

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 19/09/2021.

Caroline Carla Santana

Produção e transferência passiva de anticorpos da classe IgY anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* purificados de gema de ovos de galinhas poedeiras na imunização de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior

**Araraquara
2019**

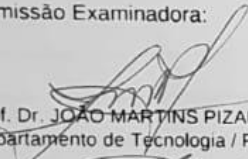
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

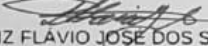
TÍTULO DA TESE: "Produção e transferência passiva de anticorpos da classe IgY anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* purificados de gema de ovos de galinhas poedeiras na imunização de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)"

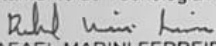
AUTORA: CAROLINE CARLA SANTANA

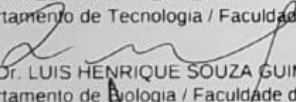
ORIENTADOR: JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR

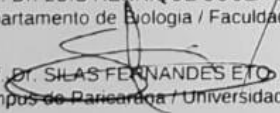
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS SANTOS
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal


Dr. RAFAEL MARINI FERREIRA
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto


Prof. Dr. SILAS FERNANDES ETO
Campus de Roraima / Universidade Federal de Roraima - UFRR - Boa Vista

Araraquara, 19 de setembro de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S231p Santana, Caroline Carla
Produção e transferência passiva de anticorpos da classe IgY anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* purificados de gema de ovos de galinhas poedeiras na imunização de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) / Caroline Carla Santana. – Araraquara : [s.n.], 2019
59 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: João Martins Pizauro Junior

1. Anfíbio. 2. Imunoglobulinas. 3. Ave poedeira. 4. Sistema imunológico. 5. Soroterapia. I. Título.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Caroline Carla Santana

Nome em citações bibliográficas: SANTANA, C. C.; SANTANA, CAROLINE C.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia. Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas

Via de Acesso Paulo Donato Castellane – s/n, Zona Rural, 14884-900, Jaboticabal, SP – Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Doutorado em Biotecnologia (2015-2019).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Produção e transferência passiva de anticorpos da classe IgY anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* purificados de gema de ovos de galinhas poedeiras na imunização de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Mestrado em Biotecnologia (2013-2015).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Atividade de fosfomonohidrolases presentes em fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Graduação em Ciências Biológicas (2009-2012).

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal, FCAVJ - UNESP, Brasil

Título: Estudo da atividade das fosfatases ácida e alcalina presentes em fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

ESTÁGIO DE DOCÊNCIA

Estágio de Docência em Ensino Superior junto à disciplina “**Fundamentos de Bioquímica**” do Curso de Engenharia Química, UNESP-IQ. 2016. Docente Responsável: Fernanda Zanolli Freitas.

Estágio de Docência em Ensino Superior junto à disciplina “**Laboratório de Química Geral**” do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UNESP-IQ. 2017. Docente Responsável: Vânia Martins Nogueira

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Produção bibliográfica:

1.1 Artigos completos publicados em periódicos

GONÇALVES, ADRIANO M.; SANTOS, LUIZ F. J.; **SANTANA, CAROLINE C.**; COLOSIO, RAFAEL R.; PIZAURO, JOÃO M. Activity of Tail Phosphatases: A Study during Growth and Metamorphosis of *Copeia*, v. 103, p. 634-638, 2015.

1.2 Resumos publicados em anais de congressos

GONÇALVES, A. M.; **SANTANA, C. C.**; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Can Phosphatases Participate of Cell Death and Nutrient Release in *L. catesbeianus* During Metamorphosis?. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. Anais da XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017.

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; COLOSIO, R. R.; MEDEIROS, A. S. R.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; OLIVEIRA, G. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; **SANTANA, C. C.**; PAVARINA, G. C.; LEITAO, N. J.; SAMARA, S. I.; BELO, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Validation of IgY in Diagnosis of Endocarditis and Bacterial Meningitis caused by *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. Anais da XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017.

OLIVEIRA, G. M.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; MEDEIROS, A. S. R.; GONÇALVES, A. M.; LEITAO, N. J.; **SANTANA, C. C.**; PAVARINA, G. C.; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; SAMARA, S. I.; BELO, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Opsonization and activation of the classic complement pathway of Nile tilapia on the neutralization of *Streptococcus agalactiae* in vitro. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. Anais da XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017.

GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; **SANTANA, C. C.**; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; OLIVEIRA, G. M.; VIEIRA, V. I.; FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; FERREIRA, G. C.; PIZAURO, J. M. Identification and Kinetic Characterization of Phosphatases Isozymes of *Lithobates catesbeianus* Tadpoles Tail During Metamorphosis. In: 45a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e de Biologia Molecular, 2016, Natal. 45a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e de Biologia Molecular, 2016.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; GONÇALVES, A. M.; **SANTANA, C. C.**; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Método Imunoenzimático de Elisa Utilizando IgY para Detecção de Proteínas de *Streptococcus agalactiae*. In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, 2016, Jaboticabal. Anais do 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, 2016.

FREITAS, T. M.; SANTOS, L. F. J.; **SANTANA, C. C.**; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M.; PORTELLA, M. C. Digestive enzymatic activity on *Piaractus mesopotamicus* larvae during early life stage and under different rearing protocols. In: Aquaculture America 2016, 2016, Las Vegas. Abstract of Aquaculture America 2016, 2016.

SANTANA, C. C.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; OLIVEIRA, G. M.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Alkaline Phosphatase LPS-dephosphorylase Activity During Bullfrog's (*Lithobates catesbeianus*) Metamorphosis. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015.

COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; **SANTANA, C. C.**; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; PIZAURO, J. M. Hydrolases Activities During the Bone Formation Process in *Lithobates catesbeianus*. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015.

GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; **SANTANA, C. C.**; PIZAURO, J. M. A Study of Tails Acid and Alkaline Phosphatases During Bullfrog's (*Lithobates catesbeianus*) Larval Development. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015.

PAVARINA, G. C.; **SANTANA, C. C.**; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Caracterização cinética parcial da LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2015, Jaboticabal. XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2015.

NEIRA, L. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; **SANTANA, C. C.**; COLOSIO, R. R.; BUZZOLLO, H.; SANDRE, L. C. G.; NASCIMENTO, T. M. T.; PIZAURO, J. M.; CARNEIRO, D. J. Electrophoresis as a tool to estimate the polypeptide chain in tilapia waste hydrolysate. In: Aquaculture America 2015, 2015, New Orleans. Anais do Aquaculture America 2015, 2015.

2 Participação em eventos:

IX Bionativa. A utilização de sapos, rãs e pererecas em pesquisas científicas e alimentação humana: desconstruindo preconceitos da ordem anura. 2018.

I Colóquio Regional de Sexualidade e Gênero: da exclusão ao compromisso com a promoção do respeito à diversidade. 2017.

Woman Real Life - I Colóquio Regional de Sexualidade e Gênero: da exclusão ao compromisso com a promoção do respeito à diversidade. 2017.

III Ciclo de Palestras - Aquicultura. 2017.

VIII Bionativa. A utilização de sapos, rãs e pererecas em pesquisas científicas e alimentação humana: desconstruindo preconceitos da ordem anura. 2017.

VII Bionativa. A utilização de sapos, rãs e pererecas em pesquisas científicas e alimentação humana: desconstruindo preconceitos da ordem anura. 2016.

VI BioNativa. A utilização de sapos, rãs e pererecas em pesquisas científicas e alimentação humana: desconstruindo preconceitos da ordem anura. 2015.

3 Bancas:

3.1 Participação em bancas de trabalhos de conclusão

PIZAURO, J. M.; **SANTANA, C. C.**; NEIRA, L. M. Participação em banca de Estêvão Cangussu de Souza. Avaliação da adição de resíduo de óleo de soja em dietas com diferentes fontes lipídicas nas atividades da tripsina e quimotripsina pancreáticas e fosfatase alcalina hepática de frangos de corte. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

3.2 Participação em bancas de comissões julgadoras

SANTANA, C. C. XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2017. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

4 Orientações:

4.1 Orientações e supervisões concluídas

Gabriel Caetano Ferreira. Atividade da tripsina e quimotripsina no hepatopâncreas de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com silagem de resíduos de tilápia. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Orientador: João Martins Pizauro Junior. Co-orientadora: **Caroline Carla Santana**.

Gabriella Cavazzini Pavarina. Avaliação da atividade de fosfomonohidrolase e de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal de frangos de corte alimentados com probióticos e/ou óleos essenciais. Início: 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Orientador: João Martins Pizauro Junior. Co-orientadora: **Caroline Carla Santana**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais por todo incentivo e por mostrarem a importância do estudo na vida de uma pessoa, além de todo amor, carinho e dedicação. E à minha irmã, Fran, que foi essencial na minha construção como pessoa e, claro, com quem aprendi a amar a boa música.

