

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-
Photobacterium damsela subsp. *piscicida* USO
TERAPÊUTICO E PROFILÁTICO EM *Rachycentron
canadum***

Silas Fernandes Eto

Médico Veterinário

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-
Photobacterium damsela subsp. *piscicida* USO
TERAPÊUTICO E PROFILÁTICO EM *Rachycentron
canadum***

MSc. Silas Fernandes Eto

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Hélio Jose Montassier

Coorientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal.

2015

Eto, Silas Fernandes
E85p Produção de anticorpos IgY anti-*Photobacterium damsela* subsp.
piscicida uso terapêutico e profilático em *Rachycentron canadum* /
Silas Fernandes Eto. -- Jaboticabal, 2015
xiii, 62 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Flávio Ruas de Moraes
Coorientador: Hélio Jose Montassier, João Martins Pizauro Junior,
Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Banca examinadora: Fernanda Nogueira Valentin, Marcello Pardi de
Castro, Solange de Paula Ramos, Tereza Cristina Ribeiro Dias
Koberstein
Bibliografia

1. Imunoglobulina Y. 2. Imunoterapia. 3. Sepse. 4. Vacina. 5.
Cobia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:615.37:639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-Photobacterium damsela subsp. piscicida
USO TERAPÊUTICO E PROFILÁTICO EM Rachycentron canadum

AUTOR: SILAS FERNANDES ETO

ORIENTADOR: Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAO MARTINS PIZAURO JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA
VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal


Profa. Dra. FERNANDA NOGUEIRA VALENTIN

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal


Profa. Dra. TERESA CRISTINA RIBEIRO DIAS KOBERSTEIN

Centro de Aquicultura da Unesp / Jaboticabal/SP


Profa. Dra. SOLANGE DE PAULA RAMOS

Universidade Estadual de Londrina / Londrina/PR


Prof. Dr. MARCELLO PARDI DE CASTRO

Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 03 de dezembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Silas Fernandes Eto – Natural de Santa Mariana – PR, nascido em 23 de março de 1981, graduado em Medicina Veterinária em 2007, na Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP, Bandeirantes, PR. Mestrado realizado na Universidade Estadual de Londrina - PR em 2010 sob a orientação do Prof. Dr. Emerson Jose Venâncio com dissertação intitulada “Estudo das vias de inoculação sobre a resposta imune humoral e características histológicas do baço de galinhas poedeiras imunizadas com hemácia de carneiro”. No período de 2009 a 2010 trabalhou como pesquisador voluntário na Empresa IgY localizada em Londrina, PR. Em 2011 foi Professor voluntário na Universidade Estadual do Norte do Paraná. Em Março de 2012 ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp Câmpus de Jaboticabal sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes, tendo como projeto de doutorado o trabalho intitulado “Produção de anticorpos IgY anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. uso terapêutico e profilático em *Rachycentron canadum*”.

“Grandes almas sempre encontraram forte oposição de mentes medíocres”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Antônio Kusuo Eto e Cláudia Pinto Brandão Eto, por me amarem desde o início, quando Deus nos uniu a uma só história.

À minha amada companheira e gotinha do céu, Dayanne Carla Fernandes, pelo amor, ensinamentos, compreensão, companheirismo e por todo apoio durante a realização desta pesquisa.

Meus amados irmãos, José Alberto Brandão Pires, Claudia Brandão Pires Thomé e Antônio Vitor Brandão Eto. Meus pelo grande apoio e dedicação em todas as etapas de minha vida.

Aos animais, que doaram a maior dádiva da existência; suas vidas. Para a realização deste trabalho, que o sacrifício de cada um deles seja a cura para muitos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da existência.

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes pela orientação, oportunidade e confiança em meu trabalho.

À Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes pela oportunidade, confiança, otimismo e fé em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Rogério Salvador pelo voto de confiança e por ter me indicado para a realização deste doutorado, não somente pela indicação, mas por ter literalmente se deslocado pessoalmente, para atestar minha competência.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior pelos ensinamentos, atenção e por muitos momentos de transmissão de paz e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Hélio Jose Montassier pelos ensinamentos e por esta sempre pronto a ajudar e colaborar com este trabalho.

A Msc. Dayanne Carla Fernandes pelas análises de imunohistoquímica e principalmente pelo companheirismo, amor e compreensão, além de somar de sua capacidade para me auxiliar como braço direito nesta empreitada.

A nobre Adelina Naomi Eto, por acreditar e guiar meus passos científicos e também pelo financiamento que foi crucial para subsidiar o experimento de produção de anticorpos, com as aves e pela compra de reagentes para as análises importantes.

Agradeço a meu primo e irmão Evandro Eto e sua esposa Viviane Bassi Eto e em especial a meu Grande braço direito Lucas Bassi e seu Avô Horlando Bassi. Ambos por terem sido os primeiros a acreditarem e literalmente, com as próprias mãos, construíram o primeiro aviário, em sua propriedade, onde se iniciou os primeiros ensaios que levaram a conclusão desta tese de doutorado. Na verdade dos fatos, sem eles não teríamos nada.

Ao Msc. Tiago T. Fernandes que me ajudou com a logística experimental, sendo seu caráter indiscutível e sua competência.

Ao Dr. Gustavo da Silva Claudiano, por toda a ajuda durante o meu trabalho e pela amizade e muitos momentos de alta filosofia científica, e pelas análises bioquímicas.

Ao Msc. Adriano Marques Gonçalves que me ajudou com todas as análises de proteínas, além de seu caráter indiscutível e sua competência.

Ao Msc. Jefferson Y. Aguinaga que me ajudou com todas as análises hematológicas, além de seu caráter indiscutível e sua competência.

Ao Dr. Paulo Fernandes Marcusso, que me ajudou com as análises do exsudato inflamatório e pela amizade.

Ao Dr. Flávio Luiz dos Santos, que me ajudou com todas as análises de proteínas, além de seu caráter indiscutível e sua competência.

A todos os membros do Laboratório de Enzimologia Aplicada; Rafael, Carolina, aqueles a qual não guardei os nomes ainda.

A amiga Ângela por sempre estar pronta a ajudar, colaborando diretamente para a elaboração do trabalho por sua prestação imediata em ajudar.

A amiga Francisca técnica do Laboratório de Histologia UNESP, por sempre dar um jeitinho maternal nos problemas, solucionando e colaborando diretamente para a realização deste trabalho.

A Marina Tie Shimada pelo companheirismo e oportunidade de trabalhar com o modelo experimental.

Ao meu ex-orientador Prof. Dr. Emerson Jose Venâncio por ter me iniciado e transmitido a maior dádiva humana que o conhecimento.

A amiga Profa. Dra. Solange de Paula Ramos, pela a amizade e os conhecimentos passados.

A todos os aqueles que algum dia me ensinou algo, estendo para todos os professores e mestres que por minha vida passaram.

A minha banca julgadora que com o conhecimento foram peças essenciais para a melhoria deste trabalho.

A Maricultura Ipanema, residida no município de São Sebastião- SP por todo o apoio logístico na realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Por fim todos aqueles, que um dia me ensinaram algo, que o conhecimento de cada um seja multiplicado como uma chuva de benção divina.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1. Perspectivas econômicas da piscicultura marinha no Brasil	02
2.2. Produção de <i>Rachycentron canadum</i> e os principais fatores sanitários na criação	03
2.3. Classificação e fatores de virulência do <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	05
2.4. Mecanismos da resposta imune inata e adquirida em peixes teleósteos	08
2.4.1. Resposta imune humoral em teleósteos	10
2.4.2. Vacinas bacterianas em teleósteos	10
2.5. Mecanismos da resposta imune inata e adquirida das aves	11
2.5.1. Resposta imune humoral em aves	12
2.5.2. Imunoglobulinas em aves	13
2.5.3. Mecanismos de transferência de anticorpos maternos em aves	13
2.5.4. Biotecnologia da produção de anticorpos IgY e sua aplicação na imunoterapia de organismos aquáticos	14
3. OBJETIVOS GERAIS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Isolamento e identificação de cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (<i>Phdp</i>).....	16
4.1.1. Purificação das frações protéicas solúveis (FS) e insolúveis (FI) de (<i>Phdp</i>).....	17
4.1.2. Determinação da concentração de proteínas nas amostras	17
4.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) das frações proteicas microbianas.....	17

4.2. Aves, imunização e coleta de soro e gema).....	18
4.2.1. Detecção de imunoglobulinas Y específicas para <i>Phdp</i> no soro e na gema (ELISA indireto)	18
4.2.2. Avaliação do potencial de afinidade da IgY anti- <i>Phdp</i> (ELISA indireto)	19
4.2.3. Purificação de IgY	19
4.2.4. <i>Western blot</i>	20
4.3. Efeitos terapêuticos da IgY na infecção aguda por <i>Phdp</i> em <i>Rachycentron canadum</i>	20
4.3.1. Delineamento experimental dos peixes e acondicionamento.....	20
4.3.2. Monitoramento da meia vida plasmática dos anticorpos IgY específicos em <i>Rachycentron canadum</i>	21
4.3.3. Determinação da Dose Letal 50 (DL50)	22
4.3.4. Soroterapia e infecção experimental	22
4.3.5. Perfil hematológico e bioquímico.....	22
4.3.6. Atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos.....	23
4.3.7. Coleta dos leucócitos peritoneais.....	23
4.3.8. Exame histopatológico	24
4.3.9. Distribuição e disseminação bacteriana nos órgãos e tecidos	24
4.4. Imuno-histoquímica (IHC).....	24
4.5. Análise estatística	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Produção e análise do potencial de afinidade da IgY anti- <i>Phdp</i>	27
5.2. Análise da especificidade da IgY anti- <i>Phdp</i>	27
5.3. Meia vida plasmática no soro e potencial neutralizante das IgY anti- <i>Phdp</i> nos órgãos de <i>Rachycentron canadum</i>	28
5.4. Efeito dos anticorpos IgY anti- <i>Phdp</i> sob o perfil hematológico.....	29
5.5. Determinação da atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos.....	33
5.6. Exsudato inflamatório: componente celular.....	34
5.7. Dinâmica da disseminação bacteriana nos órgãos de <i>Rachycentron canadum</i>	36
5.8. Alterações anatomopatológicas e bioquímicas	37
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO.....	49
8. REFERÊNCIAS.....	50



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 03183/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Imunoterapia com anticorpos da classe IgY e vacina anti-*Photobacterium em Rachycentron canadum*: avaliação imunopatológica**", sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Julieta Rodini Engracia de Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

- AB – Antibiotótico
- AINEs – Anti-inflamatórios não esteroides
- AIP56 – Exotoxina indutora de apoptose
- APCs – Células apresentadoras de antígeno
- APS – Persulfato de amônia
- BSA – Soroalbumina bovina
- CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
- CK – Creatina quinase
- cm – Centímetros
- °C – Graus Celsius
- DAB – Diaminobenzidina
- DMF – N, N - dimetilformamida
- DL – Dose letal
- EB – Energia bruta
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA – Imunoensaio enzimático
- EROs – Espécies reativas do oxigênio
- FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
- FC – Fração protéica solúvel
- Fe – Ferro
- FI – Fração protéica insolúvel
- FT – Fração protéica total
- g – Grama
- g* – Giros
- GALT – Tecidos linfóides associado ao trato gastrointestinal
- HCM – Hemoglobina corpuscular média
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- Ig – Immunoglobulina
- IHC – Imuno-histoquímica
- IL – Interleucina
- INF – Interferon
- kcal – Quilocaloria

kDa – Quilodalton

kg – Quilograma

L – Litro

LPS – Lipopolissacarídeo

MALTs – Tecidos linfóides associados a mucosa

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

NBT – *Nitrobluetetrazolium*

NK – *Natural Killer*

nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Proteína bruta

PECs – Produtos extracelulares

PGE – Polietilenoglicol

pH – Potencial hidrogênico

Phdp – *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

rpm – Rotação por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TA – Temperatura ambiente

TEMED – *Tetrametil etilenodiamina*

TGO – Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP – Transaminase glutâmico-pirúvica

TNF – Fator de necrose tumoral

TSA – Ágar tríptico de soja

TSB – Caldo tríptico de soja

UFC – Unidade formadora de colônia

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura.

μS – Micro-Siemens

V – Volt

VG – Volume globular

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – SDS-PAGE do extrato purificado da gema. (P) Padrão Bio-Rad Precision Plus, (1) Amostra de IgY na concentração de 40 µg e (2) 80 µg/ml. Duas bandas protéicas foram expressas (setas): uma com peso molecular de 28 kDa, referente a cadeia leve e uma segunda com peso de 84 kDa (cadeia pesada) compatíveis com a estrutura molecular da IgY..... 20
- Figura 2 – Imagem ilustrativa dos dois métodos de imuno-histoquímica (IHC) para a detecção do microrganismo (I) e (II) aplicados para a detecção do microrganismo e de anticorpos IgY aponizados ao microrganismo nos órgãos e tecidos de *Rachycentron canadum*. *Phdp* não opsonizada, referente ao grupo controle que não recebeu o inoculo com imunoglobulina Y 26
- Figura 3 – 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) após imunização 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 27
- Figura 4 – *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 proteicas, aplicada no volume de 30µl por poço na concentração de 7,7 µg. 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 µm), bandas proteicas 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 1mg/ml diluído na proporção de 1:500..... 28
- Figura 5 – Imunomarcção de anticorpos IgY opsonizados nas 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 injeção intra-celomática de imunoglobulina, grupo IgY (48 horas) e 15 dias após o inóculo bacteriano no grupo IgY (15dias). Médias (n= 7) que apresentam letras maiúsculas diferentes se diferem significamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Hematoxilina de Harris. Barra: 10 μ m 29
- Figura 6 – Principais alterações morfológicas nas células sanguíneas de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. (a) Grupo controle positivo (desafiado) 24 horas, bacteremia, seta aponta para bastonetes, ao redor 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 (48horas) no tempo de 48 horas após infecção, monócitos ativados (ponta da seta) e um monócito com a morfologia celular normal (seta pontilhadas). Panótico (Barras: 10 μ m) 33
- Figura 7 – Concentração de EROS de leucócitos sanguíneos de *Rachycentrum 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). Médias (n= 8) que apresentam letras maiúsculas diferentes se diferem significamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey ($p>0,05$) 34
- Figura 8 – Principais alterações celulares no exsudato inflamatório celomático de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. (A) hemácias, exsudado hemorrágico em todas as imagens do grupo Controle positivo no tempo de 6 horas (*) e trombócitos (setas pontilhadas); (B) macrófagos normais (ponta da seta); (C) leucócitos segmentados

- (setas) e (D) macrófagos atóxicos com inúmeros vacúolos no citoplasma (seta pontilhada). Panótico rápido. Barra: 10 µm 36
- Figura 9 – Porcentagem (n= 10) de disseminação bacteriana nos órgãos 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). Letras maiúsculas comparadas respectivamente com a similar minúscula diferem estatisticamente entre os tratamentos. R=Rim, B=Baço e F=Fígado..... 37
- Figura 10 – Alterações histopatológicas em órgãos de *Rachycentron canadum* 48 horas após a infecção experimental com *Photobacterium damsela* subespécie *piscicida*. Órgãos do grupo C+. (A) Tecido cardíaco (seta pontilhada) dissociação de fibras musculares devido a edema e necrose focal (seta) infiltrado inflamatório no interstício do tecido cardíaco. (B) Tecido renal, (setas) necrose tubular. (C) Fígado (*) áreas de esteatose associada à necrose focal. H&E. Barra: 10 µm..... 39
- Figura 11 – Imunomarcagem positiva para *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* em órgãos de *Rachycentron canadum* 48 horas após a infecção experimental. (A) coração (B) rim, (C) fígado e (D) baço. Hematoxilina de Harris..... 41
- Figura 12 – Mecanismo de ação proposto da IgY *anti-Phdp* no bloqueio dos fatores de virulência do *Phdp* (ETO; FERNANDES, 2015). (A) Neutralização das fosfolipases (PLA2) representada na figura e de outras proteases e metaloproteases não representada na figura, resultando na redução do quadro hemolítico. (B) Efeito da opsonização no aumento do potencial fagocítico e na redução indireta da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). A ativação dos receptores (FcR) e complemento 3 (CR3) através de suas moléculas ligantes, induz a produção de EROs, em sinergismo com o processo fagocítico, porém a capsula de polissacarídeo (CP) bloqueia a ação das EROs, gerando um saldo negativo, de maneira que a produção aumentada destes reativos, não aumenta a eliminação do patógeno. Em contra partida, a Fc da IgY devido a distancia filogenética entre as espécies

não ativa os receptores (FcR) e complemento 3 (CR3) das células fagocíticas dos teleósteos, reduzindo a produção dos EROs por esta via. O receptor que reconhece a IgY e suas frações não foram elucidados, portanto a opsonização e posterior fagocitose do patógeno neutralizou o efeito protetor da CP, aumentando o potencial fagocítico, reduzindo a demanda e produção de EROs pelos fagócitos. (C) Efeito indireto das IgY na redução das citocinas pro-inflamatórias através da opsonização dos lipopolissacarídeos (LPS) inibindo a ativação dos receptores Toll like-4 (TRL-4) e CD14 na transcrição de genes de citocinas. A inibição do TRL-4, afeta sua interação com a proteína de diferenciação mielóide (MyD88) e, conseqüentemente a cascata de receptores de quinase associada (IRANK), fator de necrose tumoral 6 associado ao receptor (TRAF6) e fator nuclear *kappa* B (NFkB) bloqueando assim a transcrição dos genes de citocinas. (D) Bloqueio da exotoxina de 56 kDa indutora de apoptose (AIP56). A ação da exotoxina é iniciada através da endocitose por receptores clatrina, como sugerido por (PEREIRA et al., 2014), após a AIP56 é liberada no citoplasma, em seguida catalisa o NFkB que ativa a transcrição da cascata de apoptose celular nos fagócitos. O bloqueio extracelular da exotoxina pelas IgY específicas impediu a catalisação do NFkB e conseqüente a apoptose celular. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da água durante o período experimental	21
Tabela 2 – Valores médios ¹ (respectivos erro padrão) e análise de variância do perfil hematológico de <i>Rachycentron canadum</i> submetidos à infecção experimental com <i>Photobacterium damsela</i> subespécie <i>piscicida</i>	31
Tabela 3 – Valores médios ¹ (respectivos erros padrão) e análise de variância do perfil leucocitário de <i>Rachycentron canadum</i> submetidos a infecção experimental por <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	32
Tabela 4 – Valores médios ¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem total e diferencial de células presentes no exsudato inflamatório de <i>Rachycentrum canadum</i> desafiados com <i>Photobacterium damsela</i> subespécie <i>piscicida</i>	35
Tabela 5 – Valores médios ¹ (respectivos erro padrão) e análise de variância do perfil bioquímico de <i>Rachycentron canadum</i> submetidos a infecção experimental com <i>Photobacterium damsela</i> subespécie <i>piscicida</i>	40

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* USO TERAPÊUTICO E PROFILÁTICO EM *Rachycentron canadum*

RESUMO - *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) é importante agente causal de septicemia e pseudotuberculose, respectivamente nas fases aguda e crônica em peixes marinhos. O método de imunização e tratamento das infecções bacterianas em peixes é limitado à imunização ativa, com demanda bioenergética celular para gerar a resposta imune humoral. O uso de antibióticos na água, como forma terapêutica, resulta em resíduos na carne do peixe e no consumidor final humano, favorecendo o desenvolvimento da resistência microbiana. Este estudo teve como objetivos a produção e purificação de anticorpos IgY policlonais, extraídos da gema do ovo de galinha e específicos para as proteínas citoplasmáticas e de membrana bacteriana de *Phdp* e seus efeitos no controle da sepse aguda em *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente. Os resultados demonstram redução do acúmulo de células na inflamação aguda induzida, pela inoculação da bactéria homóloga na cavidade celomática e na atividade respiratória de leucócitos sanguíneos nos grupos que receberam anticorpos IgY 48 horas e 15 dias antes do desafio. Verificou-se ainda redução da disseminação bacteriana em fígado, rim, baço e coração que foi correlacionada com a diminuição das lesões renais e hepáticas e demonstrada no perfil bioquímico e histopatológico. Os resultados são promissores no que tange ao uso da imunoglobulina Y como método profilático e na imunoterapia de infecções bacterianas em organismos aquáticos.

