

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**

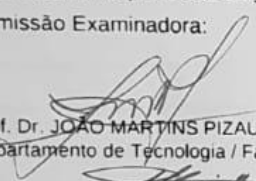
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

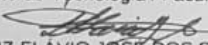
TÍTULO DA TESE: "Produção e transferência passiva de anticorpos da classe IgY anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* purificados de gema de ovos de galinhas poedeiras na imunização de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)"

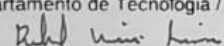
AUTORA: CAROLINE CARLA SANTANA

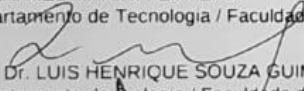
ORIENTADOR: JOÃO MARTINS PIZAURRO JUNIOR

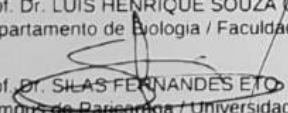
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURRO 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

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

## LISTA DE TABELA

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

## SUMÁRIO

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

|                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b> | <b>..377</b>  |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>..499</b>  |
| <b>7 CONCLUSÕES .....</b>             | <b>....50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>               | <b>....51</b> |
| <b>ANEXO 1.....</b>                   | <b>....59</b> |

## 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.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Perspectivas para a ranicultura no Brasil

A comercialização de anuros pelo mundo tem recebido destaque nas últimas décadas. Várias espécies são comercializadas em todo o mundo, onde as que mais se destacam são: a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), encontrada e comercializada em grande parte do território mundial; a rã-indiana (*Hoplobatrachus tigerirus*), produzida principalmente na Tailândia; a rã-chilena (*Calyptocephalella gayi*), encontrada no sul chileno; e a rã-europeia (*Pelophylax esculentus*), explorada na França (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

Nas últimas décadas a ranicultura brasileira vem ganhando espaço e se fortalecendo. No censo agropecuário de 2006 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de carne de rã era cerca de 160 toneladas por ano, já em 2013, segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a produção aumentou para 400 toneladas, mesmo assim, a demanda por carne de rã no Brasil ainda é três vezes maior que sua oferta.

Cerca de 90% da carne de rã consumida mundialmente é proveniente da caça, prática comum nos países do leste da Ásia, porém outros mercados consumidores, como Europa e América do Norte, proibiram em seu território o comércio de carne oriunda desta forma, além disso, ambientalistas defendem o fim dessa prática, o que evidencia perspectivas promissoras acerca da produção mundial de rã em sistemas de criação (CRIBB; CARVALHO; MENDONÇA, 2009; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

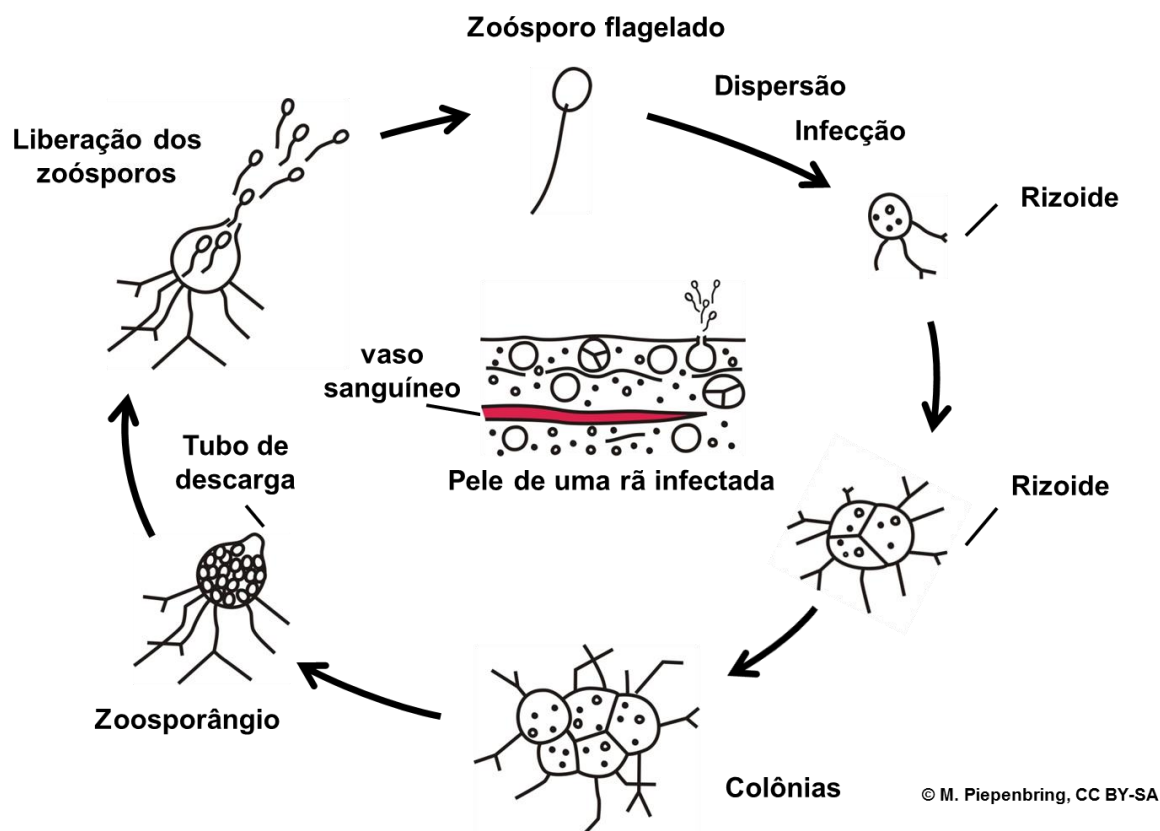
O uso de técnicas inadequadas de manejo, alimentação, qualidade da água, instalações e infecções por microrganismos são as principais causas de mortes nos girinos em criadouros comerciais (RIBEIRO FILHO et al., 1998; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013). Esses fatores contribuem para que a taxa de produção nos ranários ainda seja baixa (CRIBB; CARVALHO; MENDONÇA, 2009; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013). Para criação de girinos, imagos e, conseqüentemente, adultos saudáveis, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de manejo adequadas.