Agradeço ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior pela orientação neste trabalho, pela minha formação acadêmica e pelos ensinamentos que levarei por toda minha vida profissional.

Aos meus companheiros do Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas (LEIA) que amenizaram todo nervosismo da pós-graduação e fizeram com que esse trabalho ultrapassasse as barreiras da dificuldade, tornando-se parte de nossos cotidianos. Em especial, agradeço ao meu amigo Rafael Rodrigues Colosio, que esteve comigo desde a graduação, e minha grande amiga Gabriella Cavazzini Pavarina, que me deram o apoio necessário por toda essa jornada.

Aos integrantes da Seção Técnica de Pós-graduação e da Biblioteca do Instituto de Química, que cumprem seu trabalho de forma competente e muito compreensiva.

Ao Márcio Roberto Reche pela ajuda com o manuseio e criação dos animais.

Aos integrantes da Banca Examinadora, Luís Henrique Souza Guimarães, Luiz Flávio José dos Santos, Silas Fernandes Eto e Rafael Marini Ferreira, por terem aceitado o convite de participar de minha defesa, enriquecendo o presente trabalho com seus elogios, críticas e sugestões.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento concedido para realização do presente trabalho.

E à alguns nomes que durante a graduação marcaram as construções e experiências e, sem sombra de dúvidas, acompanharão as descobertas, os saberes e sabores que ainda presentearão meu paladar.

“Eu não tenho filosofia: tenho sentidos...
Se falo na Natureza, não é porque saiba o que ela é.
Mas porque a amo, e amo-a por isso,
Porque quem ama nunca sabe o que ama
Nem por que ama, nem o que é amar...”
(Alberto Caeiro - Fernando Pessoa)

RESUMO

O desenvolvimento dos anfíbios é caracterizado por uma série de eventos que possibilitam a esses animais a ocupação dos ambientes aquático e terrestre. Nesse sentido, a supressão do sistema imunológico é necessária para que esses eventos ocorram de forma ordenada, evitando então, respostas autoimunes. Por outro lado essa imunossupressão durante a metamorfose pode tornar os animais mais susceptíveis a algumas doenças, dentre elas, a causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), que é considerado o principal patógeno de anfíbios da atualidade. Nesse contexto, a produção de anticorpos da classe IgY anti-*Bd*, extraídos de gemas de ovos de galinhas poedeiras infectadas com o referido fungo, pode agregar valor ao ovo, auxiliar no combate a quitridiomicose, diminuição da perda da produção e dispersão do patógeno por criadouros, diminuindo também o uso de antibióticos no tratamento e profilaxia da quitridiomicose, aumentando o nível de segurança da carne e valorizando o produto final. No presente estudo a imunização das aves com o antígeno desativado fez com que o sistema humoral das mesmas respondesse a indução contra *Bd* viabilizando a produção e purificação de imunoglobulinas da classe IgY específicas e de alta avidéz contra o fungo. A transferência passiva das imunoglobulinas purificadas das gemas apresentou resultados promissores, onde os girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) tratados não apresentaram danos deletérios quanto à sanidade animal dos mesmos, mantendo a morfologia e contagem das células sanguíneas dentro da normalidade. Esses resultados possibilitam o desenvolvimento de uma soroterapia para anfíbios que pode auxiliar no controle do fungo e sobrevivência das populações naturais que estão sendo extintas em todo planeta.

Palavras-chave: Anfíbios; IgY; Quitridiomicose; Sistema Imune; Soroterapia.

ABSTRACT

The development of amphibians is characterized by a series of events that enable these animals to occupy aquatic and terrestrial environments. In this sense, suppression of the immune system is necessary for these events to occur in an orderly manner, avoiding autoimmune responses. On the other hand, this immunosuppression during metamorphosis may make the animals more susceptible to some diseases, among them, the one caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), which is considered the main amphibian pathogen today. In this context, the production of anti-*Bd* IgY class antibodies, extracted from egg yolks of laying hens infected with this fungus, may add value to the egg, assist in the fight against chytridiomycosis, decrease production loss and pathogen dispersion by breeding facilities, reduce the use of antibiotics in the treatment and prophylaxis of chytridiomycosis, increasing the safety level of the meat and valuing the final product. In the present study, the immunization of hens with the deactivated antigen caused their humoral system to respond to induction against *Bd*, enabling the production and purification of specific and highly avid fungal IgY class immunoglobulins. Passive transfer of purified immunoglobulins from yolk showed promising results, where treated bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) showed no deleterious damage to animal health, keeping the morphology and counting of blood cells within normal range. These results enable the development of a serotherapy for amphibians that can help control the fungus and the survival of natural populations which are being extinct all over the planet.