Palavras-chave: cobia, Imunoglobulina Y, imunoterapia, sepsis, vacina

PRODUCTION OF ANTI-*Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* IGY ANTIBODY AND ITS THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC USE IN *Rachycentron canadum*

ABSTRACT - The *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* is an important causative agent of septicemia and pseudotuberculosis in the acute and chronic phases in marine fish, respectively. The method for immunization and treatment of bacterial infections in fish is limited to the active immunization, which demands cellular bioenergy to generate humoral immune response. The use of antibiotics in the water as a form of therapy results in residues in the meat that will be consumed by humans, favoring the development of microbial resistance. Thus, the aim of the study was to produce and purify polyclonal IgY, specific for membrane proteins of *P. damsela* ssp. *piscicida* (PMBphdp), extracted from the yolk of laying hens, and to observe its effects on the control of acute sepsis in experimentally infected *Rachycentron canadum*. The results showed reduction of cell accumulation in acute inflammation induced by inoculation of the homologous bacteria in the coelomic cavity and decrease in the respiratory activity of blood leukocytes in groups receiving IgY antibodies at 48 hours and 15 days before the challenge. It was also observed the reduction of bacterial dissemination to the liver, kidney and heart which was correlated with the decrease in liver and kidney damage, which was demonstrated by the biochemical and histopathological profile. The results are promising regarding the use of immunoglobulin Y as prophylactic method and for immunotherapy of microbial infections in aquatic organisms.

Keywords: cobia, Immunoglobulin Y, immunotherapy, sepsis, vaccine

1. INTRODUÇÃO

Photobacterium damsela subsp. *piscicida*, é o agente causador de septicemia aguda, pseudotuberculose ou pasteurelose em peixes marinhos, responsável por perdas econômicas significantes na aquicultura industrial (TSAI et al., 2014).

Existem atualmente duas alternativas para o tratamento de infecções microbianas em peixes de água doce e marinha. O profilático com o uso de vacinas ativas, bacterinas ou composta de proteínas de membrana ou citoplasmática de células bacterianas. Entretanto o manejo vacinal além de gerar custos de produção com alvenaria, equipamento e mão de obra, gera estresse nos peixes, respondendo com o aumento da cortisolemia que resulta na depressão da resposta imune e confere baixa resposta vacinal (ETO et al., 2015a).

O segundo método é o terapêutico com o uso de antibiótico na água ou na ração que representam riscos na geração de resistência microbiana afetando organismos aquáticos, mamíferos, aves e humanos, além de prejuízos ao ambiente. A oxitetraciclina é um dos antibióticos usados para o tratamento de bacterioses em peixes marinhos e dulciaquícolas, entretanto dois genes de resistência foram encontrados *tet(M)* e *tet(S)* em 151 isolados bacterianos intestinais de peixes marinhos criados 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 (KIM et al., 2004). O uso de anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas poedeiras representa alternativa no tratamento de bacterioses em organismos aquáticos. A inoculação via oral e celomática em truta arco-íris com anticorpos IgY específicos para antígenos bacterianos de *Vibrio anguillarum* protegeu os peixes com taxa de sobrevivência de 70% no grupo tratado (ARASTECH et al., 2004).

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 gera em média 100 mg de IgY na gema e como galinhas poedeiras produzem mais de 20 ovos por mês, a produção de IgY em 30 dias pode chegar a valores maiores do que dois gramas por animal (CHACANA e TERZOLO, 2007). 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 da diarreia de leitões por *Escherichia coli*, de úlcera gástrica por *Helicobacter pylori*, de micoses causadas por *Candida albicans*, da cinomose de cães e contra toxinas de venenos de animais peçonhentos (CHACANA et al., 2004). No Japão o tratamento com anticorpos da classe IgY específicos para antígenos de *Edwardsiella* administrados diretamente na água, conferiu relevante proteção em enguias japonesas (HATTA et al., 1994). Em trutas arco-íris a administração de IgY, anti-*Yersinia ruckeri* na ração resultou na proteção contra a infecção (LEE et al., 2002).

A resistência microbiana gerada pelo efeito residual de antibióticos na água apresenta efeito negativo global à saúde pública e a fatores sustentáveis do planeta. Desta forma o uso de anticorpos IgY representa alternativa no tratamento de enfermidades bacterianas de organismos aquáticos, graças à sua especificidade e ausência de efeito residual na água, no predador ou no consumidor humano. Portanto o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de anticorpos IgY específicos para proteínas de células bacterianas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e a determinação de seus efeitos profiláticos e terapêuticos na infecção experimental de *Rachycentron canadum* por bactérias homólogas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Perspectivas econômicas da piscicultura marinha no Brasil

Com a crise econômica mundial e o esgotamento das fontes potáveis de água doce no planeta a criação de peixes marinhos resulta em uma alternativa sustentável e economicamente promissora, já que o planeta apresenta uma porcentagem aproximada de 97,5% de água salgada e apenas 2,5% de água potável (UNESCO, 2015). Além de colaborar com as questões sustentáveis evitando uso das fontes potáveis de água, a produção marinha fornece importante fonte de proteína animal para a nutrição de seres humanos e animais domésticos ou de produção. Adicione-se a estes fatores que a

piscicultura marinha mundial resulta no maior crescimento dentre os demais setores da produção mundial (FAO, 2014).

A produção mundial de pescado em 2012 foi de 158 milhões de toneladas, dos quais 136,2 milhões de toneladas foram utilizadas no consumo humano (FAO, 2014). Da produção mundial de aquicultura no ano de 2012, (66,6 milhões de toneladas), 41,9 milhões de toneladas (62,9%) do total foi proveniente da aquicultura de água doce e 24,7 milhões de toneladas (37,1%), da aquicultura marinha (FAO, 2014).

O Brasil apresenta um crescimento exponencial no setor pesqueiro, com a geração de um PIB de R\$ 5 bilhões, fomentando a economia nacional, mobilizando 800 mil profissionais entre pescadores, aquicultores e tecnólogos de diferentes áreas, proporcionando 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos (BRASIL, 2014). O país possui características favoráveis para a implantação da piscicultura marinha pela extensa costa litorânea com cerca de 8.400 km, inteiramente diversificada em relação ao clima, que possibilita a adaptabilidade e a criação de inúmeras espécies de organismos aquáticos (ROMBENSO et al., 2009).

Várias espécies de peixes marinhos possuem potencial para a piscicultura dentre elas, a tainha (*Mugil sp.*), robalo (*Centropomus sp.*) a garoupa (*Epinephelus marginatus*), o pargo-rosa (*Pagrus pagrus*), o peixe-rei (*Odonthestes argentinensis*), a carapeba (*Eugerres brasilianus*), o mero (*Epinephelus itajara*), o badejo (*Myctero percarbonaci*) e o bijupirá (*Rachycentron canadum*) (BALDISSEROTTO; GOMES, 2010).

O interesse pelo bijupirá ou cobia ocorreu devido ao desempenho zootécnico favorável caracterizado pelo rápido crescimento, que atinge cerca de 4 a 8 quilos em um ano, e conversão alimentar relativamente baixa, fácil adaptação ao ambiente de cativeiro e disponibilidade de tecnologia para a criação de alevinos (CAVALLI; HAMILTON, 2009).

2.2. Produção de *Rachycentron canadum* e os principais fatores sanitários na criação

O *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) é a única espécie representante da família *Rachycentridae* e pertence à ordem dos Perciformes. Em inglês é conhecido como cobia, no Brasil recebe os nomes de bijupirá,

beijupirá, pirambijú e cação de escama, dependendo da região (BENETTI et al., 2010).

O bijupirá é teleósteo pelágico costeiro que migra sozinho ou raramente em pequenos cardumes. De hábito carnívoro pode se alimentar de peixes, caranguejos, camarões e lulas. A sua distribuição é ampla, encontrada em mares de água temperada, subtropical e tropical, com exceção do leste do oceano Pacífico e a costa europeia. No Brasil, é espécie nativa encontrada em todo o litoral, porém, mais frequente em águas tropicais (BENETTI et al., 2010).

O hábito de não formar cardumes faz com que poucos bijupirás sejam capturados pelos pescadores que sendo comercializados apenas para restaurantes litorâneos. Por isso os bijupirás são desconhecidos pela população das cidades do interior, e mesmo, em algumas localidades do litoral, o que limita a demanda pelo peixe (CAVALLI; HAMILTON, 2009).

A criação de bijupirá começou em pequena escala em Taiwan durante a década de 1970, onde se iniciou o desenvolvimento de tecnologia para a produção e reprodução. A partir de 1991, quando se conseguiu a reprodução de juvenis em larga escala, Taiwan tornou-se produtor de bijupirá em escala comercial (LIAO et al., 2004). Desde então a pesquisa e o desenvolvimento da produção de bijupirás difundiram-se para vários países, inicialmente, continente asiático e depois para a América Central, Caribe, Estados Unidos da América e América do Sul, especialmente, Brasil (SCHWARZ et al., 2007).

Em 2012 a produção mundial de bijupirá incluindo China, Taiwan, Colômbia, Panamá e Vietnã atingiu 41.774 toneladas e faturamento de aproximadamente US\$ 67 milhões. Não há dados estatísticos de produção do bijupirá no Brasil, mas, em se tratando de pesca extrativa, foram capturadas em 2011, 930 toneladas (FAO, 2012; MPA, 2014). Entretanto a expansão e a intensificação desta atividade como todas as outras gera problemas sanitários e epidemiológicos importantes, ocasionando aumento relativo dos níveis de estresse, com depressão dos mecanismos de defesa e aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e parasitárias (MORAES; MARTINS, 2004; MORAES; MORAES, 2009).

As principais doenças que afetam o bijupirá em confinamento são de etiologia bacteriana como a pasteurelose, vibriose e a estreptococose. Dentre elas, a pasteurelose causada pelo *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* é

considerada como ameaça para a maricultura mundial e causa de mortalidade massiva em bijupirás jovens criados em tanques-rede (LIU; LIN; LEE, 2003).

Apesar das perdas econômicas decorrentes de surtos de doenças e outros problemas ambientais ocorridos em Taiwan, o bijupirá mantém o interesse dos piscicultores e a sua produção aumenta continuamente desde a implantação na década de 1990. Isto prova a rentabilidade da criação de bijupirá em tanques-rede quando comparado com outros peixes marinhos (LIAO et al., 2004).

2.3. Classificação e fatores de virulência do *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*) pertence à família *Vibrionaceae* e causa doença septicêmica comumente conhecida como pasteurelose ou pseudotuberculose. Esta última denominação deve-se à característica macroscópica da lesão que lembra a micobacteriose em peixes. O termo photobacteriose também designa a doença, porém, é evitado por alguns autores para não confundir com as doenças ocasionadas pelas bactérias de outros gêneros de *Photobacterium* (TORANZO et al., 2009)

A *Phdp* é classificada como Gram negativa, halofílica, imóvel, pleomórfica e apresenta bipolaridade. O isolamento em meio de cultura ocorre em ágar tríptico de soja (TSA), ágar infusão de cérebro e coração (BHIA), ágar sangue, adicionado de 1% a 3% de cloreto de sódio (NaCl), ou em ágar marinho 2216E e incubação entre 22° C e 28° C em aerofilia. Dependendo da temperatura utilizada para a incubação o isolamento pode variar de 2 a 4 dias. Para a identificação presuntiva da bactéria é utilizado o *kit* API-20E, não sendo observada reação falso-positiva ou falso-negativa (ARIJO et al., 2005).

A taxa de letalidade verificada em juvenis de *sea bream* infectados pelo *Phdp* alcançou 90 a 100% e induziu mortalidade rapidamente. Um surto da doença com elevada mortalidade também ocorreu em cobias com peso médio de 3k, em 2000, em Taiwan (LIU; LIN; LEE, 2003).

Alguns fatores ambientais e individuais influenciam a susceptibilidade à infecção pelo *Phdp*. Os surtos podem ocorrer com maior frequência no verão devido a temperaturas elevadas, baixa salinidade e qualidade da água ruim. A temperatura elevada favorece a multiplicação de bactérias que coincide com a

época em que os peixes, geralmente, apresentam tamanho susceptível para infecção. *Gilthead sea bream* menores que 5 g são altamente susceptíveis à doença e a infecção aguda induz mortalidade de 90 a 100%. Ao atingirem tamanho maior que 50 g tornam-se resistentes, fato associado provavelmente à maior eficiência de ação de macrófagos e neutrófilos (NAGANO et al., 2009). Esta relação foi observada também em bijupirás nos quais, a bactéria isolada de peixes adultos com doença crônica causou elevada mortalidade em peixes jovens que desenvolveram uma forma aguda sem sinais típicos (LIU; LIN; LEE, 2003).

A via de transmissão do agente da pasteurelose é a água marinha. Estudos mostraram que, além da coluna de água, a *Phdp* pode se manter viável também no sedimento. Uma vez que a bactéria encontra-se na água necessita que esteja no estágio virulento para que a infecção possa ocorrer (ARIJO et al., 2005).

A patogênese da doença depende dos fatores de virulência que são moléculas expressadas e secretadas pelos agentes patogênicos. Os fatores possibilitam basicamente a adesão, invasão e evasão das células; evasão e inibição da resposta imune e obtenção de nutrientes do hospedeiro (CHEN et al., 2005).

O *Phdp* possui a capacidade de induzir o processo apoptótico nas células do sistema imune principalmente, macrófagos e neutrófilos. Isto evita a fagocitose e a morte do agente patogênico e funciona como um mecanismo de evasão que facilita a invasão das células do hospedeiro e disseminação do agente infeccioso. Acredita-se que um ou vários produtos secretados pela bactéria exerçam atividade apoptótica (SILVA et al., 2013).

A presença da cápsula de natureza polissacarídica na *Phdp* é outro fator relacionado com a virulência da bactéria que a torna resistente à fagocitose, como foi observado em macrófagos de *gilthead seabream in vitro* (SILVA et al., 2013).

A capacidade de o *Phdp* aderir, invadir e sobreviver no interior de células fagocíticas e linhagens de células epiteliais não-fagocíticas permite a manutenção da infecção e torna o hospedeiro, carreador do agente, como observado em *S. aurata*. Além disso, a permanência do *Phdp* no meio intracelular, provavelmente, protege-o contra os mecanismos de defesa

específicos e inespecíficos do hospedeiro, e agentes antimicrobianos exógenos, como os antibióticos. A manutenção da infecção ocorre por possibilitar a multiplicação do *Phdp* no meio intracelular que lisa a célula levando à morte e liberação da bactéria que invade as células adjacentes (ACOSTA et al., 2009).

O sequestro de ferro através de um sistema mediado por sideróforos de alta afinidade pelo ferro permite captá-lo e transportá-lo para o interior da bactéria. O ferro é essencial para a multiplicação da bactéria e para desencadear a doença. Além disso, o *Phdp* possui a capacidade de adquirir ferro do grupamento heme f da hemoglobina. (SILVA et al., 2013).

Outro fator importante para a patogênese da pasteurelose é a capacidade da *Phdp* sintetizar os produtos extracelulares com efeitos citotóxicos, hemolíticos e de fosfolipase que culminam com necrose das células (LIU; LIN; LEE, 2003; BAKOPOULOS et al., 2004).

O mecanismo de desenvolvimento da pasteurelose é multifatorial, complexo e ainda não é totalmente elucidado. Experimentalmente a doença foi induzida pela injeção intramuscular e intraperitoneal, administração gástrica, por imersão em água contendo a bactéria e por coabitação, na qual um peixe doente é introduzido em tanques contendo peixes sadios. Embora todas as vias tenham desencadeado a doença, a porta de entrada para a infecção natural ainda é desconhecida (NAGANO et al., 2009). Mas, sabe-se que a adesão e invasão da bactéria nas células do hospedeiro são essenciais para a infecção. Em *gilthead seabream*, o *Phdp* apresenta alta afinidade para adesão na mucosa intestinal (ARIJO et al., 2005).

Os achados necroscópicos da pasteurelose dependem da forma clínica de apresentação da doença e são semelhantes entre as diferentes espécies de peixes afetadas. As alterações externas, quando na forma aguda, geralmente não estão presentes, e quando observadas, há leve enegrecimento do corpo e/ou discreta hemorragia na cabeça, nadadeiras e brânquias. Na forma crônica da infecção natural verificam-se alterações em órgãos internos, principalmente, fígado, baço e rim caracterizadas pela presença de nódulos esbranquiçados, com cerca de 0,5 a 3,5 milímetros de diâmetro. À microscopia observam-se filamentos branquiais secundários colapsados e na parte basal colônias de bactérias no interior dos vasos sanguíneos. O rim, baço e fígado apresentam

necrose multifocal e acumulação de bactérias nos capilares e espaço intersticial (livres e/ou no interior de fagócitos). Os nódulos correspondem a lesões granulomatosas compostas pelas células epitelióides que circundam um centro necrótico contendo colônias de bactérias e detritos celulares (NAGANO et al., 2009).

Apesar de a pasteurelose representar uma grande ameaça para a piscicultura marinha, ainda não há medidas preventivas eficientes contra a doença. A antibioticoterapia é utilizada para controlar os surtos de pasteurelose e como consequência o *Phdp* adquiriu resistência a vários antibióticos em poucos anos. Diferentes plasmídios (plasmídio R) que facilitam a transferência horizontal do gene da resistência para kanamicina, sulfonamida, tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, florfenicol e eritromicina foram identificados no *Phdp*. A resistência do *Phdp* a multidrogas também foi observada e destaca o risco preocupante à saúde pública e animal (MORI; ISHIKAWA, 2012; CASTILHO et al., 2013).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz para prevenir a pasteurelose e reduzir o uso de antibióticos é o foco principal das pesquisas quando se trata de prevenção. Outro método alternativo adotado no controle da doença é a utilização de probióticos, como a bactéria ácido-láctica *Pediococcus pentosaceus* isolado do intestino de cobias adultas que parece inibir a multiplicação de *Phdp*, *in vitro* (XING et al., 2013). A seleção de reprodutores geneticamente resistentes à pasteurelose é outra estratégia para reduzir os surtos e evitar as perdas drásticas decorrentes de elevada mortalidade (BAERWALD et al., 2011).

2.4. Mecanismos da resposta imune inata e adquirida em peixes teleósteos

O sistema imune dos peixes apresenta resposta imune inata e adquirida compostas por células, moléculas, órgãos e tecidos linfóides (ETO et al., 2014). Os peixes teleósteos apresentam no sistema imune inato três componentes, quais sejam, epitélio/mucoso, humoral e celular. As barreiras epiteliais e mucosas da pele, brânquias e trato alimentar são de alta relevância para os peixes que estão constantemente imersos em ambiente que contém agentes potencialmente patogênicos. Além da proteção física e mecânica o

muco contém fatores como peptídeos anti-microbianos, fatores do sistema complemento e imunoglobulinas (Ig) (SANTOS et al., 2010).

Os parâmetros humorais são expressos por receptores celulares ou moléculas solúveis, como o sistema complemento. Atividade hemolítica espontânea é atribuída à via alternativa do sistema complemento frequentemente elevada nos soro de peixes, além da atividade da lisozima, com importantes efeitos bactericidas. Outros parâmetros incluem as lecitinas, proteína C reativa e amiloide P, importantes na fase aguda da resposta, como moléculas de reconhecimento de proteínas (SAURABH; SAHOO 2008). Há ainda fatores que limitam o crescimento bacteriano como a transferrina e o interferon que age contra infecções virais (FURNES; SEPPOLA; ROBERTSEN, 2009).

