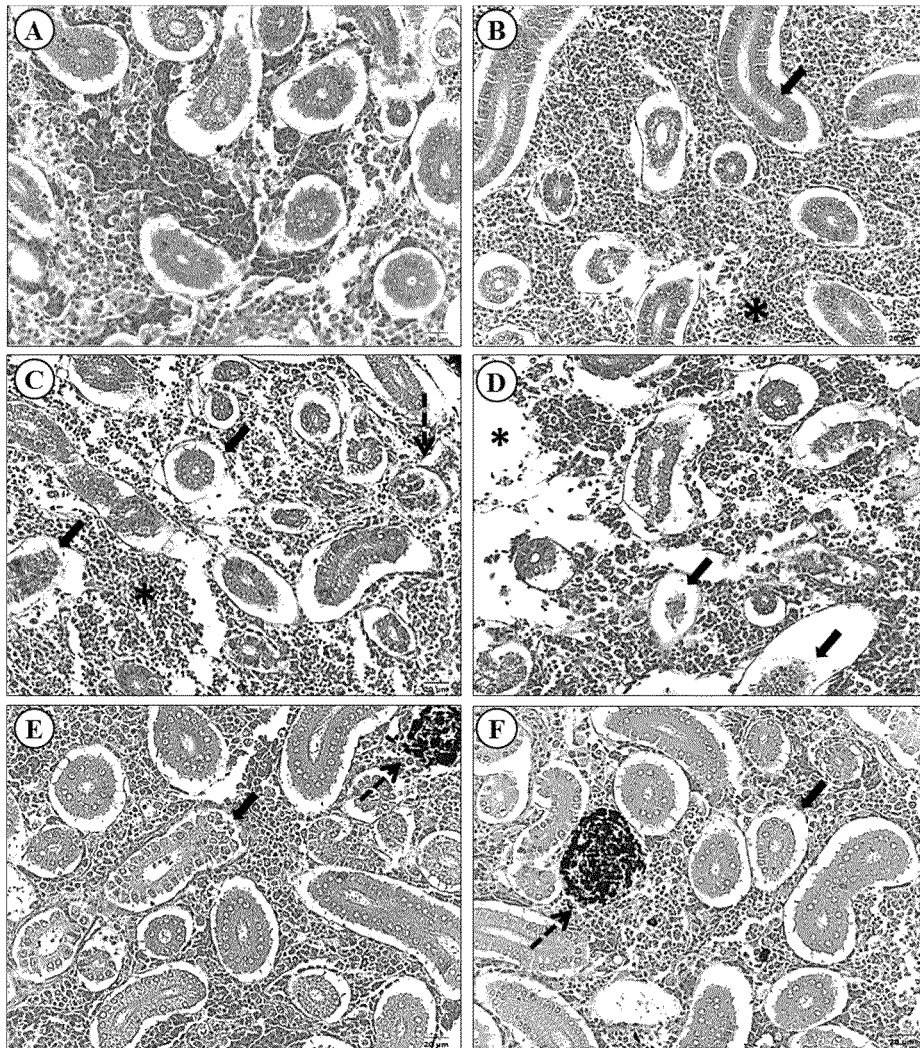


Figura 9

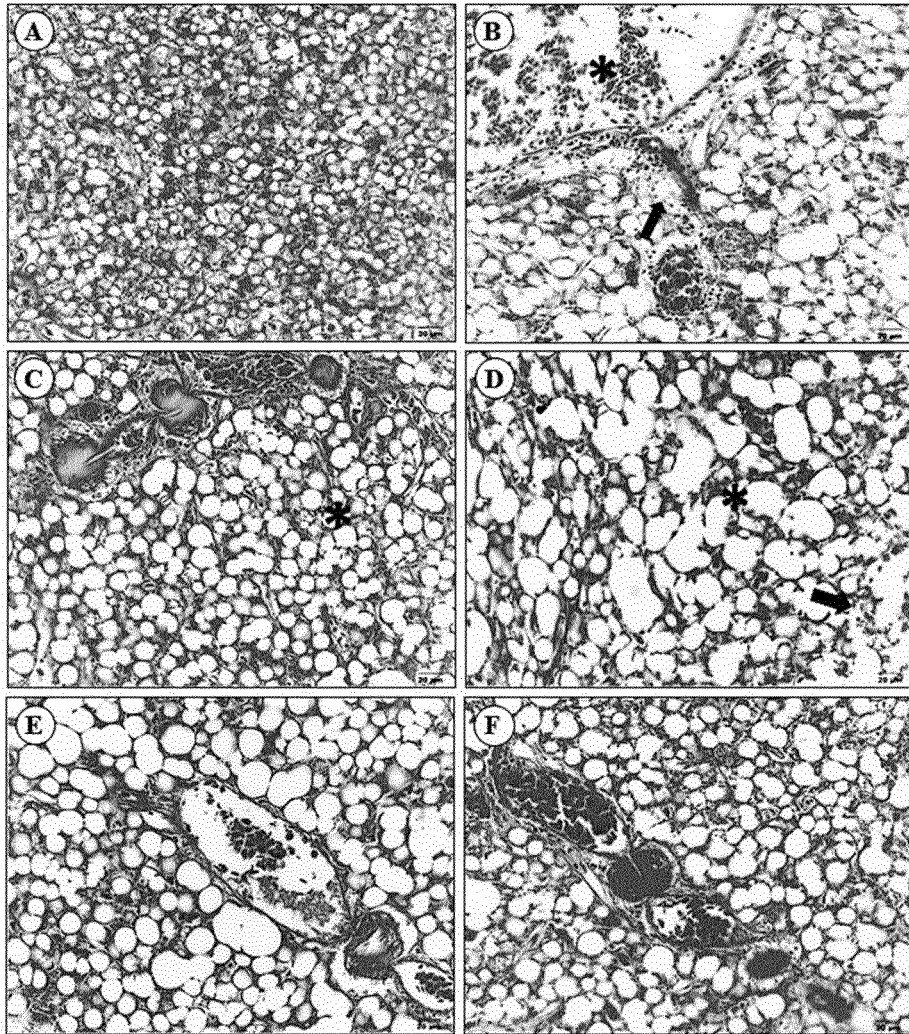


Figura 10

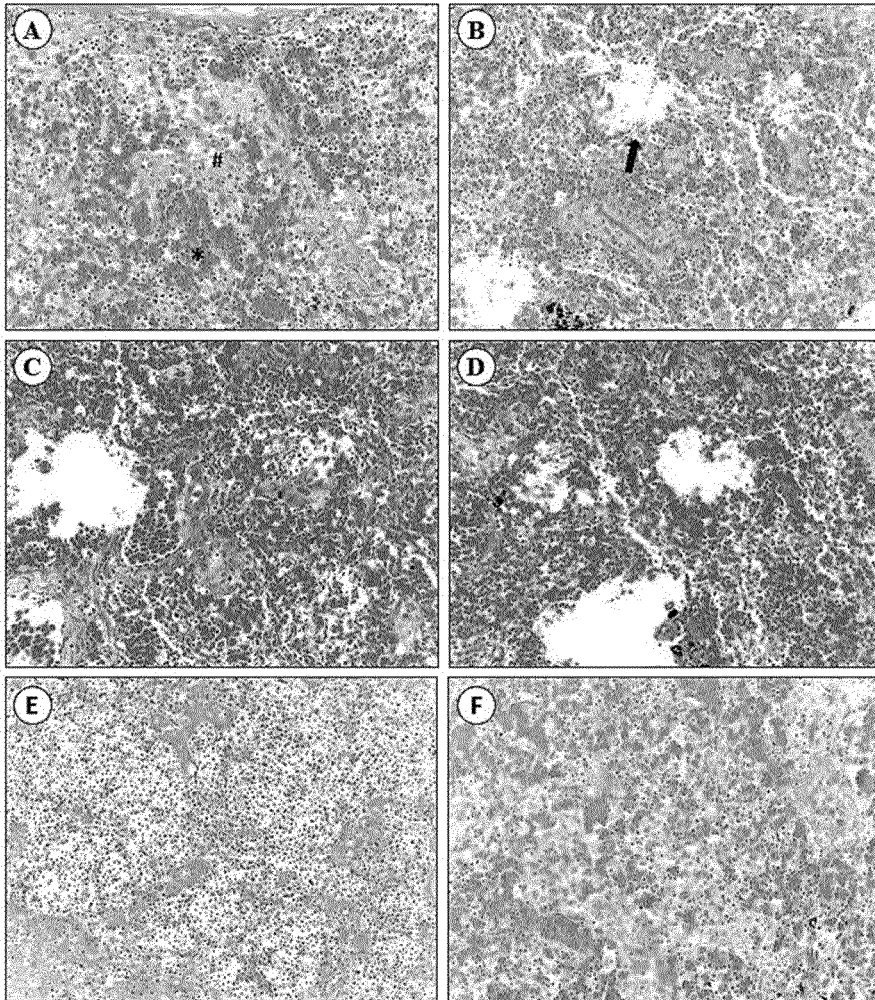


Figura 11

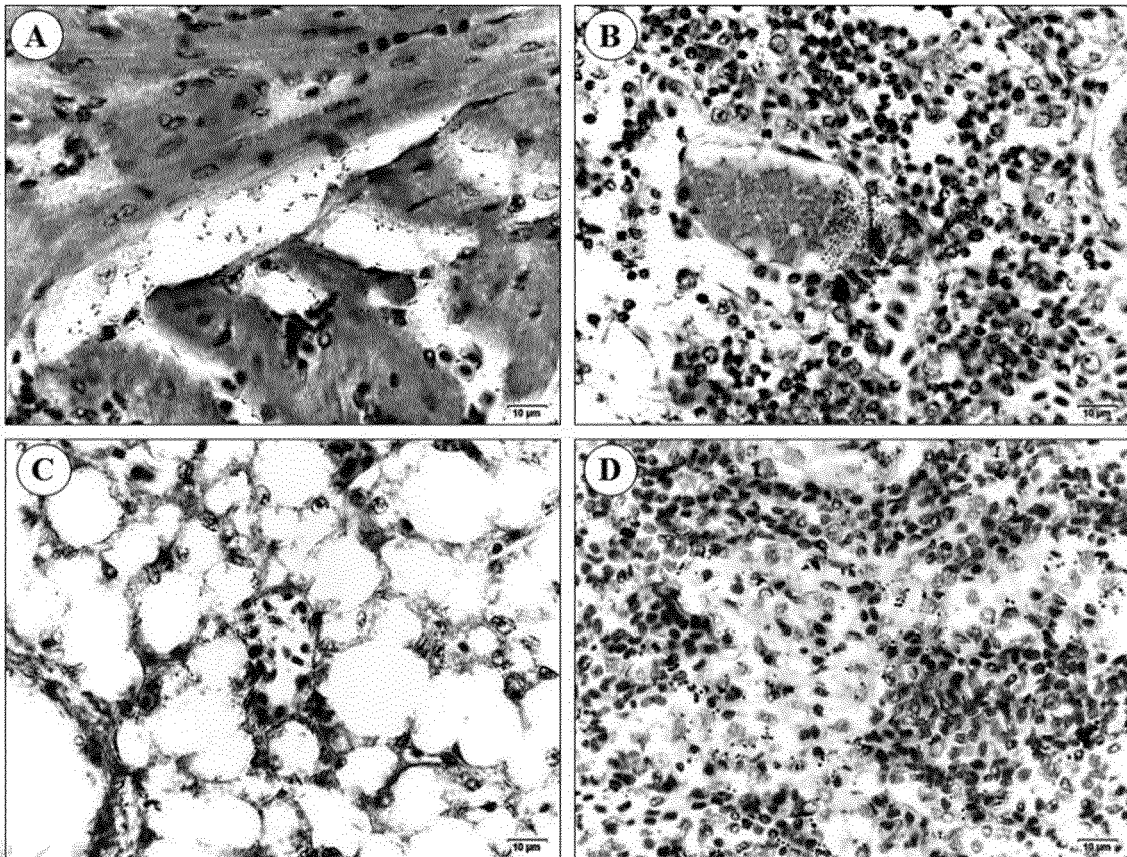


Figura 12

RESUMO**RAÇÕES NUTRACÊUTICAS E SEUS USOS**

A presente invenção refere-se a rações nutracêuticas contendo anticorpos policlonais IgY contra infecções bacterianas para uso terapêutico e profilático em organismos aquáticos. A tecnologia consiste na produção de uma ração nutracêutica, por meio da adição de anticorpos policlonais da classe IgY extraídos da gema de galinhas poedeiras, específica para proteínas de membranas bacterianas, por adsorção das moléculas na água. A funcionalidade da tecnologia é baseada em dois eventos: o primeiro é a absorção via oral e posteriormente sistêmica da imunoglobulina Y, e o segundo é a opsonização, neutralização da aderência e colonização do microrganismo nas células e tecidos alvos. Portanto sua aplicação é fundamentada na proteção imediata (terapêutica) e em longo prazo (profilática).