Keywords: Amphibians; IgY; Chytridiomycosis; Immune System; Serotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	20
Figura 2 – Morfologia do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> em meio de cultivo contendo triptona.....	21
Figura 3 – Distribuição das imunoglobulinas presentes em ovos de aves.....	23
Figura 4 – Procedimento para obtenção das frações proteicas do fungo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	28
Figura 5 – Procedimento para purificação dos anticorpos presentes nas gemas.....	30
Figura 6 – Tabela de Gosner (1960), utilizada para classificar os girinos em estádios de desenvolvimento de 36 a 39 da metamorfose.....	33
Figura 7 – Cinética da produção dos anticorpos IgY específicos no soro de galinhas poedeiras imunizadas com a fração total de <i>Bd</i> durante o período experimental (90 dias).	38
Figura 8 – Cinética da produção dos anticorpos IgY específicos na gema de galinhas poedeiras imunizadas com a fração total de <i>Bd</i> durante o período experimental (90 dias).....	38
Figura 9 – Potencial de avidéz dos anticorpos específicos produzidos no soro de galinhas poedeiras imunizadas com a fração total de <i>Bd</i>	40
Figura 10 – Eletroforese (SDS-PAGE 9%) do extrato purificado da gema.....	41
Figura 11 - Produção média dos anticorpos IgY específicos no soro de girinos nos diferentes tratamentos.....	43
Figura 12 – Número de eritrócitos; variação das porcentagens da contagem diferencial de leucócitos e morfologia leucocitária.	45

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Médias das atividades (U/mg) das fosfatases acida e alcalina hepáticas de <i>L. catesbeianus</i> nos diferentes tratamentos.....	48
--	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Perspectivas para a ranicultura no Brasil.....	18
2.2 Batrachochytrium dendrobatidis e a quitridiomicose.....	19
2.3 O sistema imune dos anfíbios e o uso de IgY	221
2.4 Hematologia dos anfíbios.....	23
2.5 O fígado e a fosfatase	25
3 OBJETIVOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	277
4.1 Isolamento das amostras de B. dendrobatidis e preparo do antígeno vacinal	27
4.2 Imunização e obtenção de amostras biológicas das aves (sangue e ovos)	299
4.3 Purificação dos anticorpos IgY.....	29
4.4 Dosagem da concentração de proteínas nas amostras.....	31
4.5 Análise eletroforética.....	31
4.6 Cinética da produção e determinação da afinidade e avidéz da IgY anti-Bd no soro e na gema das aves imunizadas	32
4.7 Tratamentos, soroterapia e infecção experimental dos girinos de rã-touro	32
4.8 Coleta de amostras biológicas para análise hematológicas e imunológicas dos girinos de rã-touro	34
4.9 Determinação da atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina do extrato hepático.....	35
4.10 Determinação da atividade p-nitrofenilfosfatásica (PNFFásica) das fosfatases ácida e alcalina	366
4.11 Análise estatística dos resultados.....	36

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO377
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS499
7 CONCLUSÕES50
REFERÊNCIAS.....51
ANEXO 1.....59

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os anfíbios estão divididos em três ordens: Anura, Caudata e Gymnophiona (THESKA et al., 2018), sendo os anuros, o grupo mais diversificado, ocupando todos os continentes, com exceção da Antártida, desertos extremos e algumas ilhas oceânicas (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Os anfíbios são organismos altamente sensíveis a alterações do ambiente, devido ao fato de, em geral, possuírem uma fase larval totalmente aquática e uma fase pós-metamórfica terrestre (POUGH; JANIS; HEISER, 2008), além de condições especiais tanto para sua dispersão (BORGES-MARTINS et al., 2007) quanto à permeabilidade de sua pele. Assim, a presença, a quantidade e a sanidade desses animais, podem ser consideradas bioindicadores da qualidade ambiental.