Quanto ao componente celular são importantes os monócitos/macrófagos, linfócitos, neutrófilos e trombócitos (SUBRAMANIAN; ROSS; MACKINNON, 2008). A resposta imune inata em peixes é importante ferramenta de defesa contra patógenos, sendo compensatório à resposta imune adquirida, que se desenvolve lentamente em comparação com a de vertebrados modernos e sofre influência da temperatura ambiente uma vez que são de sangue frio, para o desenvolvimento da resposta imune adquirida (WHYTE, 2007).

O sistema imune adquirido dos peixes é subdividido em resposta imune humoral e celular, envolvendo os órgãos e tecidos linfóides (primários e secundários), células apresentadoras de antígeno (APCs), linfócitos T e B, imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento (RANDELLI; BUONOCORE; SCAPIGLIATI, 2008).

Os peixes apresentam órgãos linfóides primários como o rim cefálico, equivalente à medula óssea e timo dos mamíferos e os órgãos e tecidos linfóides secundários representados pelo baço e tecidos linfóides associados à mucosa intestinal (MALTS), localizados no íleo do trato gastrointestinal e brânquias (ETO et al., 2015b).

As características fundamentais, da resposta imune humoral e celular, foram descritas em peixes teleósteos, com presença de células T e B, imunoglobulinas, moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) tipo I e II e citocinas (RAKUS et al., 2009).

2.4.1. Resposta imune humoral em teleósteos

A resposta imune humoral dos peixes teleósteos diferencia-se da dos vertebrados superiores por não apresentar anticorpos da classe IgG, mas sim a imunoglobulina da classe IgM como principal anticorpo das respostas imunes humorais primária e secundária (FERNANDES et al., 2015).

A resposta imune humoral é representada por reações mediadas pela produção de imunoglobulinas, constituídas por uma molécula tetramérica, similar a IgM de mamíferos após a sensibilização prévia (RANDELLI; BUONOCORE; SCAPIGLIATI, 2008). A IgM existe sob duas formas alternadas, uma como receptor de membrana para antígenos de superfície de células B e outra como proteína solúvel secretada como componente de fluídos corporais (ACOSTA et al., 2009). Além de IgM existem outras três imunoglobulinas, a IgD (HIRONO et al., 2003), IgZ (DANILOVA et al., 2005) e IgT (HANSEN; LANDIS; PHILLIPS, 2005), cujas funções na resposta imune humoral de teleósteos são pouco conhecidas.

2.4.2. Vacinas bacterianas em teleósteos

Diferentes métodos de vacinação são aplicados para a profilaxia de doenças em peixes (MARCUSSO, et al., 2013). A eficácia da vacina está relacionada com a via de aplicação (ETO et al., 2012).

A vacinação em piscicultura surge como alternativa ao uso de antibióticos e outros produtos químicos, na prevenção de infecções (ROMANO; MEJÍA, 2003). A habilidade dos peixes em desenvolver imunidade contra determinado microrganismo depende da idade do peixe, da temperatura da água, do agente de imunização e do método de vacinação (MARCUSSO, et al., 2013).

A maioria das vacinas bacterianas é inativada e administrada por injeção ou imersão. A aplicação das vacinas pela via intraperitoneal (ip) é o método mais confiável e eficaz, quando comparada à via oral e imersão. As desvantagens desta via incluem estresse extra para os peixes, custos, segurança e tempo requerido para administração da vacina e para o desenvolvimento de imunidade (ETO et al., 2015a).

2.5. Mecanismos da resposta imune inata e adquirida das aves

O sistema imune das aves é funcionalmente semelhante ao dos mamíferos, sendo constituído por vários mecanismos de defesa contra microrganismos (FERNANDES et al., 2013). Estes mecanismos incluem barreiras físicas, químicas e biológicas tais como a pele e mucosas; citocinas, peptídeos antimicrobianos e os componentes do sistema complemento, células, (linfócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) e tecidos e órgãos linfóides (OLÁH; VERVEDE, 2008).

A resposta imune das aves pode ser dividida em resposta imune inata, que representa a primeira linha de defesa do organismo após o rompimento das barreiras físicas, químicas e biológicas iniciais, e a resposta imune adaptativa (OLÁH; VERVEDE, 2008). A resposta imune inata envolve a participação de células fagocíticas, moléculas do sistema complemento e anticorpos naturais, entre outras moléculas, além de células não linfóides (ETO et al., 2012). Por outro lado, a resposta imune adaptativa é o resultado da cooperação entre linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos e anticorpos específicos, e tem duas propriedades básicas: a especificidade e a memória imunológica (ANDRADE et al., 2009). A especificidade é a capacidade da molécula de anticorpo e dos receptores de membrana dos linfócitos T se ligarem ao antígeno específico. Enquanto a memória imunológica é um fenômeno relacionado à expansão clonal, ocorrendo a diferenciação de dois clones de células: efectoras e de memória, a partir de um linfócito B ou T específico para um antígeno. As células de memória são células que têm a mesma especificidade do linfócito B do qual são originadas e sobrevivem no organismo por um longo período de tempo (FELLAH; JAFFREDO; DUNON, 2008).

A resposta imune inata é composta de células fagocíticas, moléculas do sistema complemento e anticorpos naturais da classe IgM. A fagocitose ocorre diretamente por meio de receptores de membrana dos fagócitos, ou por opsonização dos microrganismos e por anticorpos ou moléculas do complemento. A opsonização via anticorpos e molécula C1q do complemento interligam a resposta imune inata à resposta imune adaptativa, colaborando para a eliminação e neutralização do patógeno ou agente agressor (SCOTT, 2004). Desta forma a resposta imune adaptativa pode potencializar a resposta

imune inata, facilitando a captura e fagocitose do microrganismo. Por outro lado, a resposta imune inata estimula a resposta imune adaptativa por meio da captura do antígeno por células especializadas, conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs), que apresentam peptídeos antigênicos aos linfócitos T, via moléculas de histocompatibilidade principal, e estimulam a ativação e produção de anticorpos pelos linfócitos B (MITCHELL; JOHNS, 2008).

A resposta imune adaptativa pode ser subdividida em resposta imune humoral e em resposta imune celular. A primeira tem como moléculas efetoras os anticorpos produzidos pelos plasmócitos. A resposta imune humoral é em parte, dependente dos linfócitos T auxiliares (CD4+), especificamente a população de células efetoras auxiliares do tipo 2 (*T helper 2*, Th2). Esta resposta é mais eficiente na eliminação de microrganismos extracelulares (ERF, 2004; JANEWAY, 2000). A imunidade celular é dirigida contra patógenos intracelulares (vírus, bactérias e parasitas intracelulares) ou contra células alteradas do próprio organismo. Esta resposta é dependente de linfócitos T CD4+ sub-população efetora Th1, linfócitos T CD8+ (citotóxico) e células *Natural Killer* (NK) (OLÁH; VERVEDE, 2008).

O desenvolvimento da resposta imune celular e humoral está intimamente ligado aos órgãos e tecidos linfóides. Nas aves, os leucócitos, trombócitos e eritrócitos são gerados na medula óssea. Local onde os eritrócitos, os heterófilos, basófilos e eosinófilos e monócitos sofrem o processo de desenvolvimento e maturação e migram para a circulação sistêmica e para tecidos e órgãos linfóides secundários (ETO et al., 2012).

2.5.1. Resposta imune humoral em aves

A diferenciação dos linfócitos B ocorre na bursa de Fabrício. Os linfócitos B podem reconhecer antígenos por meio de imunoglobulinas de membrana, semelhante ao que ocorre em mamíferos. Nas aves, porém, existem apenas três classes de anticorpos: IgY, IgM e IgA (ALMEIDA et al., 2008). As citocinas que estimulam a resposta imune humoral são IL-4, IL-5, IL-10 e o fator de crescimento transformador - β (TGF- β) (SCOTT, 2004).

Em aves a IL-6 é responsável pela diferenciação e, especialmente, a diferenciação das células B em plasmócitos secretores de anticorpos

(RATCLIFFE, 2002). As citocinas IL-5 e IL-15 foram identificadas em aves e também atuam na resposta humoral na diferenciação das células B nos tecidos linfóides associado ao trato gastrointestinal (GALT) (HIROI et al., 2000; RATCLIFFE, 2002).

2.5.2. Imunoglobulinas em aves

A IgM é imunoglobulina de fase aguda, produzida durante a resposta imune primária e secretada em forma de pentâmero e expressa também na forma receptores de membrana plasmática de linfócitos B (ALMEIDA et al., 2008). As IgA são imunoglobulinas predominantemente produzidas pelos plasmócitos presentes nas placas de Peyer e nos MALTs presentes nas tonsilas cecais (OLÁH; VERVEDE, 2008). A IgY é análoga da IgG e IgE dos mamíferos, com baixa massa molecular, sendo predominantemente presente no soro, e são responsáveis pela defesa contra infecções sistêmicas e pelas reações anafiláticas em aves. Estudos mostraram diferenças na massa molecular das cadeias pesadas de IgY, que apresenta massa molecular de aproximadamente 67.500 daltons, enquanto a IgG dos mamíferos tem cerca de 50.000 daltons (MENDOZA et al., 2012). A IgY é imunoglobulina sistêmicas, produzida após a resposta imune secundária, com função de opsonização e é caracterizada como imunoglobulina de fase crônica.

2.5.3. Mecanismos de transferência de anticorpos maternos em aves

A transferência passiva de anticorpos maternos para sua prole em mamíferos é realizada pela placenta, via circulação materno-fetal, ou pelo colostro que é um exemplo de transferência passiva de anticorpos após a vida intra-uterina (GRINDSTAFF; BRODIE III; ELLEN, 2003).

Em aves a transferência de anticorpos maternos ocorre apenas pela passagem de anticorpos para a gema do ovo em desenvolvimento. A transferência é ocorre em duas etapas (HAMAL et al., 2006). A primeira tem início com a deposição de anticorpos na gema, utilizando receptores para IgY localizados nos capilares presentes nos folículos ovarianos, que capturam estas moléculas da circulação sanguínea materna (WEST; HERR; BJORKMAN, 2004). A proporção de IgY depositada no folículo é proporcional a quantidade presente no soro materno. A porcentagem de IgY transferida do

plasma materno para a gema é de 30%, enquanto apenas 1% de IgM e IgA são depositadas na clara, através dos tecidos linfóides ligados as mucosas do oviduto (HAMAL et al., 2006). A segunda etapa é a transferência de anticorpos do saco da gema para o embrião em formação. Acredita-se que os anticorpos IgY sejam transferidos por difusão do saco da gema para a circulação embrionária. A transferência de IgY inicia-se no 7° dia do estágio embrionário e aumenta progressivamente do 14° ao 21° dias da vida intra-ovo (HANCONG et al., 2013).

Segundo Faulkner et al. (2013) a IgA e IgM são imunoglobulinas predominantes na clara do ovo e sua taxa de transferência da circulação maternal sistêmica para a prole é de 1% .

2.5.4. Biotecnologia da produção de anticorpos IgY e sua aplicação na imunoterapia de organismos aquáticos

Devido à distância filogenética entre aves e mamíferos as aves produzem anticorpos com alto grau de afinidade contra antígenos de mamíferos (CHACANA et al., 2004; MUNHOZ et al., 2014).

A principal imunoglobulina encontrada nas aves é a IgY, cujas características estruturais assemelham-se à IgG de mamíferos. A IgY tem massa molecular de aproximadamente 160 kDa, apresenta ponto isoelétrico variando entre 5,7 e 7,6 e é constituída por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Cada cadeia leve apresenta massa molecular de aproximadamente 18 kDa e é formada por uma região variável e uma região constante. A cadeia pesada tem uma massa molecular de 65 kDa e é formada por uma região variável e quatro regiões constantes. Como ocorre na IgG de mamíferos a região Fc da Ig Y aviária é responsável por suas funções biológicas efetoras como a fixação do complemento e opsonização (CARLANDER, 2002; MUNHOZ et al., 2014).

Além de estar presente no sangue das aves a IgY pode ser encontrada na gema dos ovos em altas concentrações, enquanto que a IgM e a IgA são principalmente encontradas na clara. Receptores para IgY presentes nos folículos ovarianos captam estas moléculas da circulação sanguínea materna e transferem para a gema. A quantidade de IgY transferida independe do

tamanho do ovo e está relacionada com sua concentração no soro plasmático das galinhas (MORRISON et al., 2001).

Uma vez que os anticorpos podem ser extraídos da gema do ovo de galinha, o uso de IgY representa alternativa interessante para o controle de enfermidades infecciosas em peixes. A produção de IgY tem baixo custo de produção, pode ser produzida em grandes quantidades e não é necessário sacrificar a ave para obtê-la (CHACANA; TERZOLO, 2004; BAE et al., 2009).

A porção Fc da IgY não ativa o sistema complemento, nem apresenta reações cruzadas com fatores reumatóides. Assim, minimizam-se as falsas reações positivas quando são avaliados marcadores de inflamação como a proteína C reativa, uma característica importante para o estudo dos processos inflamatórios. Além disso, a IgY apresenta menor fluorescência inespecífica em preparações imunofluorescentes e também pode ser usada na maioria dos testes de aglutinação (MUNHOZ et al., 2014).

Galinhas inoculadas com antígenos bacterianos transferem anticorpos específicos da classe Ig Y para gema do ovo. Estes podem ser purificados e transferidos para o hospedeiro que se deseja imunizar (CHACANA et al., 2004; MUNHOZ et al., 2014).

A transferência passiva de IgY como profilático contra doenças infecciosas neutraliza a aderência de agentes microbianos aos tecidos alvo, 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 (CHALGHOUMI et al., 2009).

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 (HATTA et al., 1994). Em trutas arco-íris a administração de IgY anti-*Yersinia ruckeri* na ração resultou na proteção contra infecção (LEE et al., 2002).

O uso de anticorpos específicos como o IgY na profilaxia e terapêutica das infecções estreptocócicas (CHACANA, et al., 2004) poderia amenizar o aumento da resistência causada pelo uso indiscriminado de antibióticos.

Isto posto, deve-se considerar que a maioria das enfermidades bacterianas de peixes de cativeiro têm como agente as bactérias comensais e

fungos saprófitos, que tornam-se patogênicas ao hospedeiro em função da imunodepressão causada pelo estresse (MORAES; MORAES, 2009). Assim a efetividade da resposta imune às bacterinas é dependente dos níveis de estresse a qual os peixes são submetidos. Este tipo de problema não afetaria a efetividade da imunização produzida pela transferência passiva de anticorpos específicos.

3. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e avaliar a produção, a transferência passiva e a proteção por anticorpos IgY anti-*Phdp*, extraídos da gema do ovo de galinhas *White Leghorn* vacinadas contra a pasterurelose em *Rachycentron canadum* experimentalmente infectados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento e identificação de cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*)

As cepas foram isoladas de bijupirás (*Rachicentrum canadum*) naturalmente infectados, que apresentaram sinais clínicos compatíveis com a infecção bacteriana. Os peixes doentes sofreram eutanásia e durante a necropsia foram coletados assépticamente fragmentos de órgãos que foram semeados em placas de ágar BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO®), suplementado com 3% de NaCl. Após o crescimento em estufa a 28 °C, por 48 horas, as colônias suspeitas foram identificadas por métodos morfológicos, tintoriais e bioquímicos (catalase e oxidadese). Posteriormente o microrganismo foi encaminhado ao Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos da Universidade Federal de Minas Gerais e o DNA microbiano foi extraído com o *kit* DNeasy (Qiagen, Alemanha) e o gene 16S RNA ribossômico foi amplificado e sequenciado de acordo com Mian et al. (2009).

A sequência foi analisada pelo algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a determinação da espécie bacteriana. A similaridade foi de 98% na análise do BLAST, com a amostra de referência para *Phdp*.

4.1.2. Purificação das frações protéicas solúveis (FS) e insolúveis (FI) de (*Phdp*)

As frações proteicas foram preparadas de acordo com o procedimento descrito por CHART (1994) com algumas modificações. O microrganismo foi semeado em 500 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO®) suplementado com 3% de NaCl. Após cinco dias de incubação a 29,0°C, em aerofilia, o meio foi centrifugado à 4.000 g (4 °C), durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a massa bacteriana ressuspensa em 500 mL de PBS (tampão fosfato) e novamente centrifugada à 4.000 g (4 °C), durante 20 minutos. Essa operação foi repetida por mais três vezes. Finalmente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensa em 5,0 mL de tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,4, contendo EDTA 1mM, submetida a três ciclos de sonicassão por 30 segundos na potência de 150W, em sonicador Sonifer 250 (Branson®). As células intactas foram retiradas por centrifugação 10.000 g, durante uma hora, a 4°C, e o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 x g, por 2 horas, a 4 °C, Finalmente o sobrenadante (fração citoplasmática) foi armazenado e o precipitado foi ressuspensa em 1mL de tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,4. A seguir foi adicionado o mesmo volume ($\frac{1}{1}$) de detergente de sódio (Sarkosyl ®) e a reação mantida sob agitação constante à temperatura ambiente (TA), centrifugado à 100.000g , por 2 horas, à 4 °C. Alíquotas de 1mL da fração total (FT), (FS) e (FI), foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C.

4.1.3. Determinação da concentração de proteínas nas amostras

A concentração de proteína do extrato purificado da gema e das frações solúveis e insolúveis foi determinada de acordo com Hartree (1972), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA), fração V como padrão protéico.

4.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) das frações proteicas microbianas

Foi utilizada a metodologia descrita por Laemmli (1970) e a eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 9% em TA, a 100 V. Após a corrida, os géis foram removidos, fixados, corados com Comassie brilhante blue R e

descolorados com metanol (10%) ácido acético (10%) e água (V/V/V), até visualização nítida das proteínas.

4.2. Aves, imunização e coleta de soro e gema

Sete aves da linhagem *White Leghorn*, em idade inicial de postura (32 semanas de vida) proveniente do Laboratório de Ciências Avícolas (Lavinesp – FCAV – UNESP), foram separadas em gaiolas individuais e mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, em TA, entre 26 e 29 °C, com umidade relativa do ar entre 63 e 75%, água potável a vontade e ração comercial de postura (100g/ave dia). As aves foram imunizadas com a fração total (citoplasmática e de membrana) de Phdp na concentração de 100 µg e no volume de 200 µL, diluído em PBS 0.15 M, pH 7,4, conjugado com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freud (Sigma-Aldrich, USA), injetado em dois pontos distintos do músculo peitoral. As aves receberam doses reforços a cada 15 dias, durante 90 dias. O soro foi coletado 15 dias após cada inoculação e os ovos 3 dias antes da coleta do soro totalizando 2 a 3 ovos por ave. O soro foi desfibrinado e os ovos foram reunidos em “pool” (3 ovos) por ave, e 500 µL de gema foi diluídos em microtubos contendo 1,5 mL de PBS, 0,15M, pH 7,4, e o restante da gema armazenado em sacos plásticos para posterior purificação e as amostras armazenadas a -20 °C.

4.2.1. Detecção de imunoglobulinas Y específicas para *Phdp* no soro e na gema (ELISA indireto)

Foi utilizada a metodologia descrita por (ETO et al., 2015a). Inicialmente uma micro placa com 96 poços de fundo chato, (Costar®) foi pré-sensibilizada com 100 µL por poço de poli-L-lisina 0.05% diluída (v/v) em tampão PBS 0,15 M, pH 7,2 e incubada por 60 minutos em TA, lavados duas vezes com PBS-Tween-20 a 0,005%. A seguir 100µL da fração total na contendo 10µg /mL foi adsorvida em cada poço, incubada a 4°C, durante 18 horas, fixado com 100 µL de glutaraldeído 0,005% (v/v) em tampão PBS 0,15 M, pH 7,2, e incubada por 20 minutos, a 22 °C.

Após o período de incubação, cada poço foi lavado três vezes com PBS-Tween. A seguir foi adicionado 250 µL de PBS contendo leite Molico ®

5% em cada poço e a placa incubada por 1 hora, em TA, lavada com PBS-Tween.