## 2.2 *Batrachochytrium dendrobatidis* e a quitridiomicose

Pesquisadores admitem a interferência humana como uma das possíveis responsáveis pelo declínio dos anfíbios em condições ambientais, promovendo a destruição de seus habitats; modificando o equilíbrio de temperatura, umidade e regime de chuvas; além de introduzir espécies exóticas que podem predá-los, competir por alimentos e transmitir patógenos (CAREY; COHEN; ROLLINS-SMITH, 1999; ROLLINS-SMITH et al., 2002, 2011; STUART et al., 2004). A poluição do ar, solos e lagos por herbicidas, fungicidas e outros compostos químicos, que contaminam o ambiente (STALLARD, 2001; BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003), bem como, o aumento da radiação ultravioleta-B (PAHKALA et al., 2002), também estão relacionadas às ações antrópicas.

O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* é responsável pela disseminação da quitridiomicose pelo mundo. Pertencente ao filo Chytridiomycota, se reproduz de forma assexuada através da liberação de zoósporos (esporos flagelados). Na reprodução *in vitro* o zoósporo forma um cisto, absorve seu flagelo e começa a desenvolver vários rizoides em sua forma germinada. Esta célula madura produz o zoosporângio, que contém novos zoósporos produzidos por mitose, que serão liberados para o meio (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999; BERGER et al., 2005; MARTEL et al, 2018) (Figura 1).