Os motivos do acentuado declínio da população mundial de anfíbios, em condições naturais, observado nas últimas décadas, ainda não estão completamente esclarecidos (SILVANO; SEGALLA, 2005; POUGH; JANIS; HEISER, 2008; O'HANLON et al., 2018). Algumas espécies já foram extintas, como é o caso das espécies da família Rheobatrachidae (STUART et al., 2004), e muitas outras estão ameaçadas de extinção (IUCN, 2017).

A infecção dos anfíbios por patógenos microbianos é a principal causa de morte de diversas populações. Dentre os principais microrganismos, o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), surgido recentemente na Ásia (O'HANLON et al., 2018), tem sido descrito como responsável pelo declínio populacional desses animais, causando a quitridiomicose (STUART et al., 2004). Outros patógenos encontrados são: o fungo *Basidiobolus ranarum* e a bactéria oportunista *Aeromonas hydrophila* (ROLLINS-SMITH et al., 2002).

A quitridiomicose tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores, devido ao fato de acometer grande número de espécies de anfíbios em todo o mundo, afetando tanto populações de espécies nativas como os animais voltados à produção de carne em ranários (FISHER; GARNER; WALKER, 2009; KILPATRICK; BRIGGS; DASZAK, 2009).

A comercialização de anfíbios para alimentação pode estar relacionada a dispersão do *Bd* pelo mundo, uma vez que algumas espécies, como a *Lithobates*

catesbeianus e a *Xenopus laevis* são resistentes a doença, fazendo assim a introdução do fungo em locais que contenham espécies susceptíveis (MAZZONI et al., 2003; WELDON et al., 2004; VERDADE; DIXO; CURCIO, 2010).

Apesar dos crescentes estudos acerca dessa doença, os mecanismos de infecção, patogênese e de cura ainda não estão totalmente elucidados, embora o desequilíbrio homeostático, a interferência na alimentação, a secreção de toxinas pelo *Bd* e a diminuição de trocas gasosas pela pele dos animais, têm sido considerados os principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença, e a consequente, morte (FISHER; GARNER; WALKER, 2009; GARNER et al., 2009; KILPATRICK; BRIGGS; DASZAK, 2009, ROLLINS-SMITH et al., 2011).

Anticorpos produzidos em ovos de galinhas têm sido uma alternativa tanto aos tratamentos convencionais, contra doenças bacterianas (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2010) e fúngicas (MICHAEL et al., 2010), com antibióticos, diminuindo assim a seleção de bactérias resistentes, quanto à utilização dos anticorpos de mamíferos (SHIN et al., 2002; SILVA; TAMBOURGI, 2010; ETO et al., 2015). Os anticorpos da classe IgY presentes em aves, também encontrados em répteis, peixes pulmonados e anfíbios (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995), apresentam vantagens em relação a produção em mamíferos, como: maior taxa de produtividade por animal e menor custo de produção, além de não ser necessário o sacrifício dos animais, uma vez que os anticorpos são transferidos passivamente da circulação sistêmica da ave para gema dos ovos, de onde são purificados. Esses anticorpos neutralizam o patógeno e suas toxinas e dificultam a adesão e instalação da infecção (CARLANDER, 2002; CHACANA et al., 2004), podendo assim conferir resistência à diferentes microrganismos.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que o sistema imune das aves foi capaz de reconhecer e produzir anticorpos específicos e de alta taxa de reconhecimento para antígenos fúngicos de *Bd*.

O método utilizado se mostrou simples, fácil e altamente reprodutivo para a purificação e recuperação da IgY anti-*Bd*.

A transferência passiva para os girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) revelou resultados promissores do uso IgY na imunoterapia de *Bd* em anfíbios de forma preventiva.

Os resultados obtidos mostraram que estudos acerca da dosagem, tempo de exposição bem como o uso da referida soroterapia em espécies mais susceptíveis a quitridiomycose são necessários para o desenvolvimento de uma metodologia eficaz contra a patologia.