A seguir foram adicionados, em cada poço, 100 µL da amostra de soro diluídos (1:1000 v/v) ou de gema (1:2000 v/v), em PBS-leite 1%, incubado por uma hora em TA, lavado com PBS-Tween 20 a 0,05%, adicionado 100µL/poço de anti-IgY peroxidase (HRP), incubado por uma hora em TA. Após lavagens com PBS-Tween 20 a 0,05 % foi adicionado o substrato (H_2O_2 /ABST) seguido de incubação em TA, por 15 minutos. A reação foi interrompida com solução de SDS 5% e a absorbância foi determinada em leitor Multiskan a 640 nm.

4.2.2. Avaliação do potencial de afinidade da IgY anti-*Phdp* (ELISA indireto)

Neste estudo foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item anterior com as seguintes modificações. Após a incubação do soro ou da gema por 2 horas em TA, cada poço foi lavado com PBS-Tween, adicionados 100 µL de $MgCl_2$ 2M e no controle 100 µL de PBS-Tween. Após 5 minutos a TA cada poço foi lavado com PBS-Tween, adicionado 100 µL de anti-IgY peroxidase (HRP) e incubado por uma hora, em TA. Após lavagens com PBS-Tween foram adicionados 100 µL de substrato/cromógeno (H_2O_2 /ABTS) e incubados em TA por 15 minutos. A reação foi interrompida com solução de 5% SDS e a leitura realizada em leitor Multiskan a 640 nm.

4.2.3. Purificação de IgY

Os anticorpos IgY policlonais foram purificados de acordo com a metodologia descrita por Pauly et al. (2011).

A eletroforese em SDS-PAGE (Figura 1) confirmou a presença de duas moléculas protéicas, compatíveis com a cadeia leve de massa molecular de 28 kDa e pesada de 84 kDa da estrutura molecular da IgY.

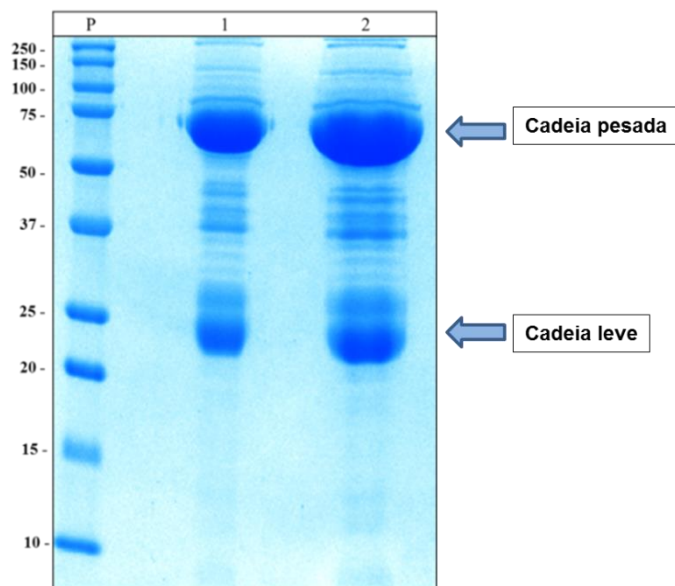


Figura 1. SDS-PAGE do extrato purificado da gema. (P) Padrão Bio-Rad Precision Plus, (1) Amostra de IgY na concentração de 40 µg e (2) 80 µg/ml. Duas bandas protéicas foram expressas (setas): uma com peso molecular de 28 kDa, referente a cadeia leve e uma segunda com peso de 84 kDa (cadeia pesada) compatíveis com a estrutura molecular da IgY

4.2.4. Western blot

As proteínas das frações FT, FS e FI, foram transferidas para membrana de nitrocelulose sob voltagem constante (30V), a 4 °C, durante 18 horas. A seguir a membrana foi incubada com PBS-leite a 5%, em TA, por uma hora, sob agitação contínua, lavada 5 vezes, por 5 minutos, com PBS-Tween 0,1% e, incubada sob agitação por uma hora, com solução de IgY pura contendo 1mg/mL, dissolvida em PBS-Leite a 1% na proporção de 1:2000, lavada 5 vezes, por 5 minutos, com PBS-Tween 0,1%, e o conjugado anti-IgY peroxidase, diluído em PBS-Leite a 1% na proporção de 1:2000, adicionadas a membrana e incubada por uma hora, sob agitação em TA.

4.3. Efeitos terapêuticos da IgY na infecção aguda por *Phdp* em *Rachycentron canadum*

2.3.1. Delineamento experimental dos peixes e acondicionamento

Estes testes foram realizados na maricultura Itapema, localizada no município litorâneo de São Sebastião no Estado de São Paulo, durante o segundo semestre de 2013. Inicialmente, utilizando-se 200 bijupirás

Rachycentron canadum, com peso médio de 380 g, distribuídos em quatro tanques (50 peixes/tanque) com capacidade para 10.000 L na densidade de 13,8 kg/m³ (50 peixes/tanque). Cada tanque foi mantido com fluxo contínuo de água (aproximadamente 20 L/min) e aeração constante.

Os grupos foram distribuídos aleatoriamente (DIC) da seguinte forma:

1) C (negativo) - não imunizado e não desafiado

2) C (positivo) - não imunizado e desafiado

3) IgY (15 Dias) - Imunoterapia com anticorpos IgY anti- *Phdp*, 15 dias antes do desafio.

4) IgY (48 horas) - Imunoterapia com anticorpos IgY anti- *Phdp*, 48 horas antes do desafio.

Sete amostras de material biológico de peixes foram coletadas do grupo controle (negativo) para as várias análises.

Os parâmetros de qualidade da água durante o percurso experimental estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros da água durante o período experimental

Parâmetros		
pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Oxigênio Dissolvido (mg/L^1)
7,92	164	7,5

¹Média dos parâmetros da água, leitura duas vezes ao dia durante 30 dias, pH (potencial Hidrogeniônico).

4.3.2. Monitoramento da meia vida plasmática dos anticorpos IgY específicos em *Rachycentron canadum*

As concentrações séricas de IgY anti-*Phdp* injetadas foram quantificadas em 10 peixes por tempo e grupo (n= 40), grupo IgY (15 Dias) no tempo pré-imune e 15 dias após a imunização e grupo IgY (48 horas) no tempo (pré-imune) e 48 horas após a injeção. O método utilizado foi o ensaio de ELISA indireto descrito no item 2.6. com modificações na diluição e no tempo de incubação do anticorpo primário. O soro dos peixes foi diluído na concentração de 1:1 em volume final de 200 μL e incubados por 1 hora em TA

e 18 horas à 4°C. Em seguida o protocolo se desenvolveu conforme descrito anteriormente.

4.3.3. Determinação da dose letal 50 (DL50)

O Phdp isolado e identificado conforme descrito no item 4.1., foi reativada em vivo e, em experimento prévio, utilizou-se 20 bijupirás com peso médio de 360 g para determinar a concentração da dose letal (DL50) a ser usada na infecção experimental. Para tanto os peixes foram transferidos e redistribuídos para 4 caixas de água com o volume útil de 350 L, totalizando 5 peixes por caixa. O *pool* bacteriano foi lavado e ressuspenso em PBS 0,15 M, pH 7,2, esterilizado como descrito no item 4.1.1. E quatro concentrações baseadas na escala de Mc Farland (tubos 4, 6,8 e 10) foram confeccionadas e cada grupo recebeu uma concentração. O período de avaliação da mortalidade foi de 48 horas após o inóculo.

4.3.4. Soroterapia e Infecção experimental

Para a imunização os peixes do grupo IgY 15 dias e do grupo 48 horas, foram anestesiados com benzocaína diluída (1g/10mL) de acordo com (WEDEMEYER, 1970). Os peixes foram injetados com a solução de IgY (grupos experimentais) e PBS (controle positivo) via celomática com 200 µL na concentração 14 mg/mL de IgY. Após os tratamentos todos os grupos com exceção do controle negativo, foram inoculados com 1,0 mL de bactéria ativa na concentração de 10⁶ UFC/mL.

Para as avaliações laboratoriais os peixes foram submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico, nos tempos de 6, 24 e 48 horas pós-estímulo (DL50 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*).

4.3.5. Perfil hematológico e bioquímico

A avaliação do perfil hematológico incluindo hemograma e leucograma foi realizado conforme o protocolo descrito por Tavares-Dias e Moraes (2003). As amostras de sangue foram coletadas em tempos pré-determinados por punção do vaso caudal, com seringas contendo EDTA 10% (ácido etilenodiaminotetraacético), Os leucócitos foram avaliados quanto a presença

de alterações morfológicas e sua identificação e nomenclatura seguiram as recomendações de Tavares-Dias et al. (1999).

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automático multicanal ChemWell®, por meio de “kits” comerciais (Labtest Diagnóstica). O equipamento foi previamente calibrado com Calibra H e aferido com soro, o controle de valor conhecido Qualitrol H (Labtest Diagnóstica®). As atividades de creatinina quinase CK (método cinético UV), transaminase glutâmico-oxalacética TGO (método cinético UV-IFCC), transaminase glutâmico-pirúvica TGP (método cinético UV-IFCC) e Ferro sérico (Fe), foram determinadas no soro. Já, a glicemia foi determinada no sangue utilizando-se analisador rápido para glicose “OneTouch Ultra Mini™” da Johnson & Johnson Medical.

4.3.6. Atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos

A concentração de espécies reativas do oxigênio de leucócitos do sangue dos peixes foi determinada conforme descrito por (ANDERSON e SIWICKI, 1995; CASTRO et al., 2014). Após a coleta 100 µL de sangue heparinizado foi adicionado a 100 µL do corante “nitrobluetetrazolium” (NBT, Sigma, ST Luis, MO, USA), e adicionados 25 µL de PMA 10⁻⁵ (Forbol-12-Miristato-13-Acetato, 99% - 1mg), incubada por 30 minutos, em TA (±26 °C), constituindo-se a solução I. Uma alíquota de 50 µL da solução I foi adicionada a 1,0 mL de DMF (N, N-dimetilformamida-Sigma-Aldrich®), homogeneizado, centrifugado a 1500g, por 5 minutos. E a absorbância do sobrenadante foi determinada no comprimento de 540 nm.

4.3.7. Coleta dos leucócitos peritoneais

Para a coleta do exsudato os peixes foram colocados em decúbito dorsal e 3,0 mL da solução de PBS + EDTA 10% refrigerada foram injetados na cavidade celomática, aspirado, acondicionado em microtubos para contagem total de leucócitos e confecção de esfregaço para o diferencial. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio de luz e a extensão do exsudato foi analisada.

4.3.8. Exame histopatológico

Após a inoculação das bactérias quatro peixes de cada grupo (n=64) para cada tempo (6, 24 e 48 horas) foram submetidos à necropsia e fragmentos de coração, fígado, baço, rim cefálico e cranial foram coletados, fixados em formaldeído 10% tamponado e posteriormente, conservado em álcool 70% até a etapa de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. O material incluído em parafina e submetido a 10 cortes semi-seriados de 5,0 nm e corados por hematoxilina-eosina e as lesões descritas (FREITAS-NETO et al., 2003).

4.3.9. Distribuição e disseminação bacteriana nos órgãos e tecidos

A porcentagem da disseminação bacteriana foi determinada por meio do reisolamento a partir do coração, fígado, baço e rim com o objetivo de identificar a presença ou a ausência da bactéria nos órgãos, e quantificar a porcentagem de sua distribuição nos tempos pré-determinados (6, 24 e 48 horas após infecção experimental). Para tanto dez peixes por grupo e tempo, (n=90) foram eutanasiados e feito o reisolamento nos órgãos pelo método de semeadura em placas de Petri, contendo meio BHI suplementado com 3% de NaCl e mantidas em temperatura 29 °C, em estufa bacteriológica. As análises bioquímicas e tintoriais foram realizadas após 48 horas nas colônias suspeitas. Os resultados foram expressos em porcentagem para cada órgão positivo foi agregado um valor de 10% totalizando 100% o total para dez peixes por grupo e tempo e os negativos o valor de (Zero).

4.4. Imuno-histoquímica (IHC)

A técnica de imunohistoquímica utilizada foi a descrita por Manrique et al. (2015) com modificações. Foram realizados dois ensaios de IHC como esquematizado na Figura 2. O primeiro ensaio foi realizado para detectar o microrganismo nos órgãos e tecidos infectados, e o segundo para detectar a IgY anti-*Phdp* neutralizada ao microrganismo. A recuperação antigênica foi realizada por calor úmido (panela de pressão) com tampão citrato (pH 6,0), por 15 minutos. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução comercial (Dako Dual Endogenous), durante uma hora, seguido de um banho em tampão Tris HCL (pH 7,4), por cinco minutos e um novo bloqueio da

peroxidase com água oxigenada (30 volumes) e álcool metílico (10%), por uma hora em câmara escura, seguido de duas lavagens com Tris HCL (pH 7,4) e mais duas lavagens com água destilada. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com leite em pó Molico[®] a 8% por uma hora em câmara úmida e em TA seguido de uma lavagem com Tris HCl (pH 7,4), por cinco minutos.

No primeiro ensaio o anticorpo primário utilizado foi o policlonal IgY anti – *Phdp* (Laboratório de Ictiopatologia – FCAV/UNESP - BR) na concentração de 1,0 mg/mL, diluído na proporção de 1:1000 e incubado à 4 °C, por 18 horas em câmara úmida. No segundo ensaio o anticorpo primário foi o comercial Goat anti-ChickenIgY- Fc chain (Bethyl Laboratories, Inc. USA) na diluição 1:1000.

Após a incubação o corte foi lavado com solução de Tris HCL (pH 7,4) por cinco minutos e aplicado o substrato Reveal Complement (Spring), com incubação do HRP-link por 10 minutos, seguido da aplicação do anticorpo secundário Goat anti-Chicken IgY- Fc chain (Bethyl Laboratories, Inc. USA) na diluição 1:1000 no primeiro ensaio, no segundo ensaio o anticorpo Rabbitanti-Goat IgG-heavy chain (Bethyl Laboratories, Inc. USA) e incubados com suas devidas amostras por uma hora em TA. Em seguida os cortes foram lavados três vezes com tampão Tris HCL (pH 7,4) por cinco minutos. Para a visualização da reação utilizou-se o cromógeno DAB (Dako) durante um minuto e meio, e a reação foi bloqueada por imersão dos cortes em água deionizada e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris, por um minuto e 30 segundos, seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos e desidratação em concentrações crescentes de álcoois, seguido de xilol e montagem das lâminas com Permount. As imagens digitais foram capturadas usando uma câmera digital (Olympus DP72, com celular Sens. software de imagem v.1.5).

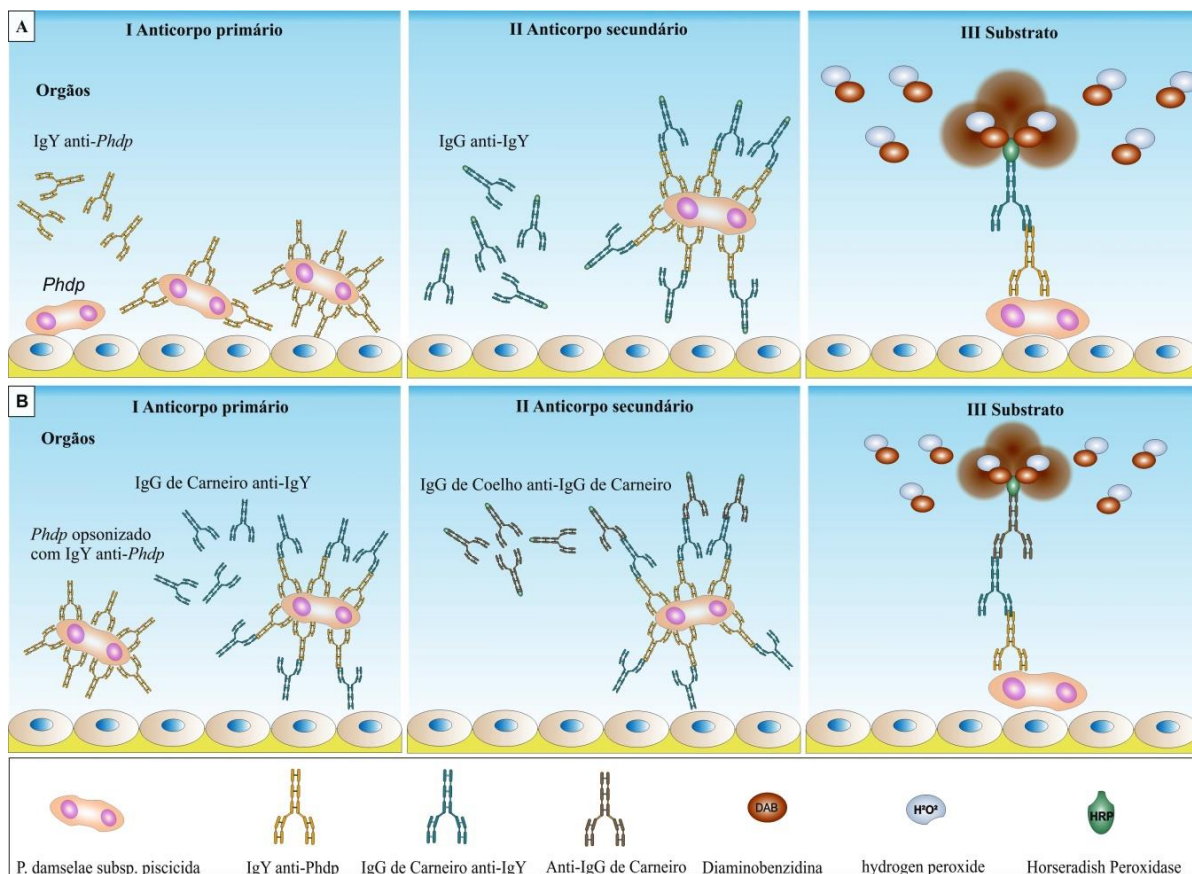


Figura 2. Imagem ilustrativa dos dois métodos de imunohistoquímica (IHC) para a detecção do microrganismo (A) e (B) aplicados para evidenciar a bactéria opsonizada pela IgY nos órgãos de *Rachycentron canadum* (ETO; FERNANDES, 2015d).

4.5. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao nível de significância de 5% (SNEDECOR & COCHRAN, 1974). Para a análise estatística da porcentagem da disseminação bacteriana nos órgãos as médias foram transformadas em $y = \arcsen \sqrt{X/N}$ e expressas e analisadas em porcentagem.

5. RESULTADOS

5.1. Produção e análise do potencial de afinidade da IgY anti-*Phdp*

Houve aumento significativo na produção de IgY específica anti-*Phdp* ($p < 0,05$) no soro das aves no 15º dia após a primeira imunização, quando comparada ao dia zero. Os títulos se mantiveram constantes durante todos os tempos de observação (30, 60 e 90 dias) (Figura 3A). O mesmo ocorreu com a taxa de transferência para a gema que obteve aumento significativo no 15º dia ($p < 0,05$), porém nos demais tempos os títulos foram flutuantes (Figura. 3B). Já Por outro lado o potencial de aidez dos anticorpos presentes nos soro aumentou progressivamente até o 90º dia após a quarta imunização ($p < 0,05$), quando comparado aos demais tempos (Figura. 3C).