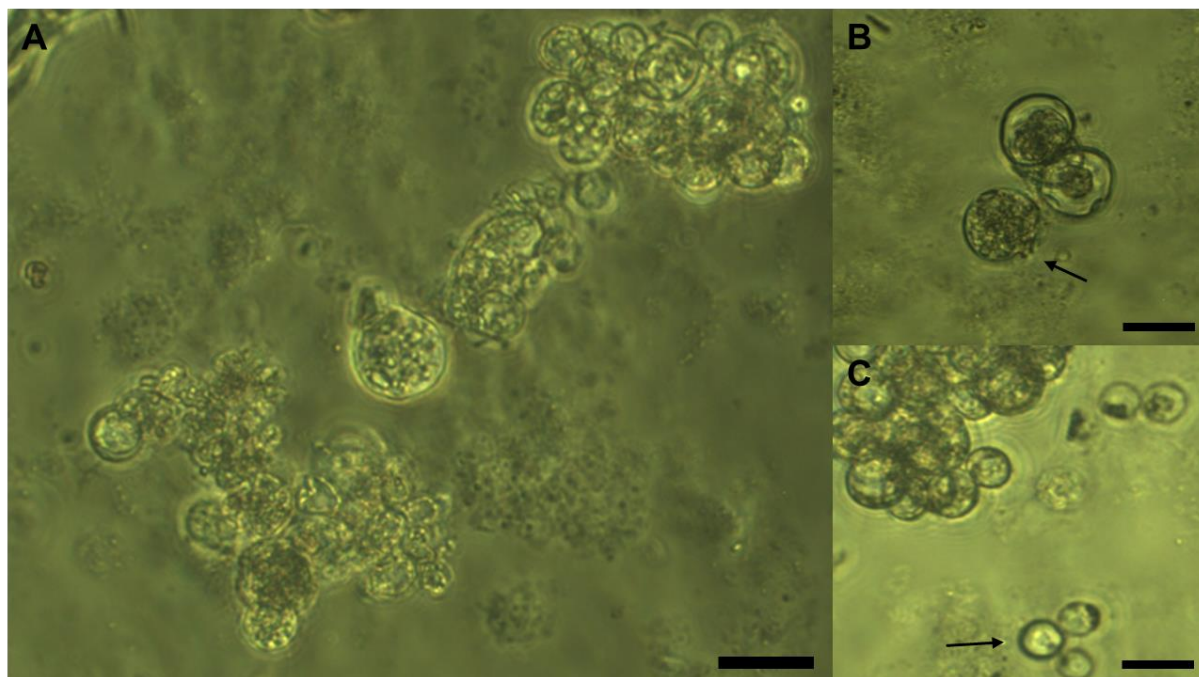
**Figura 1** – Ciclo de vida do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*.



Fonte: Baseada em Longcore; Pessier; Nichols (1999), modificada pela autora.

Na infecção, o ciclo de vida do fungo é similar ao observado em meio de cultura (VAN ROOIJ et al. 2015), o zoósporo móvel do *Bd* se fixa tanto ao aparato bucal dos girinos quanto à pele dos adultos. A seguir ele penetra no estrato córneo e atinge a fase de zoosporângio. Esse zoosporângio pode produzir outros zoosporângios e/ou aumentar de tamanho e liberar mais zoósporos que poderão infectar outros animais (Figura 2) (BERGER et al., 2005).

**Figura 2** – Morfologia do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em meio de cultivo contendo triptona.



(A) Cultura do fungo *Bd* em triptona contendo zoosporângios; (B) A seta indica zoosporângio se abrindo para liberação dos zoósporos; (C) A seta indica zoosporângio vazio. Barra: 10 µm. 40X. Elaborada pela autora.

### 2.3 O sistema imune dos anfíbios e o uso de IgY

O sistema imune dos anfíbios é similar ao de aves e mamíferos, onde a interação do sistema imune inato ao adaptativo confere proteção contra agentes infecciosos (ROLLINS-SMITH, 2011; FERNÁNDEZ-LOPES et al., 2017). Nos anfíbios o sistema imune inato é composto por células fagocíticas e *natural killer*, leucócitos, peptídeos antimicrobianos e proteínas complementares, como a quitinase. O sistema imune adaptativo possui células apresentadoras de antígenos, complexo principal de histocompatibilidade (MHC), linfócitos B e T e imunoglobulinas (FERNÁNDEZ-LOPES et al., 2017).

Segundo Rollins-Smith, Barker e Davis (1997) durante a metamorfose ocorrem alterações no sistema imunológico dos girinos e as células de defesa, como os linfócitos, encontradas nos organismos jovens dão lugar a novas células no animal adulto. Além disso, esses autores propõem que o hormônio glicocorticoide,

produzido em grande quantidade durante o período da metamorfose, induz indiretamente a apoptose dos linfócitos dos girinos. Dessa forma os animais ficam mais susceptíveis à doenças e infecções por patógenos nessa fase.