REFERÊNCIAS

- AKITA, E. M.; LI-CHAN, E. C.; NAKAI, S. Neutralization of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. **Food and Agricultural Immunology**, v. 10, p. 161-172, 1998.
- ANDRADE, F. G.; ETO, S. F.; FERRARO, 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.
- ARAUCO, L. R. R.; STÉFANI, M. V.; NAKAGHI, L. S. O. Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho e na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 29, n. 2, p. 227-234, 2007.
- BAITCHMAN, E. J.; PESSIER, A. P. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Amphibian Chytridiomycosis. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 16, p. 669–685, 2013.
- BERGER, L.; HYATT, A. D.; SPEARE, R.; LONGCORE, J. E. Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, n.1, p. 51-63, 2005.
- BIZHANOV, G.; JONAUSKIENÉ, I.; HAU, J. A novel method, based on lithium sulfate precipitation for purification of chicken egg yolk immunoglobulin Y, applied to immunospecific antibodies against Sendai virus. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**. v. 31, n. 3, p. 121-130, 2004.
- BLAUSTEIN, A. R.; JOHNSON, P. T. J. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, n. 1, p. 87-94, 2003.
- BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. Anfíbios. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. (Org.). **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2007. p. 276-291.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAMPBELL, T. W. Hematologia dos anfíbios. In: _____ THRAL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2015. Cap. 22, p. 671-687.
- CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. Amphibian declines: an immunological perspective. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 459-472, 1999.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody: *In vitro* and *in vivo***. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2002. 53 p.

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**. v. 85, n. 5, 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.

CRIBB, A. Y.; AFONSO, A. M.; MOSTÉRIO, C. M. F. **Manual técnico de ranicultura**. Brasília-DF: Embrapa, 2013. 73p.

CRIBB, A. Y.; CARVALHO, L. T.; MENDONÇA, R. C. S. **O consumo de carne de rã: caracterização, tendências e perspectivas**. Rio de Janeiro, RJ: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2009. 18 p.

CZESNIK, D.; KUDUZ, J.; SCHILD, D.; MANZINI, I. ATP activates both receptor and sustentacular supporting cells in the olfactory epithelium of *Xenopus laevis* tadpoles. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 119-128, 2006.

DAVIS, A. K. Ontogenetic changes in erythrocyte morphology in larval mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*, measured with image analysis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 17, p. 23-8. 2008.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill. 1994. 672 p.

ELLISON, A. R.; SAVAGE, A. E.; DIRENZO, G. V.; LANGHAMMER, P.; LIPS, K. R.; ZAMUDIO, K. R. Fighting a losing battle: vigorous immune response countered by pathogen suppression of host defenses in the chytridiomycosis susceptible frog *Atelopus zeteki*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 7, p. 1275-1289; 2014.

EMBRAPA, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2773050/pesquisa-investe-em-ra-desenvolve-produtos-manual-e-cria-rede-de-cooperacao>. Acesso em 30 de abril 2015.

ETO, F.S.; KUSUO ETO, A.; MORAES, F. R.; MORAES, R.E.J; PIZAURO JUNIOR, J. M.; FERNANDES, D. C.; CLAUDIANO, G. S.; GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SALVADOR, R.; NAOMI ETO, A.; BALBUENA, T. S. (Brasil). **Rações Nutracêuticas e seus usos**. BR1020150141548, 16/jun/2015, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

FENERICK JUNIOR, J.; STÉFANI, M. V.; MARTINS, M. L. Parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, alimentada com diferentes rações comerciais. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 173-181, 2006.

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

FERNÁNDEZ-LORAS, A.; FERNÁNDEZ-BEASKOETXEA, S.; ARRIERO, E.; FISHER, M. C.; BOSCH, J. Early exposure to *Batrachochytrium dendrobatidis* causes profound immunosuppression in amphibians. **European Journal of Wildlife Research**, v. 63, n. 99, 2017.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J.; WALKER, S. F. Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. **The Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 291-310, 2009.

FITES, J. S.; RAMSEY, J. P.; HOLDEN, W. M.; COLLIER, S. P.; SUTHERLAND, D. M.; REINERT, L. K.; GAYEK, A. S.; DERMODY, T. S.; AUNE, T. M.; OSWALD-RICHTER, K.; ROLLINS-SMITH, L. A. The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. **Science**, v. 342, n.6156, p. 366-369, 2013.

GARNER, T. W. J.; WALKER, S.; BOSCH, J.; LEECH, S.; ROWCLIFFE, J. M.; CUNNINGHAM, A. A.; FISHER, M. C. Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Oikos**, v. 118, p. 783-791, 2009.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, p. 183-190, 1960.

GUIMARÃES, M. C. C.; CORREIA, V. G.; GAMA FILHO, R. V. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas online**, v. 2, n. 7, p. 122-129, 2008.
GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1176p.

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

HASEBE, T.; OSHIMA, H.; KAWAMURA, K.; KIKUYAMA, S. Rapid and selective removal of larval erythrocytes from systemic circulation during metamorphosis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Development Growth and Differentiation**, v. 41, p. 639-643, 1999.