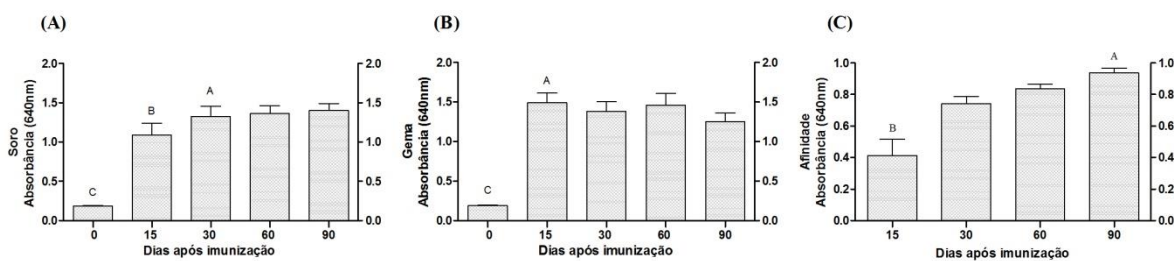


Figura 3. Dinâmica e avaliação da produção dos anticorpos IgY específicos no soro e na gema de galinhas poedeiras imunizadas com proteínas citoplasmáticas e de membrana de *Phdp* (A e B). Produção sistêmica de anticorpos no soro e taxa de transferência para a gema ($n = 7$) em diferentes intervalos de tempo (0-90 dias) após imunização com quatro doses do antígeno nos intervalos de 0, 15, 45 e 75 dias. (C) Potencial de aidez dos anticorpos específicos, produzidos no *pool* de soro ($n = 7$) nos intervalos entre 15, 30, 60 e 90 dias após as imunizações. Médias ($n = 7$) que apresentam letras maiúsculas diferentes se diferem significamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) entre os tempos de observação.

5.2. Análise da especificidade da IgY anti-*Phdp*

Os resultados do *western blot* (Figura 4) para especificidade de IgY revelou a presença de oito proteínas marcadas de massas moleculares de 15, 25, 50, 56, 67, 77, 82 e 143 kDa na fração total; sete de 15, 24, 49, 68, 81, 86 e 102 kDa na fração citoplasmática e quatro 15, 21, 25 e 52 kDa na fração de membrana.

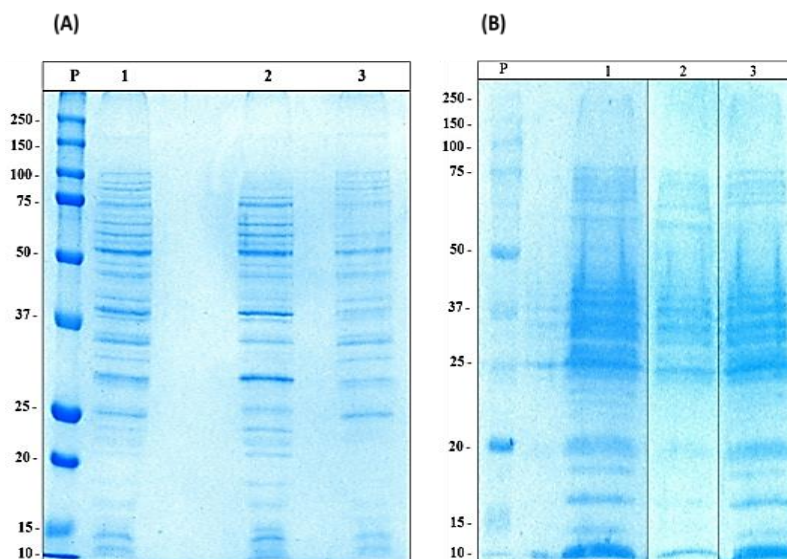


Figura 4. *Western blot* para a determinação da especificidade da IgY para as proteínas celulares microbianas de *Phpd*. (A) Gel de SDS-PAGE (SDS 9%) amostras das frações protéicas, aplicada no volume de 30 μ L por poço na concentração de 7,7 μ g. A distribuição numérica das amostras é similar nas duas 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 1mg/mL diluído na proporção de 1:500.

5.3. Meia vida plasmática e potencial neutralizante da IgY anti-*Phdp* nos órgãos de *Rachycentron canadum*

Antes 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 depois.

O segundo ensaio foi realizado após a infecção para detectar as imunoglobulinas Y, livres e ligados ao antígeno bacteriano nos órgãos e tecidos (Figura 5). Os dois grupos apresentaram títulos de anticorpos no soro em relação ao soro pré-imune (antes da 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 pode ser atribuído à proteólise ocorrida durante o tempo. Quando as imunoglobulinas Y foram determinadas nos diferentes órgãos, o resultado foi positivo, tanto para anticorpos livres como para bactérias opsonizadas que foram imunomarcadas no rim e no baço dos grupos

tratados com IgY. 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.

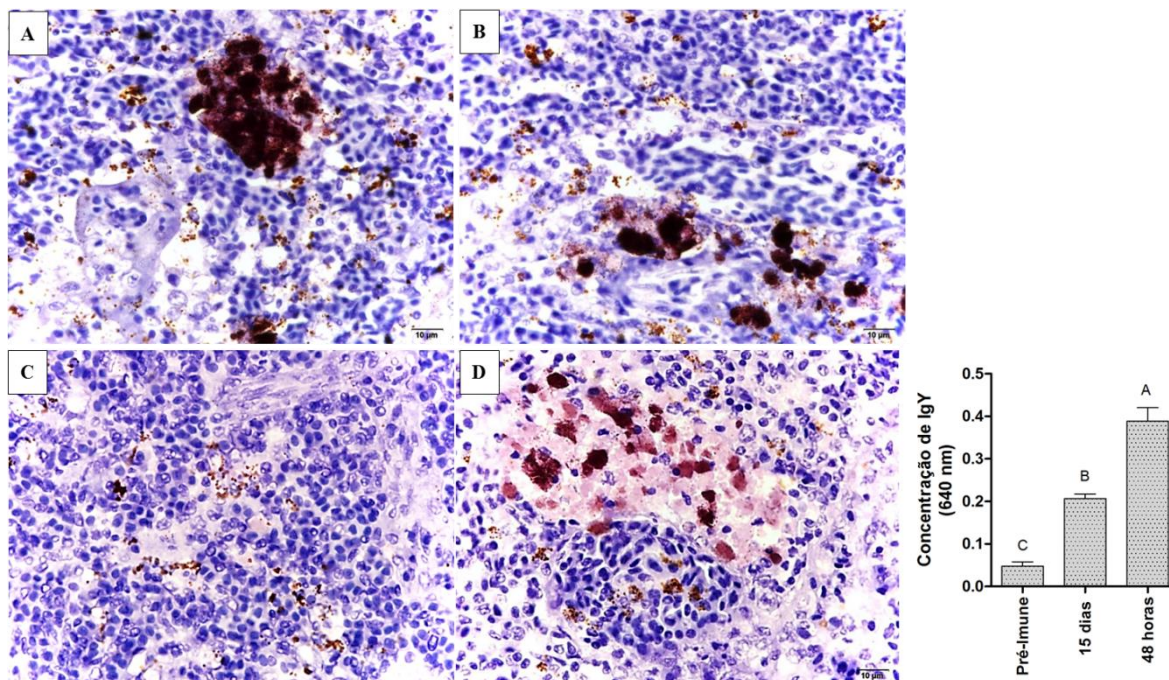


Figura 5. Imunomarcção de anticorpos IgY opsonizados nas células bacterianas de *Phdp* no baço (A – B) e rim caudal (C – D). No gráfico em coluna a concentração da IgY anti-*Phdp* no soro de *Rachycentron canadum* no tempo de 48 horas após a injeção intracelomática de imunoglobulina, grupo IgY (48 horas) e 15 dias após o inóculo bacteriano no grupo IgY (15dias). Médias (n= 7) que apresentam letras maiúsculas diferentes se diferem significativamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Hematoxilina de Harris. Barra: 10 μ m.

5.4. Efeito dos anticorpos IgY anti-*Phdp* sobre o perfil hematológico

O perfil hematológico apresentou alterações discretas na contagem total de hemácias, com diminuição não significativa dos valores no grupo (C+) em relação aos grupos (C-), IgY (15 dias) e IgY (48 horas). O grupo (C+) apresentou aumento significativo ($p<0,05$), na concentração de hemoglobinas e no valor hematimétrico da hemoglobina corpuscular média (HCM) que progrediu para anemia hemolítica aguda (Tabela 2).

Todos os grupos experimentais apresentaram aumento do número de leucócitos totais em relação ao grupo controle negativo (C-), entretanto o grupo

controle positivo (C+) teve aumento significativo ($p < 0,05$) 6 horas após a infecção, se comparado aos grupos IgY (15 dias) e IgY (48 horas) (Tabela 2).

As alterações do leucograma iniciaram-se 6 horas após a inoculação da bactéria com o aumento do número de granulócitos sanguíneos, mais 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 pré determinados de 24 e 48 horas. O número de monócitos e linfócitos foi aumentou gradativamente nos grupos desafiados e as medias do grupo C- se mantiveram dentro dos padrões de normalidade no grupo C-. O número de linfócitos aumentou significativamente no grupo C+ no tempo de 48 horas (Tabela 3).

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 6).

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

Variáveis	Tratamento	Tempo (horas)		
		6 horas	24 horas	48 horas
VG (%)	Controle Negativo	29.7 ± 1.6 A	32.0 ± 1.2 A	33.0 ± 1.6 A
	Controle Positivo	30.0 ± 2.0 A	30.0 ± 1.4 A	31.2 ± 1.9 A
	IgY (15 Dias)	31.8 ± 1.1 A	27.0 ± 1.5 A	31.4 ± 1.8 A
	IgY (48 horas)	31.8 ± 3.4 A	24.8 ± 2.0 A	27.2 ± 1.9 A
VCM (fl)	Controle Negativo	2.1 ± 0.1 A	2.2 ± 0.2 A	2.3 ± 0.2 A
	Controle Positivo	1.7 ± 0.1 A	2.3 ± 0.1 A	3.5 ± 0.1 A
	IgY (15 Dias)	2.3 ± 0.1 A	1.8 ± 0.1 A	3.1 ± 0.4 A
	IgY (48 horas)	2.8 ± 0.3 A	1.7 ± 0.1 A	3.9 ± 0.4 A
HCM (pg)	Controle Negativo	5.7 ± 0.4 A	5.9 ± 0.1 A	6.7 ± 0.8 B
	Controle Positivo	4.7 ± 0.1 A	7.1 ± 0.1 A	12.9 ± 0.8 A
	IgY (15 Dias)	7.1 ± 0.8 A	5.0 ± 0.1 A	10.6 ± 0.9 B
	IgY (48 horas)	7.0 ± 0.6 A	5.5 ± 0.1 A	7.5 ± 1.0 B
CHCM (g/dl)	Controle Negativo	28.2 ± 2,6 A	28.6 ± 0.1 A	28.7 ± 2.4 A
	Controle Positivo	27.6 ± 1.0 A	30.3 ± 0.1 A	36.9 ± 2.6 A
	IgY (15 Dias)	30.4 ± 4.0 A	27.4 ± 0.1 A	32.8 ± 1.5 A
	IgY (48 horas)	32 ± 3.0 A	29.7 ± 0.1 A	26.5 ± 1 A
Hemácias (milhões/mm ³)	Controle Negativo	148 ± 16 A	153 ± 0.1 A	143 ± 13 A
	Controle Positivo	174 ± 6.4 A	128 ± 0.1 A	88 ± 3.9 B
	IgY (15 Dias)	137 ± 7.8 A	143 ± 0.1 A	99 ± 8.7 B
	IgY (48 Horas)	136 ± 4.1 A	101 ± 0.1 A	125 ± 1.6 A
Hemoglobina (g/dl)	Controle Negativo	8.3 ± 0.6 A	9.1 ± 0.1 A	9 ± 0.4 B
	Controle Positivo	8.2 ± 0.4 A	9.0 ± 0.1 A	11 ± 0.4 A
	IgY (15 Dias)	9.6 ± 0.9 A	8.0 ± 0.1 A	10 ± 0.4 B
	IgY (48 horas)	9.8 ± 0.7 A	7.5 ± 0.1 A	9 ± 0.5 B

¹Médias (n= 7) que apresentam letras maiúsculas diferentes 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 erros padrão) e análise de variância do perfil leucocitário de *Rachycentron canadum* submetidos a infecção experimental por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Variáveis (células/mm ³)	Tratamento	Tempo (horas)					
		6 horas		24 horas		48 horas	
Leucócitos Totais	Controle (N)	8.267 ± 1.038	C	9.354 ± 420	B	8.144 ± 627	C
	Controle (P)	18.492 ± 1.016	A	14.092 ± 805	A	9.983 ± 654	B
	IgY (15 Dias)	16.583 ± 1.075	A	11.292 ± 523	A	9.800 ± 768	B
	IgY (48 horas)	14.433 ± 577	B	12.883 ± 993	A	12.550 ± 494	A
Linfócitos absolutos	Controle (N)	7.604 ± 292	B	7.918 ± 305	B	7.080 ± 225	B
	Controle (P)	15.423 ± 617	A	13.924 ± 676	A	15.574 ± 168	A
	IgY (15 Dias)	13.568 ± 771	A	12.607 ± 328	A	12.175 ± 793	A
	IgY (48 Horas)	12.203 ± 521	A	10.776 ± 628	A	10.628 ± 166	A
Granulócitos absolutos	Controle (N)	326 ± 89	B	565 ± 168	C	674 ± 356	B
	Controle (P)	1.592 ± 563	A	1.965 ± 147	A	1.052 ± 535	A
	IgY (15 Dias)	858 ± 364	AB	1.944 ± 606	A	1.417 ± 779	A
	IgY (48 horas)	717 ± 260	AB	969 ± 182	BC	1.424 ± 876	A
Trombócitos absolutos	Controle (N)	295 ± 171	B	346 ± 25	A	432 ± 200	B
	Controle (P)	640 ± 220	A	463 ± 73	A	693 ± 720	A
	IgY (15 Dias)	1.008 ± 107	A	317 ± 35	A	739 ± 267	A
	IgY (48 horas)	217 ± 67	B	357 ± 59	A	790 ± 430	A
Monócitos absolutos	Controle (N)	329 ± 107	B	306 ± 77	B	384 ± 85	B
	Controle (P)	531 ± 230	A	1.877 ± 459	A	1.222 ± 198	A
	IgY (15 Dias)	613 ± 331	A	1.044 ± 490	A	1.250 ± 563	A
	IgY (48 horas)	680 ± 143	A	1.654 ± 410	A	1.173 ± 383	A

Médias (n= 7) que apresentam letras maiúsculas diferentes 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.

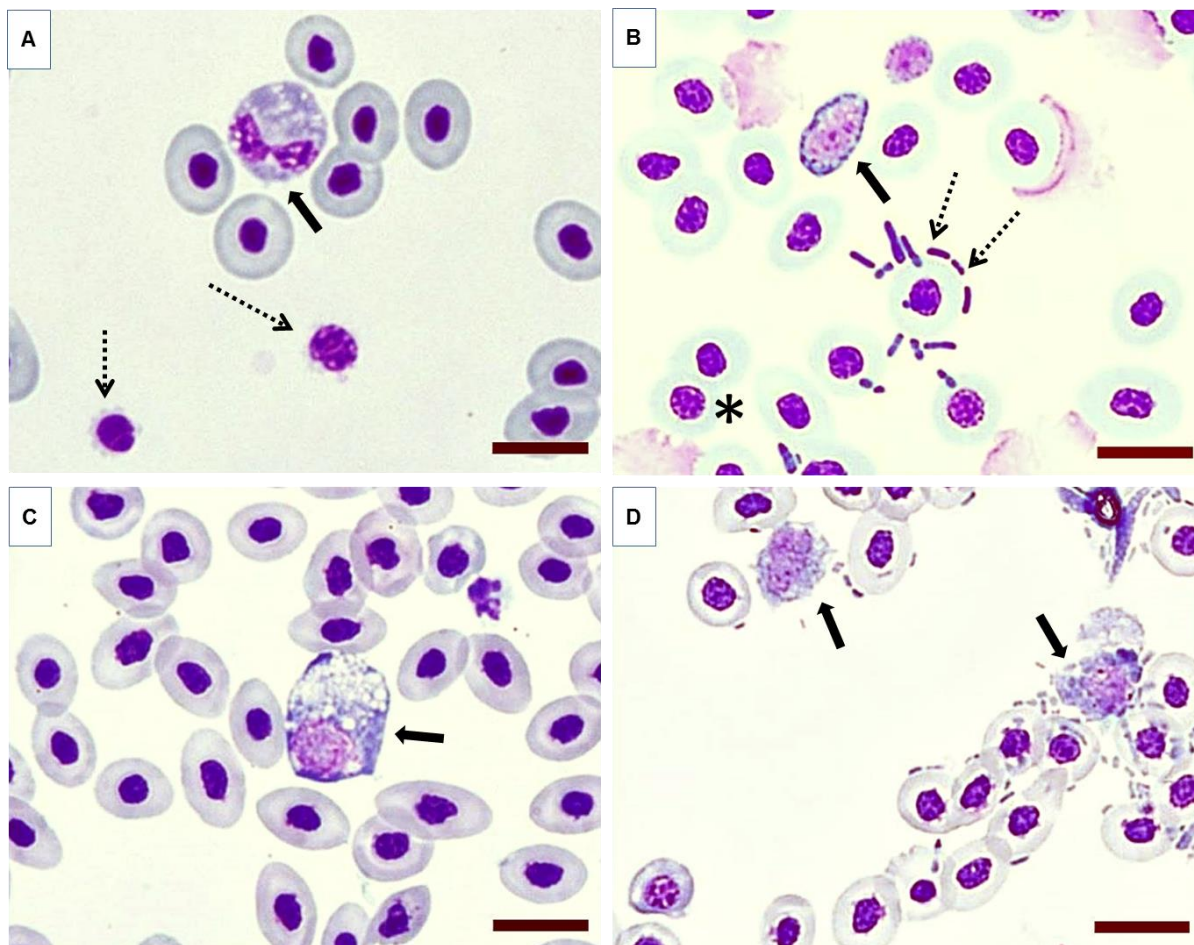


Figura 6. Principais alterações morfológicas nas células sanguíneas de *R. canadum* infectados experimentalmente por *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. (A) Grupo controle positivo (C+), 24 horas após a infecção, presença, de célula polimorfonuclear (seta) e trombócitos (setas pontilhadas). (B) Mesmo grupo e tempo, grupo de hemácias asterisco (*), bastonetes (setas pontilhadas) ao redor de uma hemácia e um linfócito (seta). (C) C+, 48 horas, monócito vacuolizado (seta). (D) Presença de macrófagos ativados (seta) envolvidos por bastonetes. Panótico rápido. Barra: 10 µm.

5.5. Determinação da atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos

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 7).

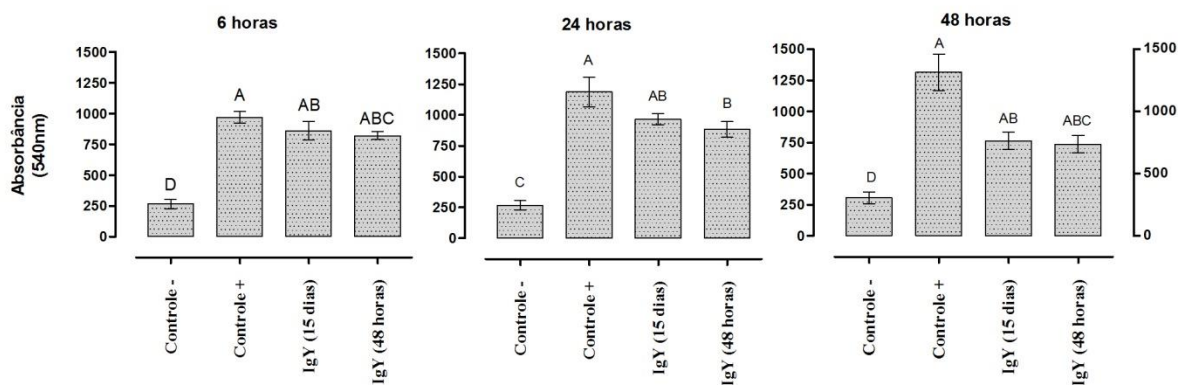


Figura 7. Concentração de EROS de leucócitos sanguíneos de *Rachycentrum canadum*, inoculados com salina grupo Controle (-), desafiados com *Phdp* sem anticorpo terapia Controle (+), inoculados 15 dias antes do desafio com IgY específicas anti-*Phdp* (IgY 15 Dias) e inoculados 48 horas antes do desafio bacteriano, (IgY 48 horas). Médias (n= 8) que apresentam letras maiúsculas diferentes se diferem significativamente entre as médias da coluna pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.6. Exsudato inflamatório: componente celular

Em todos os peixes do grupo controle positivo (C+) 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 aumentou gradativamente no (C+) em relação aos outros grupos (C-), IgY (15 dias) e IgY (48 horas). 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).