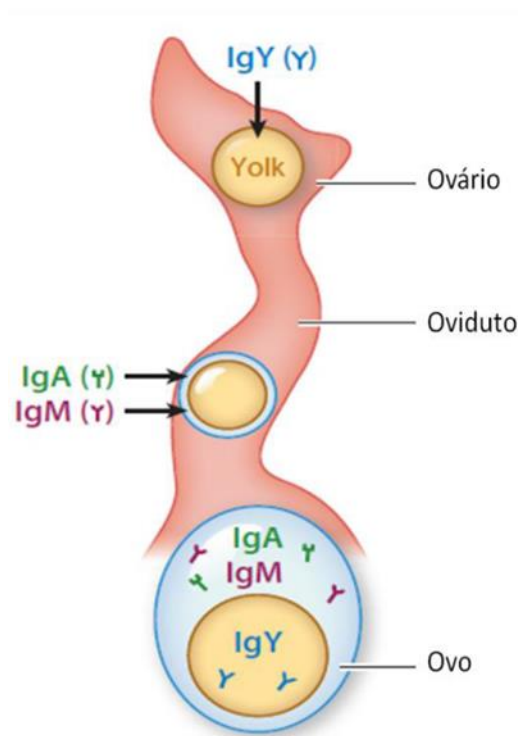
Além da imunossupressão natural, estudos relatam que animais acometidos pela quitridiomycose tem diminuição da expressão de genes relacionados ao sistema imune adquirido bem como seus níveis circulantes de anticorpos (RIBAS et al., 2009; ROSEMBLUM et al., 2009; ELLISON et al., 2014; VAN ROOIJ et al., 2015).

O uso de terapias com anticorpos podem dificultar a aderência de microrganismos patogênicos a seus tecidos alvos como pode ser observado em estudos realizados com *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Edwardsiella* (HATTA et al. 1994; CARLANDER, 2002; CHACANA et al., 2004; CHALGHOUM et al. 2009; FERNANDES et al., 2013), conferindo assim resistência a infecções.

A imunoglobulina Y já é muito utilizada em estudos envolvendo mamíferos por sua semelhança estrutural e funcional com a IgG. Porém as vantagens encontradas na produção e ação da mesma também viabilizam seu uso em pesquisa em diversos animais (CHACANA et al., 2004; FERNANDES et al., 2013). Os anticorpos da classe IgY podem ser utilizados de maneira alternativa aos anticorpos IgG de mamíferos devido ao fato de possuírem alta especificidade à antígenos bem como seus produtos. Assim estudos de imunodiagnóstico e imunoterapia podem ser explorados com o uso desta imunoglobulina (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; TAVARES et al., 2013; MUNHOZ et al., 2014).

As vantagens da IgY em relação aos anticorpos de mamíferos vão da sua produção a sua utilização. Na produção, como ocorre a transferência passiva dos anticorpos circulantes na corrente sanguínea da ave para o ovo (FIGURA 3) , não há a necessidade da realização de sangria ou mesmo o abate do animal para obtenção da IgY. Sua utilização é favorecida em relação a IgG pelo fato de não possuírem características que ativem o sistema complemento e reajam com fatores reumatóides, fatos que podem gerar falsos positivos (CHACANA et al., 2004; SILVA; TAMBOURGI, 2010; FERNANDES et al., 2013; MUNHOZ et al., 2014).

**Figura 3** – Distribuição das imunoglobulinas presentes no ovo das aves.



Fonte: Kovacs-Nolan; Mine, 2012.

Uma galinha produz em média 280 ovos por ano, levando em consideração que cada ovo possui cerca de 50 a 100 mg de IgY em sua gema, um único animal poderia produzir por ano de 14 a 28 gramas de anticorpo (CARLANDER, 2002; CHACANA et al., 2004; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; TAVARES, 2013).

## 2.4 Hematologia dos anfíbios

Os parâmetros hematológicos dos anfíbios podem variar de acordo com o ambiente em que vivem, temperatura, fotoperíodo, qualidade da água, dieta, densidade populacional, gênero, estádios larvais e idade dos adultos, dessa forma o estabelecimento de valores de referência para esses animais se torna muito difícil (CAMPBELL, 2015). Para análises em caso de enfermidades que se utilizam de dados hematológicos, são utilizadas comparações com outras pesquisas, outras

espécies de anfíbios bem como outros animais, como peixes, os quais possuem uma literatura mais ampla (CAMPBELL, 2015).

Os eritrócitos dos anfíbios são discos achatados nucleados, sendo nos girinos maiores e alongados e nos adultos menores mais arredondados. Nos anuros o tamanho médio é de 22 x 14  $\mu\text{m}$  (HASEBE et al., 1999; DAVIS, 2008). Em rãs o principal produtor de eritrócitos é fígado (TURNER, 1988; CAMPBELL, 2015).

Os leucócitos de anfíbios, assim como os da maioria dos mamíferos, são classificados como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Os primeiros leucócitos produzidos pela medula óssea dos anfíbios são os monócitos (TURNER, 1988). As células granulares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) dos anfíbios podem ser produzidas na medula óssea, rins e fígado (TURNER, 1988; CAMPBELL, 2015).