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.

HORI, Y.; TAKEYAMA, Y.; UEDA, T.; NISHIKAWA, J.; YAMAMOTO, M.; SAITOH, Y. Impaired transport of lipopolysaccharide across the hepatocytes in rats with cerulein-induced experimental pancreatitis. **Pancreas**, v. 16, p. 148-153, 1998.

IBGE. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2773050/pesquisa-investe-em-ra-desenvolve-produtos-manual-e-cria-rede-de-cooperacao>>. Acesso em 30 de abril de 2015.

IUCN (2017). **The IUCN Red List of threatened species**. <http://www.iucnredlist.org>.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H, LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2010.

KILPATRICK, A. M.; BRIGGS, C. J.; DASZAK, P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 2, p. 109-118, 2009.

KOUSTED, T. M.; KALLIOKOSKI, O.; CHRISTENSEN, S. K.; WINTHER, J. R.; HAUA, J. Exploring the antigenic response to multiplexed immunizations in a chicken model of antibody production. **Heliyon**, v. 3, n. 3, 2017.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, n. 3, p.163-182, 2012.

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

LANA, G. R. Q.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; LANA, A. M. Q. Efeito da Temperatura Ambiente e da Restrição Alimentar sobre o Desempenho e a Composição da Carcaça de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1117-1123, 2000.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium Dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219-227, 1999.

MARTEL, A.; PASMANS, F.; FISHER, M. C.; GROGAN, L. F.; SKERRATT, L. F.; BERGER, L. Chytridiomycosis. In:_____ SEYEDMOUSAVI, S.; DE HOOG, G.S.; GUILLOT, J.; VERWEIJ, P.E. **Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals**. eds. Springer International Publishing Nature, 2018. Cap 14, p. 309-335.

MAZZONI, R.; CUNNINGHAM, A. C.; DASZAK, P.; APOLO, A.; PERDOMO, E.; SPERANZA, G. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbiana*) farmed for international trade. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 995-998, 2003.

McCOMB, R. B.; BOWERS, G. N. Jr.; POSEN, S. Alkaline phosphatase. New York: **Plenum Press**, 1979.

MICHAEL, A.; MEENATCHISUNDARAM, S.; PARAMESWARI, G.; SUBBRAJ, T.; SELVAKUMARAN, R.; RAMALINGAM, S. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 468-474, 2010.

MILLÁN, J. L. **Alkaline phosphatases**: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling*, v. 2, p. 335-341, 2006.

MUNHOZ, L. S. et al. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. *Ciência Rural*, v. 44, n. 1, p. 153–160, jan. 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1336 p.

O'HANLON et al. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines, *Science*, v. 360, n. 6389, p. 621-627, 2018.

PAHKALA, M.; RASANEN, K.; LAURILA, A.; JOHANSON, U.; BJORN, L.O.; MERILA, J. Lethal and sublethal effects of UV-B/pH synergism on common frog embryos. *Conservation Biology*, v. 16, p. 1063–1073. 2002.

PFEIFFER, C. J.; HAYWOOD, P.; ASASHIMA, M. Blood cell morphology and counts in the Japanese newt (*Cynops pyrogaster*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 21, p. 56-64, 1990.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 152, n. 2, p. 121-129, 1995.

PIZAURO, J. M.; DEMENIS, M. A.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1368, n. 1, p. 108-114, 1998.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. Salamandras, anuros e cecílias. In: _____. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 10, p. 220-263.

RAMSEY, J. P.; REINERT, L. K.; HARPER, L. K.; WOODHAMS, D. C.; ROLLINS-SMITH, L. A. Immune Defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Fungus Linked to Global Amphibian Declines, in the South African Clawed Frog, *Xenopus laevis*. *Infection and immunity*, v. 78, p. 3981-3992, 2010.

RIBAS, L.; LI, M. S.; DODDINGTON, B. J.; ROBERT, J.; SEIDEL, J. A.; KROLL, J. S.; ZIMMERMAN, L. B.; GRASSLY, N. C.; GARNER, T. W.; FISHER, M. C. Expression profiling the temperature-dependent amphibian response to infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One*, v. 4, n. 12, p. 1-10, 2009.

RIBEIRO FILHO, O. P.; LIMA, S. L.; ANDRADE, D. R.; SEIXAS FILHO, J. T. Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) com o uso de extrato bruto hipofisário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 27, n. 2, p. 216-223, 1998.