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 fagócitos por agrupamentos de monócitos ativados e atóxicos (Figura 8).

Tabela 4. Valores médios¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para contagem total e diferencial de células presentes no exsudato inflamatório de *Rachycentrum canadum* desafiados com *Photobacterium damsela* subespécie *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	A	3.063 ± 333	A
	IgY (15 Dias)	1.652 ± 176	A	1.477 ± 271	C	1.919 ± 101	A
	IgY (48 horas)	2.276 ± 706	A	2.386 ± 395	B	2.411 ± 184	A
Linfócitos absolutos	Controle Positivo	0.00 ± 0.00	Δ	460 ± 211	C	591 ± 105	B
	IgY (15 Dias)	994 ± 940	A	1081 ± 146	B	1186 ± 212	A
	IgY (48 Horas)	737 ± 655	B	1594 ± 273	A	1461 ± 240	A
Granulócitos absolutos	Controle Positivo	0.00 ± 0.00	Δ	452 ± 211	C	1140 ± 333	A
	IgY (15 Dias)	657 ± 164	A	812 ± 286	B	441 ± 691	C
	IgY (48 horas)	366 ± 835	B	1479 ± 587	A	602 ± 197	B
Trombócitos absolutos	Controle Positivo	0.00 ± 0.00	Δ	1275 ± 556	A	1237 ± 501	A
	IgY (15 Dias)	681 ± 161	A	403 ± 794	B	1328 ± 402	A
	IgY (48 horas)	474 ± 159	A	579 ± 137	B	761 ± 158	B
Monócitos absolutos	Controle Positivo	0.00 ± 0.00	Δ	935 ± 430	B	1199 ± 212	A
	IgY (15 Dias)	533 ± 191	A	1769 ± 338	A	1459 ± 141	A
	IgY (48 horas)	561 ± 101	A	1743 ± 337	A	1763 ± 367	A

Médias (n=7) que apresentam letras maiúsculas diferentes 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.

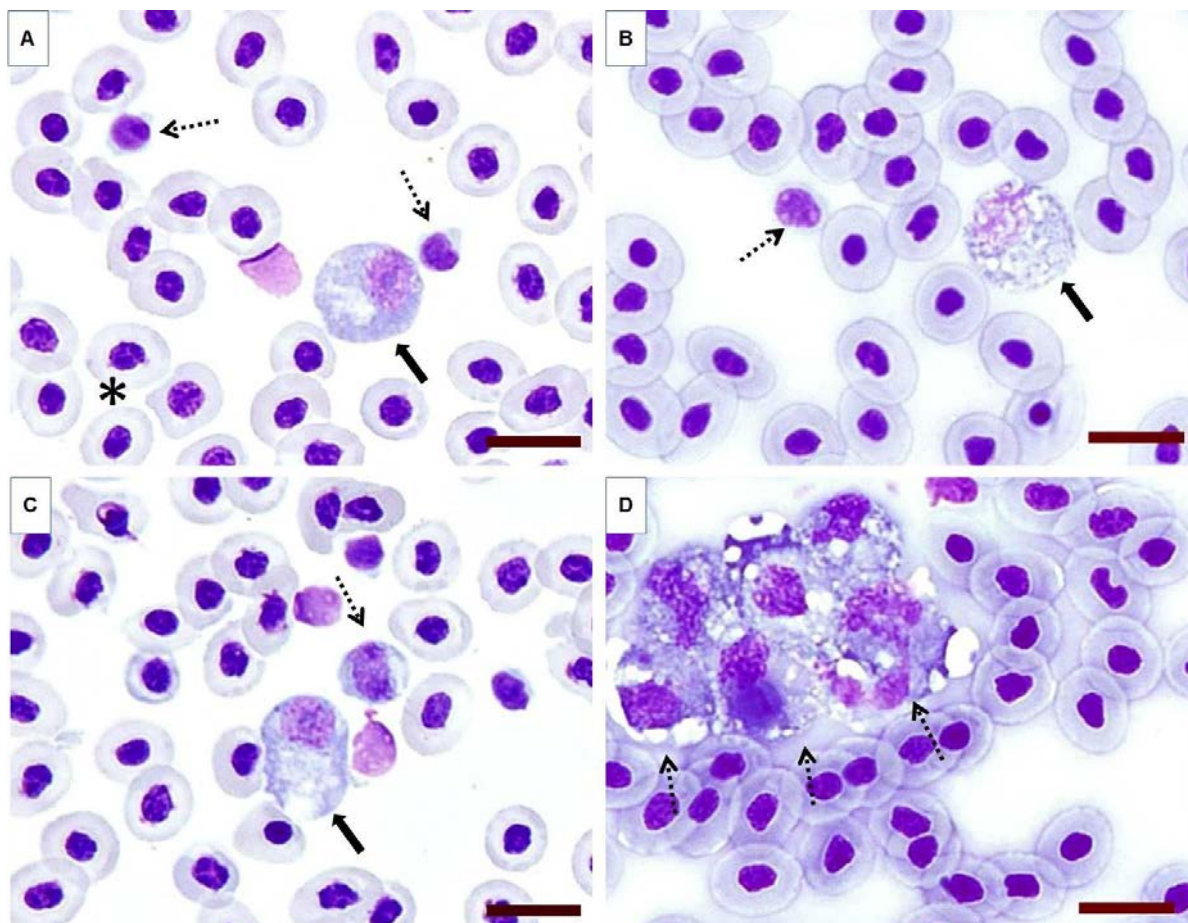


Figura 8. Principais alterações celulares no exsudato inflamatório celomático de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. (A) Exsudado hemorrágico em todas as imagens do grupo C+ no tempo de 6 horas, caracterizado pelo intenso agrupamento de hemácias (*), neutrófilo (seta) e trombócitos (setas pontilhadas). (B) macrófagos normais (seta) e linfócito (seta pontilhada). (C) Macrófago ativado (seta) e (D) Agrupamento de macrófagos atóxicos com inúmeros vacúolos citoplasmáticos (seta pontilhada). Panótico rápido. Barra: 10 µm.

5.7. Dinâmica da disseminação bacteriana nos órgãos de *Rachycentron canadum*

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 9).

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 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 contrapartida 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).

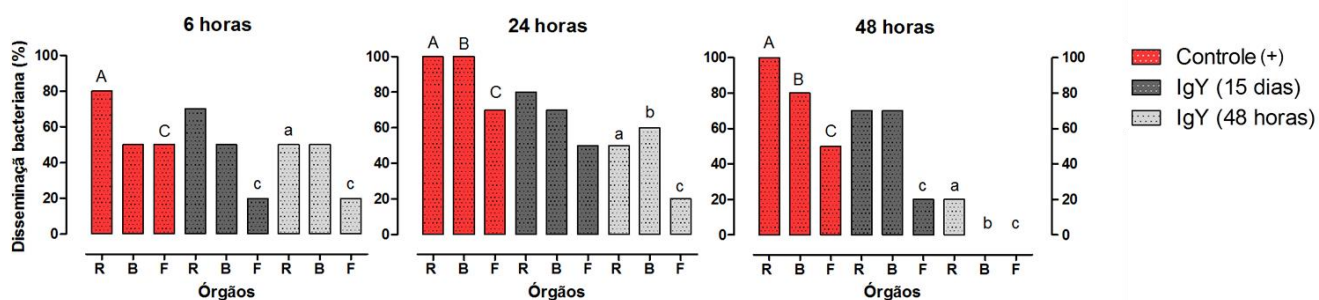


Figura 9. Porcentagem (n= 10) de disseminação bacteriana nos órgãos de *Rachycentron canadum* infectados experimentalmente nos tempos de 6, 24 e 48 horas, desafiados com *Phdp* sem anticorpo terapia. Controle (+), inoculados 15 dias antes do desafio com IgY específicas anti-*Phdp* (IgY 15 Dias) e inoculados 48 horas antes do desafio bacteriano, (IgY 48 horas). Letras maiúsculas comparadas respectivamente com a similar minúscula diferem estatisticamente entre os tratamentos. R=Rim, B=Baço e F=Fígado.

5.8. Alterações anatomopatológicas e bioquímicas

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 (Figura 10). O grau da lesão celular também foi determinado pela dosagem de enzimas citoplasmáticas séricas. 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. Nos demais órgãos a progressão da quantidade de leucócitos e do grau das lesões foi semelhante, mas com diferenças fisiopatológicas e estruturais entre os tecidos. 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 (Figura 11), além da confirmação do agente na localização das colônias no tecido que se correlacionaram com as lesões encontradas no exame histopatológico. 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. 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 mais evidente no grupo IgY (48 horas) que obteve as menores médias em relação aos 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. O grupo C+ obteve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis séricos de ferro no tempo de 6 e 24 horas após infecção, em relação aos demais grupos. Em contra partida o mesmo grupo sofreu redução significativa ($p < 0,05$) em 48 horas em relação aos demais grupos experimentais (Tabela 5).

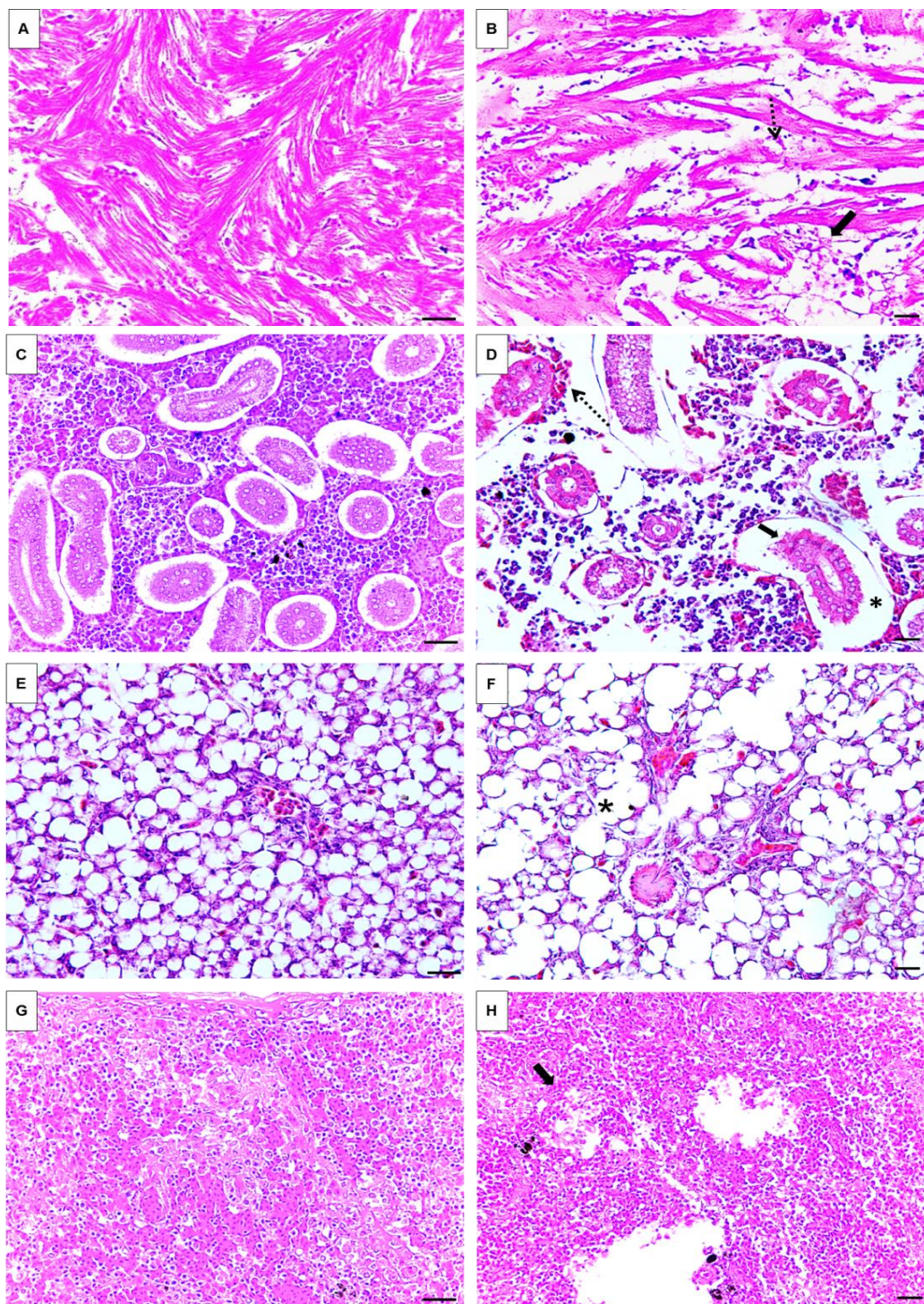


Figura 10. Alterações histopatológicas em órgãos de *Rachycentron canadum* 48 horas após a infecção experimental com *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. (A, C, E, F) tecidos normais. Letras complementares órgãos do grupo C+. (B) Tecido cardíaco (seta pontilhada) dissociação de fibras musculares devido a edema e necrose focal (seta) infiltrado inflamatório no interstício do tecido cardíaco. (D) Tecido renal, (setas) necrose tubular. (F) Fígado (*) áreas de esteatose associada à necrose focal. (H) Baço, área de necrose (seta). H&E. Barra: 10 μ m.

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

Variable	Treatment	Time (hours)					
		6 hours		24 hours		48 hours	
CK (U/L)	Control (N)	132 ± 49	C	128 ± 49	C	130 ± 49	C
	Control (P)	454 ± 15	A	865 ± 45	A	1.402 ± 92	A
	IgY (15 days)	241 ± 63	B	347 ± 24	B	476 ± 71	B
	IgY (48 hours)	124 ± 74	C	198 ± 35	C	210 ± 20	C
TGO (U/L)	Control (N)	7.8 ± 0.4	B	8.5 ± 0.4	C	8 ± 0.4	B
	Control (P)	15 ± 0.6	A	19.8 ± 1	A	15 ± 1.3	A
	IgY (15 days)	9.5 ± 0.6	B	13.5 ± 0.8	B	10 ± 1.1	CD
	IgY (48 hours)	10.5 ± 0.6	B	12.3 ± 1.2	B	6.7 ± 1	DB
TGP (U/L)	Control (N)	4.2 ± 1	A	5.2 ± 0.8	A	4.9 ± 0.8	B
	Control (P)	3.9 ± 0.4	A	4.6 ± 0.9	A	12 ± 1.2	A
	IgY (15 days)	6.5 ± 0.6	A	5.6 ± 1.3	A	6 ± 0.9	C
	IgY (48 hours)	5.5 ± 0.6	A	4.7 ± 1.2	A	3.8 ± 0.4	DB
Glucose (g/dL)	Control (N)	104 ± 1.87	A	101 ± 1.05	A	96 ± 2.03	A
	Control (P)	100 ± 1.35	A	34.8 ± 3.35	B	25 ± 2.70	B
	IgY (15 days)	99 ± 1.14	A	33.0 ± 4.06	B	26 ± 2.93	B
	IgY (48 hours)	106 ± 2.44	A	34.8 ± 4.54	B	24 ± 2.69	B
Ferro (µg/dL)	Control (N)	32 ± 1.7	B	28 ± 1.6	B	22 ± 1.6	A
	Control (P)	59 ± 3.9	A	90.0 ± 4.8	A	13 ± 1.8	C
	IgY (15 days)	33 ± 2.3	B	42.0 ± 3.2	B	16 ± 4.0	B
	IgY (48 hours)	28 ± 2.7	B	36.0 ± 3.8	B	27 ± 2.0	A

Médias (n=7) que apresentam letras maiúsculas diferentes 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).

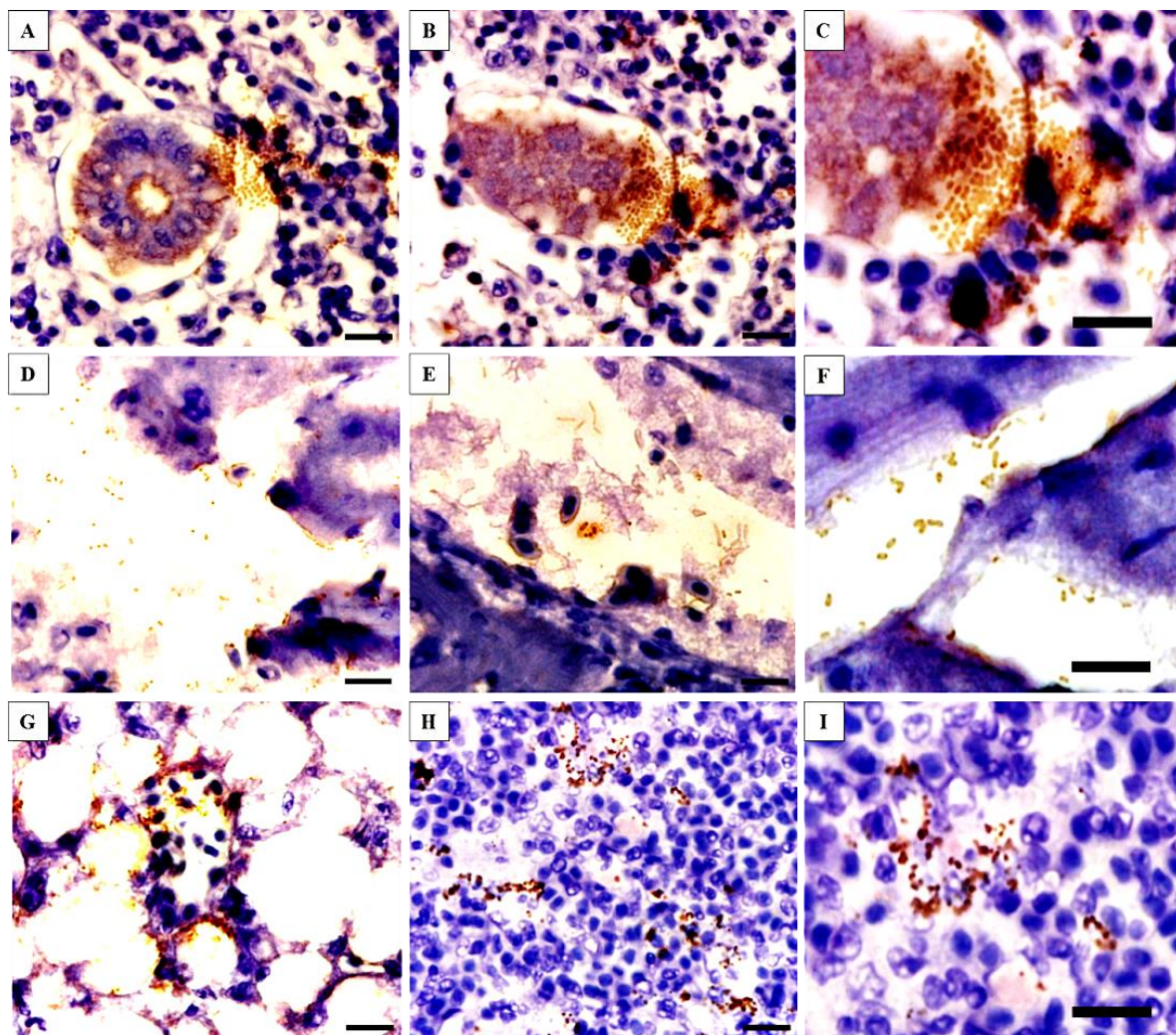


Figura 11. Imunomarcaco positiva para *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* em órgãos de *Rachycentron canadum* 48 horas após a infecção experimental. (A, B, C) rim; (D, E, F) coraco; (G) fígado; (H, I) baço. Hematoxilina de Harris.

6. DISCUSSÃO

A infecção do hospedeiro por *Phdp* depende de fatores de virulência como o conjunto formado por moléculas de adesão, LPS, hemolisinas e outras proteases que desencadeiam o processo infeccioso (BAKOPOULOS et al., 2004); a cápsula de polissacarídeo que bloqueia a ação lítica do soro e das espécies reativas do oxigênio (EROs), impedindo o processo fagocítico ou permitindo a sobrevivência intracelular da bactéria com multiplicação e progressão para a cronicidade da doença (SILVA et al., 2013); e da ativação do mecanismo de apoptose de fagócitos por meio da expressão e liberação de uma exotoxina indutora de apoptose (AIP56) (COSTA et al., 2011). Portanto, nos peixes que foram submetidos à terapia e profilaxia com IgY anti-*Phdp* parece ter sido neutralizado e bloqueado a infecção. A farmacodinâmica da IgY está ilustrada na Figura 12.

Os resultados obtidos mostram que o sistema imune das aves vacinadas foi capaz de reconhecer e produzir IgY específicas para diversos epítopos antigênicos, presentes nas frações protéicas solúvel e insolúvel do extrato bacteriano de *Phdp*. Além disso, o potencial de avidéz e afinidade da imunoglobulina pelo antígeno, aumentou progressivamente durante as inoculações subsequentes e alcançou o potencial máximo no 90º dia após a última inoculação. Andrade et al. (2013), observaram aumento de avidéz da IgY antiveneno de *Crotalus* e *Bothrophos*, 367 dias após a última inoculação. Embora o protocolo executado pelos referidos autores tenha sido mais extenso que o do presente estudo, o padrão progressivo da curva de avidéz foi semelhante. Neste estudo a especificidade de IgY anti-*Phdp* foi avaliada e mostrou-se imunoreativa para as proteínas da fração solúvel e insolúvel detectadas por *western blot*. Apesar do inóculo conter ambas as frações o sistema imune das aves foi capaz de reconhecer epítopos antigênicos distintos entre as duas frações.

As diferenças na massa molecular entre as proteínas imunomarcadas, encontradas neste estudo e descritas por alguns autores é justificável, uma vez que foram obtidas e purificadas de compartimentos celulares distintos, podendo apresentar diferenças estruturais na isoforma molecular (ESTEVE; BIRBECK, 2004). No presente estudo estas proteínas citoplasmáticas foram purificadas

em estágio vesicular isto é, dentro do citoplasma e não em sua forma secretada no meio de cultura.

Inicialmente o *Phdp*, como qualquer outro microrganismo, depende de nutrientes para a expressão de fatores de virulência. Entre tais nutrientes o ferro (Fe) está entre os mais importantes e é captado pela célula bacteriana por meio de receptores de membrana denominados sideróforos, expressos *in vivo* ou *in vitro* em meio suplementado com glicose (REIS et al., 2010). A maior fonte de Fe dos organismos superiores são as hemoglobinas presentes nas hemácias. Então é possível sugerir que a hemólise observada no início da infecção esteja correlacionada com a nutrição bacteriana pela captação de glicose para a expressão do antígeno capsular e do sideróforo para a captação do Fe liberado.

Hsu et al., (2014) descreveram uma exotoxina de massa molecular de 43 kDa, isolada e purificada de produtos extracelulares (PECs) de *Phdp*, com ação hemolítica identificada como uma fosfolipase A2 por análise proteômica. Porém, outras exotoxinas com efeitos citolíticos e massa molecular entre 175, 132, 79 e 48,3 kDa, foram descritas em PECs de *Phdp* por Bakopoulos et al. (2004). A IgY produzida neste estudo foi específica para proteínas citoplasmáticas com massa molecular semelhante à descrita pelos dois autores em ensaio de *western blot* fato que justifica o bloqueio dos fatores hemolíticos no exsudato celomático e na corrente sanguínea na fase aguda da infecção. Entretanto não é possível afirmar que IgY apesar de bloquear a hemólise tenha algum efeito neutralizador sobre os receptores sideróforos ou sua expressão, já que a redução de Fe foi progressiva durante todo o período da infecção em todos os grupos desafiados.

A especificidade de IgY para LPS e para outras proteínas de membrana interna e externa do *Phdp*, foi observada na imunorreatividade dos anticorpos para bandas protéicas entre 30, 42 e 53 kDa, presente na fração insolúvel, identificadas como constituintes do LPS por Labella et al. (2010). O uso de IgY específica para LPS de *E. coli* inibiu o crescimento bacteriano *in vitro* e *in vivo*, neutralizou o efeito do LPS por meio de opsonização e bloqueou a ligação da molécula ao receptor de afinidade CD14 presente nos fagócitos, juntamente com a ativação do receptor e a transcrição e produção de citocinas pró-inflamatórias (CRONER et al., 2009). Zhen et al. (2011), elucidaram os

efeitos indiretos da IgY anti-LPS na cinética da produção das citocinas inflamatórias, pois demonstraram a regulação decrescente da produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e crescente de interleucina-10 (IL-10), tanto no uso profilático como terapêutico na sepse experimental em camundongos induzida por LPS. Assim é possível que a redução da intensidade da lesão hepática e alveolar no trato respiratório, somado ao aumento de 70% na porcentagem de sobrevivência dos animais imunizados em relação ao grupo não imunizado, tenha sofrido interferência indireta pela modulação exercida pelo TNF e IL-10.

Os efeitos clínicos da terapia e profilaxia com IgY anti-*Phdp* em *Rachycentron canadum* neste trabalho foram semelhantes aos descritos em mamíferos. A neutralização da célula bacteriana através das IgY anti-*Phdp* potencializou a fagocitose e a eliminação do patógeno, que minimizou a infecção aguda, e reduziu a migração de trombócitos e granulócitos para a cavidade celomática no início da infecção (6 horas). Outro efeito indireto da neutralização pode ser a redução progressiva da produção de EROs durante os intervalos entre 6 e 48 horas. Os resultados deste estudo sugerem que a redução de EROs esteja associada a ação indireta que neutralizou o efeito protetor da cápsula de LPS e facilitou a fagocitose.

Outro fator que pode ter colaborado para a redução da produção de EROs é o fato de que a fração constante (Fc) da IgY das aves, devido a distância filogenética entre as espécies, não interage com a molécula C1q ou com o receptor Fc (FcR) presentes nos fagócitos de peixes, pois descreveu-se que a ativação sinérgica dos receptores Fc do subtipo (Fc γ RIII) e do complemento 3 (CR3) por suas respectivas moléculas ligantes, aumenta a produção de EROs em neutrófilos humanos (URBACZEK et al., 2014). Os resultados sugerem que soroterapia com a IgY reduziu a produção de EROs de forma direta, através da neutralização e indireta pela não ativação de receptores FcR e CR3 de fagócitos de peixes. Estes fenômenos de alguma forma eliminaram o patógeno e reduziram o gasto bioenergético dos fagócitos. Apesar da produção de EROs ser essencial para o efeito microbicida após a fagocitose, sua produção excessiva é deletéria para os tecidos do organismo (BRIEGER et al., 2012).

A infecção por *Phdp* pode ser crônica, portanto a morte do hospedeiro por choque séptico não é priorizada pelo microrganismo. Porém, a bactéria visa sua manutenção na fase intracelular em fagócitos do hospedeiro para viabilizar sua sobrevivência e migração para os órgãos de tropismo. Por consequência ocorre a hipersensibilidade tipo IV com formação de granulomas. A inoculação intraperitoneal de *Phdp* ativas em *Dicentrarchus labrax* resulta na produção da exotoxina AIP56 e ativação da apoptose em neutrófilos e macrófagos residentes no exsudato peritoneal e no rim cefálico, 24 horas após o desafio (NASCIMENTO et al., 2007). A AIP56 é adsorvida para o citosol por meio de receptores clatrina de endocitose nas células alvos, ficando no interior de vesículas até a posterior liberação e ativação citoplasmática (PEREIRA et al., 2014). Após a adsorção a AIP56 ativa a morte celular pela atividade catalítica desta metaloprotease que cliva o NF- κ B, ativando a cascata celular para a apoptose (SILVA et al., 2013). Neste estudo os efeitos apoptóticos em células fagocitárias foram observados apenas no grupo C+, e sugere que a especificidade da IgY anti-*Phdp* por uma proteína de massa molecular de 56 kDa presentes na fração solúvel, conferiu o bloqueio de apoptose celular ativado pela exotoxina AIP56 acima descrita.

A inoculação de células vivas de *Phdp* em *Rachycentron canadum* obteve o mesmo efeito deletério no sistema orgânico dos peixes. A necrose foi observada em todos os tempos e grupos estudados, porém em intensidade reduzida nos grupos pré-tratados com IgY anti-*Phdp*. A redução das enzimas TGO, TGP e CK comprova que a proteção dos tecidos de fato ocorreu e se reafirma por meio do bloqueio da disseminação bacteriana para o rim, fígado e baço, observado no grupo IgY (15 dias) e mais efetivo no grupo IgY (48 horas), que obteve taxa zero de reisolamento a partir do fígado e do rim no tempo pré determinado de 48 horas após a infecção. A proteção dos tecidos foi evidenciada quando o ensaio de IHC revelou células bacterianas ligadas a IgY anti-*Phdp*, que foram imunomarcadas no baço e rim caudal. Este fato sugere que após a neutralização, as células bacterianas foram carregadas via circulação sistêmica, para estes dois órgãos para serem eliminadas posteriormente. O crescimento bacteriano negativo no reisolado dos mesmos órgãos, sugere que a neutralização *in vivo* impediu o crescimento microbiano. Por tanto este efeito, resultou na sua neutralização e no bloqueio na evolução

para a cronicidade da doença. Estes dados reafirmam a hipótese de que o mecanismo de ação da IgY na proteção sistêmica foi multifatorial agregado a capacidade policlonal dos anticorpos em reconhecer e bloquear os diversos fatores de virulência utilizados pelo *Phdp*. Porém a ação protetora foi mais intensa no grupo IgY (48 horas), sugerindo também, que a dose resposta esta intimamente correlacionada ao potencial de proteção conferida aos anticorpos. Quando a meia vida plasmática foi avaliada a redução progressiva na concentração da IgY no soro dos peixes do grupo IgY (15 dias) em relação ao grupo IgY (48 horas) confirmam esta hipótese.

Arasteh et al. (2004) testaram o potencial profilático da soroterapia com a IgY específica para antígenos de *Vibrio anguillarum* em *Oncorhynchus mykiss* aplicada via celomática, na dose de 100 μ L na concentração de 1,33 mg.ml⁻¹, 14 dias antes do desafio. Em seus resultados a dose testada reduziu a taxa de mortalidade em aproximadamente 70% no grupo imunizado em relação ao não imunizado, demonstrando a proteção conferida pela imunoglobulina Y.

Quando as concentrações de 1 a 10 mg/ml⁻¹ de IgY específica para *Staphylococcus aureus* isoladas de tetos de vacas portadoras de mastite foram testadas *in vitro*, a dose mínima obteve o mesmo efeito daquele observado para a dose máxima com inibição do crescimento bacteriano. Efeito semelhante foi observado quanto ao potencial de fagocitose de macrófagos isolados do leite que apresentaram aumento de 30% em relação as células do grupo controle (ZHEN, et al., 2008). A IgY foi eficaz na terapia de outras bacterioses causadas por *Streptococcus mutans* (HATTA et al., 1993), *Salmonella* (YOKOYAMA et al., 1998), *Yersinia* (LEE et al., 2000) *Staphylococcus* (LECLAIRE et al., 2002) *Helicobacter pylori* (SHIN et al., 2002).

As IgY anti-*Phdp* produzidas apresentaram o mesmo efeito clínico, inibiram o crescimento bacteriano, e atuaram diretamente no bloqueio das endo e exotoxinas. Neutralizando a adesão, migração e a disseminação do microrganismo para a circulação sanguínea e para os órgãos de tropismo, impedindo a evolução para o estágio crônico da doença. Estes dados reafirmam a hipótese sugerida, de que o mecanismo de ação da IgY na proteção sistêmica foi multifatorial agregado a capacidade policlonal dos anticorpos em reconhecer e bloquear os fatores de virulência do *Phdp*.

A eficácia da IgY no tratamento de infecções microbianas é relativamente clara na literatura científica e apresenta inúmeras vantagens ao uso de antibióticos (AB) e anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) no tratamento clínico da sepse causado por Gram negativas. Apesar de serem fármacos importantes para o controle da sepse, com ação bacteriostática e bactericida direta sobre o microrganismo no caso dos AB e o efeito dos AINEs, na inibição da atividade da enzima cicloxigenase ambas não apresentam efeito farmacológico sobre as moléculas de LPS liberadas na sepse/endotoxemia na circulação sanguínea. Em contra partida a IgY anti-LPS teve efeito sobre a bactéria e seus subprodutos e na modulação do processo inflamatório por meio da regulação decrescente da concentração de citocina anti-inflamatória IL-10, evidenciada por Zhen et al. (2008).

A oxitetraciclina é um dos AB usados para o tratamento de bacterioses em peixes marinhos. Entretanto dois genes de resistência foram encontrados *tet* (M) e *tet* (S) em 151 isolados bacterianos intestinais de peixes marinhos criados no Japão e na Coreia. Entre os isolados foram encontrados *Vibrio* sp., *Lactococcus garvieae*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e outras Gram-negativas não identificadas (KIM et al., 2004). Portanto o uso de antibióticos na água apresenta risco para desenvolver resistência microbiana, acarretar contaminação ambiental e para a saúde pública. Este problema se estende para o cenário econômico mundial, já que o resíduo de antibiótico presente na carcaça é negativo para exportação do pescado.

A IgY apresenta baixo custo de produção e pode ser produzida em escala industrial, sem necessidade de sacrificar as aves pois é extraída da gema dos ovos de poedeiras imunizadas. Um ovo possui em média 100 mg de IgY na gema e galinhas poedeiras produzem mais de 20 ovos por mês, a produção de IgY em 30 dias pode facilmente chegar a valores maiores de dois gramas por ave.

Portanto, a IgY é uma ferramenta biotecnológica promissora na profilaxia e terapêutica de enfermidades bacterianas de organismos aquáticos em substituição aos antibióticos e seus efeitos negativos. Além disso, a tecnologia fomenta duas cadeias produtivas, aves e peixes, agregando valores na produção de ovos e possibilitando a criação de organismos aquáticos livres

de resíduos de antibióticos, com certificação positiva na produção pesqueira e ampliação do potencial de exportação de pescado.

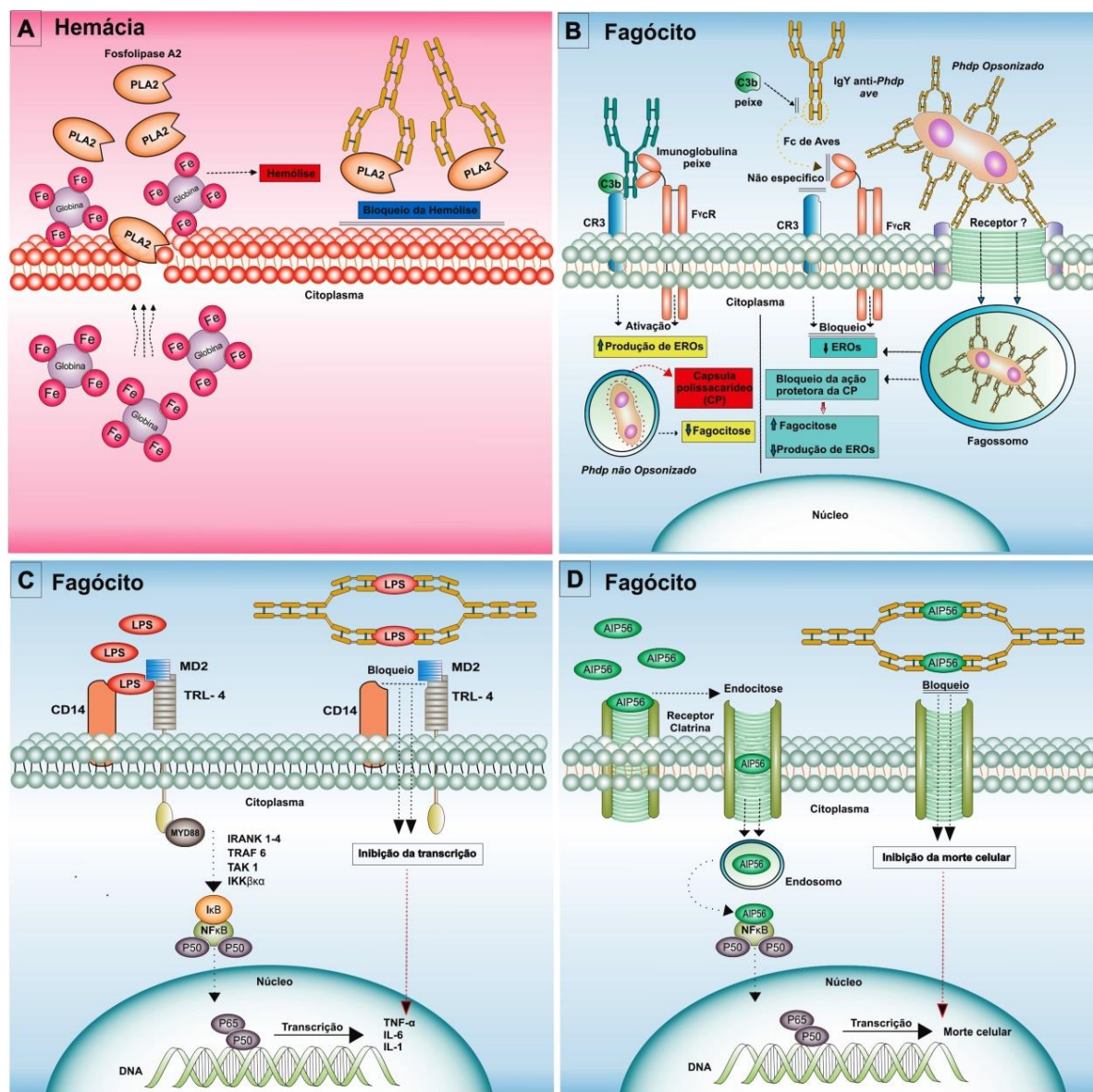


Figura 12. Mecanismo de ação proposto da IgY *anti-Phdp* no bloqueio dos fatores de virulência do *Phdp* (ETO; FERNANDES, 2015a). (A) Neutralização das fosfolipases (PLA2) representada na figura e de outras proteases e metaloproteases não representada na figura, resultando na redução do quadro hemolítico. (B) Efeito da neutralização no aumento do potencial fagocítico e na redução indireta da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). A ativação dos receptores (FcR) e complemento 3 (CR3) através de suas moléculas ligantes, induz a produção de EROs, em sinergismo com o processo fagocítico, porém a capsula de polissacarídeo (CP) bloqueia a ação das EROs, gerando um saldo negativo, de maneira que a produção aumentada destes reativos, não aumenta a eliminação do patógeno. Em contra partida, a Fc

da IgY devido a distancia filogenética entre as espécies não ativa os receptores (FcR) e complemento 3 (CR3) das células fagocíticas dos teleósteos, reduzindo a produção dos EROs por esta via. O receptor que reconhece a IgY e suas frações não foram elucidados, portanto a opsonização e posterior fagocitose do patógeno neutralizou o efeito protetor da CP, aumentando o potencial fagocítico, reduzindo a demanda e produção de EROs pelos fagócitos. (C) Efeito indireto das IgY na redução das citocinas pró-inflamatórias através da neutralização dos lipopolissacarídeos (LPS) inibindo a ativação dos receptores Toll like-4 (TRL-4) e CD14 na transcrição de genes de citocinas. A inibição do TRL-4, afeta sua interação com a proteína de diferenciação mielóide (MyD88) e, conseqüentemente a cascata de receptores de quinase associada (IRANK), fator de necrose tumoral 6 associado ao receptor (TRAF6) e fator nuclear *kappa* B (NFκB) bloqueando assim a transcrição dos genes de citocinas. (D) Bloqueio da exotoxina de 56 kDa indutora de apoptose (AIP56). A ação da exotoxina é iniciada através da endocitose por receptores clatrina, como sugerido por (PEREIRA et al., 2014), após a AIP56 é liberada no citoplasma, em seguida catalisa o NFκB que ativa a transcrição da cascata de apoptose celular nos fagócitos. O bloqueio extracelular da exotoxina pelas IgY específicas impediu a catalisação do NFκB e conseqüente a apoptose celular.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir, que a imunoglobulina Y produzida, foi eficaz na profilaxia e terapêutica de *Rachycentron canadus* infectados experimentalmente com células bacterianas de *Phdp*. Resultando na redução da hemólise aguda, e no acúmulo de células inflamatórias, e na produção de EROs no período inicial da inflamação aguda induzida. E proteção orgânica reduzindo a disseminação bacteriana, e as lesões em fígado, rim, baço e coração. E por fim, a soma dos efeitos farmacodinâmicos da IgY boquearam a evolução da doença aguda para a crônica. Possibilitando a aplicação desta molécula para o tratamento de enfermidades em organismos aquáticos.