- ROLLINS-SMITH, L. A. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 1593-1599, 2009.
- ROLLINS-SMITH, L. A.; BARKER, K. S.; DAVIS, A. T. Involvement of glucocorticoids in the reorganization of the amphibian immune system at metamorphosis. **Developmental Immunology**, v. 5, p.145-52, 1997.
- ROLLINS-SMITH, L. A.; DOERSAM, J. K.; LONGCORE, J. E.; TAYLOR, S. K.; SHAMBLIN, J. C.; CAREY, C.; ZASLOFF, M. A. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 63-72, 2002.
- ROLLINS-SMITH, L. A.; RAMSEY, J. P.; PASK, J. D.; REINERT, L. K.; WOODHAMS, D. C. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. **Integrative and Comparative Biology**, v. 51, n. 4, p. 552-562, 2011.
- ROSENBLUM, E. B.; POORTEN, T. J.; SETTLES, M.; MURDOCH, G. K.; ROBERT, J.; MADDOX, N.; EISEN, M. B. Genome-wide transcriptional response of *Silurana (Xenopus) tropicalis* to infection with the deadly chytrid fungus. **PLoS One**, n. 4, v. 8, p. 1-10, 2009.
- SANTANA, C. C. **Atividade de fosfomonohidrolases presentes em fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose**. 2015.Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- SHIN, J.; YANG, M.; NAM, S.W.; KIM, J. T.; MYUNG, N. H.; BANG, W.; ROE, I. H. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1061-1066, 2002.
- SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 173-180, 2010.
- SILVANO, D. L; SEGALLA, M. V. Conservation of brazilian amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 653-658, 2005.
- STALLARD, R. F. Possible environmental factors underlying amphibian decline in eastern Puerto Rico: analysis of U.S. government data archives. **Conservation Biology**, v. 15, p. 943-953, 2001.
- STICE, M. J.; BRIGGS, C. J. Immunization is ineffective at preventing infection and mortality due to the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, p. 70-77, 2010.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783-1786, 2004.

TAVARES, T. C. F.; SOARES, P. M.; NEVES, J. H. F. F.; SOARES, M. M.; JUNIOR, A. F.; SOUZA, D. N. L.; ÁVILA, V. M. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Produção e purificação de imunoglobulinas Y policlonais anti-*Leptospira* ssp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p.1097-1102, 2013.

THESKA, T.; WILKINSON, M.; GOWER, D. J.; MÜLLER, H. Musculoskeletal development of the Central African caecilian *Idiocranium russeli* (Amphibia: Gymnophiona: Indotyphlidae) and its bearing on the re-evolution of larvae in caecilian amphibians. **Zoomorphology**, v. 138, n.1, p. 137-158, 2018.

TONG, C.; GENG, F.; HE, Z.; CAI, Z.; MA, M. A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. **Poultry Science**, v. 94, p. 104-110, 2015.

TREON, S. P.; THOMAS, P.; BROITMAN, S. A. Lipopolysaccharide (LPS) processing by Kupffer cells releases a modified LPS with increased hepatocyte binding and decreased tumor necrosis factor-alpha stimulatory capacity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 202, p. 153-158, 1993.

TURNER, R. J. Amphibians. In: _____ ROWLEY, A. F., RATCLIFFE, N. A. **Vertebrate Blood Cells**. eds. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 129-209.

VAN ROOIJ, P.; MARTEL, A.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. **Veterinary Research**, v. 46, n. 137, p. 1-22, 2015.

VERDADE, K. V.; DIXO, M; CURCIO, F. F. Risks of Extinction of Frogs and Toads as a Result of Environmental Changes. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 161-172, 2010.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, n. 8, p.3 92-398, 1995.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, p. 392-398, 1995.

WELDON, C.; DU PREEZ, L. H.; HYATT, A. D.; MULLER, R.; SPEARE, R. Origin of the amphibian chytrid fungus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2100-2105, 2004.

WOODHAMS, D. C.; ROLLINS-SMITH, L. A.; CAREY, C.; REINERT, L.; TYLER, M. J.; ALFORD, R. Population trends associated with antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. **Oecologia**, v. 46, p. 531-540, 2006.

ZHAO, Y.; JIN, Y.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Purification of lysozyme from skin secretions of *Bufo andrewsi*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology Pharmacology**, v. 142, p. 46-52, 2006.