8. REFERÊNCIAS

ACOSTA, F.; VIVAS, J.; PADILLA, D.; VEJA, J.; BRAVO, J.; GRASSO, V.; REAL, F. Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 6, p. 535-543, 2009.

ALMEIDA, C. M. C.; SILVA, C. L.; COUTO, H. P.; ESCOCARD, R. C.; ROCHA, D. G.; SENTINELLI, L. P.; KIPNIS, T. L.; SILVA, W. D. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, 52, p. 293-301, 2008.

ANDRADE, F. G.; CHEIRUBIM, A. P.; ETO, S. F.; MARIOTO, D. T. G.; FERRARO, A. C. N. S.; VIDOTTO, M. C.; ONO, M. A.; VENÂNCIO, E. J. Efeito supressor do veneno botrópico na resposta imune humoral em galinhas poedeiras. In: **8º Congresso Londrinense de Biologia Aplicada à Saúde**, 2009.

ANDRADE, F. G.; ETO, S. F.; NAVARRO, A. C. N. S.; MARIOTO, D. T. G.; VIEIRA, N. J.; CHEIRUBIM, A. P.; RAMOS, S. P.; VENÂNCIO, E. J. The production and characterization of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. **Toxicon**, v. 66, p. 18-24, 2013.

ARASTEH, N.; AMINIRISSEHEI, A. H.; YOUSIF, A. N.; ALBRIGHT, L. J.; DURANCE, T. D. Passive immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). **Aquaculture**, v. 231, p. 23-36, 2004.

ARIJO, S.; RICO, R.; CHABRILLON, M.; DIAZ-ROSALES, P.; MARTÍNEZ-MANZANARES.; BALEBONA, M. C.; MAGARIÑOS, B.; TORANZO, M.; MORIÑIGO, M. A. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harvei* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Journal of Fish Disease**, v. 28, p. 33-38, 2005.

BAE, H. D.; KITAGUCHI, K.; HORIO, F.; MURAI, A. Higher incorporation of heterologous chicken immunoglobulin Y compared with homologous quail immunoglobulin Y into egg yolks of Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Poultry Science**, v. 88, p. 1703-1711, 2009.

BAERWALD, M. R.; PETERSEN, J. L.; HEDRICK, R. P.; SCHISLER, G. J.; MAY, B. A major effect quantitative trait locus for whirling disease resistance identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Heredity**, v. 106, n. 6, p. 920-926, 2011.

BAKOPOULOS, V.; HANIF, A.; POULOS, K.; GALEOTTI, M.; ADAMS, A.; DIMITRIADIS, G. J. The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, p. 1-13, 2004.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2010. p. 608.

BENETTI, D. D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J. A.; WELCH, A. W.; MAXEY, C.; ORHUN, M. R. Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. **Aquaculture**, v. 302, p. 3-4, 2010.

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura**. Brasília: MPA, 2014.

BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER JR, F. J.; KRAUSE, K. H. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, 2012.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody**. In vitro and in vivo. Uppsala: Tryck & Medier, 2002.

CASTILHO, C. S.; JANG, H. B.; HIKIMA, J.; JUNG, T. S.; MORII, H.; HIRONO, I.; KONDO, H.; KUROSAKA, C.; AOKI, T. Comparative analysis and distribution of pP9014, a novel drug resistance IncP-1 plasmid from *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 1, p. 10-8, 2013.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p. 64-69, 2009.

CHACANA, P. A.; TERZOLO, H. R.; GUTIÉRREZ, C. E.; SCHADE, R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v. 85, p. 179-189, 2004.

CHALGHOUMI, R.; BECKERS, Y.; PORTETELLE, D.; THÉWIS, A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**. v. 13, p. 295-308, 2009.

CHART, H. Bacterial fractionation and membrane protein characterization. Pages 1-10 In: CHART, H., (Ed.). **Methods in Practical Laboratory Bacteriology**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 1-10.

CHEN, L.; YANG, J.; YU, J.; YAO, Z.; SUN, L.; SHEN, Y.; JIN, Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 33, 2005.

COSTA, B.; RÉGO, P. C. N. P.; SIMÕES, I.; MARQUES, J.P.; CASTRO-CUNHA, M.; AFONSO, A. Cellular and humoral immune responses of *Senegalese sole*, *Solea senegalensis* (Kaup), following challenge with two *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* strains from different geographical origins. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p. 543-553, 2013.

COSTA-RAMOS, C.; VALE, A. D.; LUDOVICO, P.; SANTOS, N. M.; SILVA, M. T. The bacterial exotoxin AIP56 induces fish macrophage and neutrophil apoptosis using mechanisms of the extrinsic and intrinsic pathways. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, p. 173-181, 2011.

CRONER, R. S.; HOHENBERGER, W.; JESCHKE, M. G. Hepatic gene expression during endotoxemia. **Journal of surgical research**, v. 154, p. 126-134, 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. **Nature Immunology**, v. 6, p. 295-302, 2005.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, n. 83, p. 580-590, 2008.

ESTEVE, C.; BIRBECK T. H. Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (Elastase). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 994-1001, 2004.

ETO, S. F.; ANDRADE, F. G.; PINHEIRO, J. W.; BAILARIM, M. S.; RAMOS, S. P.; VENACIO, E. J. Effect of Inoculation Route on the Production of Antibodies and Histological Characteristics of the Spleen in Laying Hens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, p. 63-66, 2012.

ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; FERNANDES, D. C.; MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R. Biologia do Sistema Imune dos Teleósteos. **Revista Científica da Faculdade Dom Bosco de Cornélio Procópio**, v. 1, p. 2-21, 2014.

ETO, S. F.; ETO, A. K; MORAES, F. R.; MORAIS, J. R. E.; PIZAURO JUNIOR, J. M.; FERNANDES, D. C.; CLAUDIANO, G. S.; GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SALVADOR, R.; ETO, A.; BALBUENA, T. S. **Rações Nutracêuticas e seus usos**. Patente: Privilégio de Inovação. Registro: BR1020150141548, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil, 2015a.

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; MORAES, J. R. E.; PIZAURO JUNIOR, J. M.; MORAES, F. R. Histologia dos órgãos e tecidos linfóides de galinhas poedeiras White Leghorn. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 110, p. 74-78, 2015b.

ETO, S.F; FERNANDES, D. C. **Proposto mecanismo de ação da IgY anti-*Photobacterium damsela* subsp. piscicida (Phdp) no bloqueio dos fatores de virulência do Phdp**. Patente: Desenho Industrial. Número do registro: 3280215, Instituição de registro HoodID Registros Online Ltda. Brasil, 2015c.

ETO, S.F; FERNANDES, D. C. **Método de imunohistoquímica (IHC) para a detecção do microrganismo (A) e (B) aplicados para evidenciar a bactéria *Photobacterium damsela* subsp. piscicida opsonizada pela IgY nos órgãos de *Rachycentron canadum***. Patente: Desenho Industrial. Número do registro: 1379914, Instituição de registro HoodID Registros Online Ltda. Brasil, 2015c.

FAO, 2012. Fishery and Aquaculture Statistics. Aquaculture production. Disponível em:
ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD_yearbook_2012/navigation/index_content_aquaculture_e.htm#C. Acesso em: 23 de jul. 2014.

FAULKNER, O. B.; ESTEVEZ, C.; YU, Q.; SUAREZ, D. L. Passive antibody transfer in chickens to model maternal antibody after avian influenza vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, p. 341-347, 2013.

FELLAH, J. S.; JAFFREDO, T.; DUNON, D. Development of avian immune system. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunology**. 2008. cap. 4, p. 5-67.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; LOUREIRO, LOUREIRO, B. A. Biologia do Sistema Imune de Aves: Revisão. **Ensaio e Ciência** (Campo Grande. Impresso), v. 17, p. 131, 2013.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; VIEIRA, F.; SHIMADA, M. T.; SILVA, T. F.; SOUZA, E. C.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E. ; MORAES, F. R. Humoral immune response in *Oreochromis niloticus*: modified direct agglutination test. **Comparative Clinical Pathology**, v. 24, p. 617-623, 2014.

FREITAS-NETO, A. G.; RODRIGUES, C. J; TOLOSA, E. M. C.; BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole. 2003. p. 239.

FURNES, C.; SEPPOLA, M.; ROBERTSEN, B. Molecular characterisation and expression analysis of interferon gamma in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26 p. 285-292, 2009.

GRIMHOLT, U. I.; HORDVIK, V. M.; FOSSE, I.; OLSAKER, C. E., LIE, Y. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Immunogenetics**, v. 37, p. 469-473, 1993.

GRINDSTAFF, J. L.; BRODIE III, E. D.; ELLEN, D. K. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. **Proceedings Biological Sciences**, n. 298, p. 951-955, 2003.

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

HAMAL, K. R.; BURGESS, S. C.; PEVZNER, I. Y.; ERF, G. F. Maternal Antibody Transfer from Dams to Their Egg Yolks, Egg Whites, and Chicks in Meat Lines of Chickens. **Poultry Science**, v. 85, n. 1364-1372, 2006.

HANSEN, J. D.; LANDIS, E. D.; PHILLIPS, R. B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **National Academy Science**, v. 102, n. 19, p. 6919-6924, 2005.

HARTREE, E. E. Determination of protein; A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 48, p. 422-427, 1972.

HATTA, H.; MABE, K.; YAMAMOTO, T.; GUITERREZ, M. A.; MIYAZAKI, T. Prevention of fish disease using egg yolk antibody. In: SIM, J. S.; NAKAI, S. (Ed.). **Egg uses and processing technologies**. CAB International, Wallingford, 1994. p. 241-249.

HIROI, T. M.; YANAGITA, N.; OHTA, G.; SAKAUE, G.; KIYONO, H. IL-15 and IL-5 receptor selectively regulates differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses. **Journal Immunology**, v. 162, p. 4329-4337, 2000.

HIRONO, I.; NAM, B. H.; ENOMOTO, J.; UCHINO, K.; AOKI, T. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 15, p. 63-70, 2003.

HSU, P. Y.; LEE, K. K.; HU, C. C.; LIU, P. C. Purification and characterization of a phospholipase by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from cobia *Rachycentron canadum*. **Journal Basic Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 969-975, 2014.

LABELLA, A.; MANCHADO, M.; ALONSO, M. C.; CASTRO, D.; ROMALDE, J. L.; BORREGO, J. J. Molecular intraspecific characterization of *Photobacterium damsela* ssp. *Damsela* strains affecting culture marine fish. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p. 2122-2132, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, K. A.; CHANG, S. K.; LEE, Y. J.; LEE, J. H.; KOO, N. S. Acid stability of anti *Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 488-493, 2002.

LIAO, I. C., HUANG, T. S., TSAI, W. S., HSUEH, C. M., CHANG, S. L., LEAÑO, E. M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, v. 237, p. 155-165, 2004.

LIU, P.; LIN, J.; LEE, K. Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 499-507, 2003.

MANRIQUE, W. G.; CLAUDIANO, G. S.; CASTRO, M. P.; PETRILLO, T. R.; FIGUEIREDO, M. A. P.; BELO, M. A. A.; BERDEAL, M. I. Q.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. M. Expression of Cellular Components in Granulomatous Inflammatory Response in *Piaractus mesopotamicus* Model. **Plos One**, v. 10, 2015.

MARCUSSO, P. F.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; SALVADOR, R. Imunologia das vacinas bacterianas em teleósteos: Revisão. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, p. 50, 2013.

MENDOZA, J. C.; VIVAS, D., RODRÍGUEZ, E.; INGA, R.; SANDOVAL, G.; LAZO, F.; YARLEQUÉ, A. Eficacia experimental de anticuerpos IgY producidos en huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 29, p. 69-75, 2012.

MENNI, R. C.; RINGUELET, R. A.; ARANBURU, R. H. **Peces marinos de la Argentina y Uruguay**. Editorial. Hemisferio sur S.A. Buenos Aires, Argentina, 1984. p. 359

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian haematology and associated disorders. **Veterinary Clinics: Exotic Animal**, v. 11, n. 3, p. 501-522, 2008.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 343-383, 2004.

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 625-723.

MORI, H.; ISHIKAWA, Y. Cloning and nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol and erythromycin resistance genes on a transferable R plasmids from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Bulletin of the Faculty of Fisheries**, v. 93, p. 41-50, 2012.

MORRISON, S.; MOHAMMED, S. M.; WIMS, L. A.; TRINH, K. R.; ETCHES, R. J. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 619-625, 2001.

MUNHOZ, L. S.; VARGAS, G. D. A.; FISCHER, G.; LIMA, M.; ESTEVES, P. A.; HÜBNER, S. O. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 153-160, 2014.

NAGANO, I.; INOUE, S.; KAWAI, K.; OSHIMA, S. Repeatable immersion infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* reproducing clinical signs and moderate mortality. **Fisheries Science**, v. 75, p. 707-714, 2009.

NASCIMENTO, D. S.; VALE, A.; TOMÁS, A. M.; ZOU, J.; SECOMBES, C. J.; SANTOS, N. M. Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) interleukin-12 p40 and p35 subunits. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 2277-2291, 2007.

OLÁH, I.; VERVEDE, L. **Structure of the avian lymphoid system. In: Avian Immunology**, F. Davison; B. KASPERS; K. A. SCHAT, Ed.: Elsevier ed. San Diego, v.1, 2008, p. 13-32.

PAULY, D.; CHACANA, P. A.; CALZADO, E. G.; BREMBS, B.; SCHADE, R. IgY Technology: Extraction of Chickens Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, 2011.

PEREIRA, L. M. G.; PINTO, R. D.; SILVA, D. S.; MOREIRA, A. R.; BEITZINGER, C.; OLIVEIRA, P.; SAMPAIO, P.; BENZ, R.; AZEVEDO, J. E.; SANTOS, N. M. S.; VALE, A. Intracellular Trafficking of AIP56, an NF-B-Cleaving Toxin from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 5270-5285, 2014.

RAKUS, K. L.; WIEGERTJES, G. F.; JURECKA, P.; WALKER, P.D.; PILARCZK, A.; IRNAZAROW, I. Major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism influences disease resistance of common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Aquaculture**, v. 288, p. 44-50, 2009.

RANDELLI, E.; BUONOCORE, F.; SCAPIGLIATI, G. Cell markers and determinants in fish immunology. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 326-340, 2008.

RATCLIFFE, M. J. B cell development in gut associated lymphoid tissues. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 10, n. 87, p. 337-340, 2002.

REIS, M .I.; COSTA-RAMOS, C.; VALE, A.; SANTOS, N. M. Molecular cloning of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-8 gene and its involvement in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* triggered apoptosis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, p. 58-56, 2010.

ROMANO, L. A.; MEJÍA, J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista Aquatica**, v.18, p. 25-32, 2003.

ROMBENSO, A. N.; MOREIRA, C. B.; MIRANDA-FILHO, K. C.; SAMPAIO, L. A. Avaliação do crescimento de bijupirá (*Rachycentron canadum*) alimentados com uma dieta comercial e peixe fresco. In: Conferencia latinoamericana sobre cultivo de peces nativos, 3., 2009, Chascomus. **Anais...** Chascomus: Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos, 2009. 1 CD-ROM.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999, p. 240.

SANTOS, N. M.; ROMANO, N.; SOUSA, M.; ELLIS, A. E.; ROMBOUT, J. H. Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 10, p. 583-596, 2010.

SAURABH, S.; SAHOO, P. Lysozyme: An important defense molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 223-239, 2008.

SCHWARZ, M. H.; CRAIG, S. R.; DELBOS, B.; MCLEAN, E.; SAMPAIO, L. A. Research-industry links assist cobia farming production. **Global Aquaculture Advocate**, p. 56-58, 2007.

SCOTT, T. R. Our Current Understanding of Humoral of Poultry. **Poultry Science**, v. 83, p. 574-579, 2004.

SILVA, D. S.; PEREIRA, L. M. G.; MOREIRA, A. R.; FERREIRA-DA-SILVA, F.; BRITO, R. M.; FARIA, T. Q.; ZORNETTA, I.; MONTECUCCO, C.; OLIVEIRA, P.; AZEVEDO, J. E.; PEREIRA, P. J. B.; MACEDO-RIBEIRO, S.; VALE, A.; SANTOS, N. M. S. The Apoptogenic Toxin AIP56 Is a Metalloprotease A-B Toxin that Cleaves NF-kappa b P65. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 2, 2013.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. **Statistical Methods**. Ames: Iowa State University Press, 1974.

SUBRAMANIAN, S.; ROSS, N. W.; MACKINNON, S. L. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 150, p. 85-92, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da Tilápia rendalli Boulenger, 1896 (*Osteichthyes: Cichlidae*) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, p. 103-110, 2003.

TORANZO, A. E.; ROMALDE, J. L.; MAGARIÑOS, B.; BARJA, J. L. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. **Options Méditerranéennes**. n. 86, p. 155-176, 2009.

UNESCO. União das Nações Unidas. **Água para um mundo sustentável**. Brasil, 2015.

URBACZEK, A. C.; TOLLER-KAWAHISA, J. E.; FONSECA, L. M.; COSTA, P. I.; FARIA, C. M. Q. G.; AZZOLINI, A. E. C. S.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M. Influence of FcγRIIIb polymorphism on its ability to cooperate with FcγRIIIa and CR3 in mediating the oxidative burst of human neutrophils. **Human Immunology**, v. 75, n. 8, p. 785-90, 2014.

XING, C. F.; HU, H. H.; HUANG, J. B.; FANG, H. C.; KAI, Y. H.; WU, Y. C.; SHI, S. C. Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 4, p. 1122-1128, 2013.

ZHEN, Y. H.; FANG, R.; DING, C.; JIN, L. J.; LI, Y.P.; SHU, X. H.; MA, X. C.; XU, Y. P. Efficacy of specific IgY for treatment of lipopolysaccharide-induced endotoxemia using a mouse model. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1524-1532, 2011.

ZHEN, Y. H.; JIN, L. J.; GUO, J.; LI, Y. P.; LI, Z.; FANG, R.; XU, Y. P. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, 1529-1535, 2008.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with M.S-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 27, p. 909-914, 1970.

WEST, A. P. J.; HERR, A. B.; BJORKMAN, P. J. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. **Immunity**, v. 20, v. 601-610, 2004.

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish: A review of current knowledge. **Fish and Shellfish Immunology**. v. 23, p. 1127-1151, 2007.