Os neutrófilos possuem núcleo segmentado e pequenos grânulos no citoplasma. Estão envolvidos na resposta inflamatória do animal, por sua atividade fagocítica. Os eosinófilos assim como os neutrófilos possuem o núcleo segmentado, porém com menos lóbulos, seu citoplasma possui grânulos maiores. Em alguns trabalhos os eosinófilos e neutrófilos podem aparecer descritos como heterófilos (TURNER, 1988; PFEIFFER; HAYWOOD; ASASHIMA, 1990; CAMPBELL, 2015). Eles também participam da resposta inflamatória, porém com menor intensidade que os neutrófilos.

Os basófilos possuem grânulos citoplasmáticos metacromáticos ligados à membrana, seu núcleo não é segmentado (TURNER, 1988), possuem função na resposta inflamatória, por meio da liberação de histaminas.

Os linfócitos são as células brancas mais encontradas no sangue da maioria das espécies. Eles são redondos com núcleo denso ocupando quase toda célula, alguns apresentam grânulos azurofílicos em seu citoplasma (TURNER, 1988; HASEBE et al., 1999; CAMPBELL, 2015). Assim como nos mamíferos podem ser classificados como linfócitos B, que produzem imunoglobulinas, e linfócitos T, que possuem papel de ação ou apresentação de antígenos (TURNER, 1988).

Os monócitos são células grandes, fagocíticas com núcleo denso, porém menos que os linfócitos, seu citoplasma pode estar espumoso ou conter vacúolos, e contém enzimas hidrolíticas (CAMPBELL, 2015).

Os trombócitos participam da coagulação sanguínea dos anfíbios, sua presença tem indício de discrasia ou alguma resposta regenerativa. São semelhantes aos linfócitos, pequenas com núcleo denso, porém com citoplasma mais abundante (CAMPBELL, 2015).

## **2.5 O fígado e a fosfatase**

O fígado é o local de processamento e armazenamento de nutrientes absorvidos no trato gastrintestinal e pela sua distribuição para os outros órgãos e tecidos, sendo responsável também pela eliminação de substâncias tóxicas ao organismo, por meio da bile, além da produção de proteínas plasmáticas (GUYTON; HALL, 2011; NELSON; COX, 2014), dessa forma uma disfunção de suas atividades poderá comprometer o desenvolvimento e a obtenção de imagens sadias e, conseqüentemente, a produção de carne (LANA et al., 2000).

Além disso, o fígado é o principal órgão responsável pela remoção de endotoxinas, realizando a detoxificação de lipopolissacarídeos (LPS) liberados das membranas bacterianas, que chegam aos hepatócitos por meio das células de Kupffer, onde são defosforilados por fosfatases alcalinas hepáticas, tornando-os atóxicos e excretando-os pela bile (HORI et al., 1998; TREON; THOMAS; BROITMAN, 1993).

Devido ao fato das fosfatases estarem presentes no fígado animal e estarem susceptíveis à várias patologias, elas apresentam um papel fundamental na proteção contra endotoxinas presentes nos animais e no metabolismo de nutrientes, indicando a fitossanidade do animal, reforçando a importância do estudo dessas enzimas no processo de metamorfose, a fim de gerar maiores informações sobre esse período de vida do animal, bem como o desenvolvimento de alternativas ao controle de microrganismos sem o auxílio de antibióticos.

### 3 OBJETIVOS

Produzir e purificar anticorpos da classe IgY específicos contra *Batrachochytrium dendrobatidis* extraídos de gemas de ovos de galinhas poedeiras (*White leghorn*) com base na imunização das mesmas com proteínas celulares de *B. dendrobatidis* e transferi-los passivamente para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no setor de Ranicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) sob responsabilidade da Professora Marta Verardino de Stéfani e do técnico Márcio Roberto Reche; no Laboratório de Ciências Avícolas da UNESP (LAVINESP) sob responsabilidade da Professora Nilva Kazue Sakomura e dos funcionários Robson Fernando dos Santos e Izildo Santana; no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal (UNESP) sob responsabilidade do Professor Everlon Cid Rigobelo; e no Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas (LEIA) sob responsabilidade do Professor João Martins Pizauro Junior, UNESP – Campus de Jaboticabal – São Paulo.

Os procedimentos com animais, bem como os protocolos de manipulação e sacrifício, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV (Protocolo nº16872/15) (ANEXO 1), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

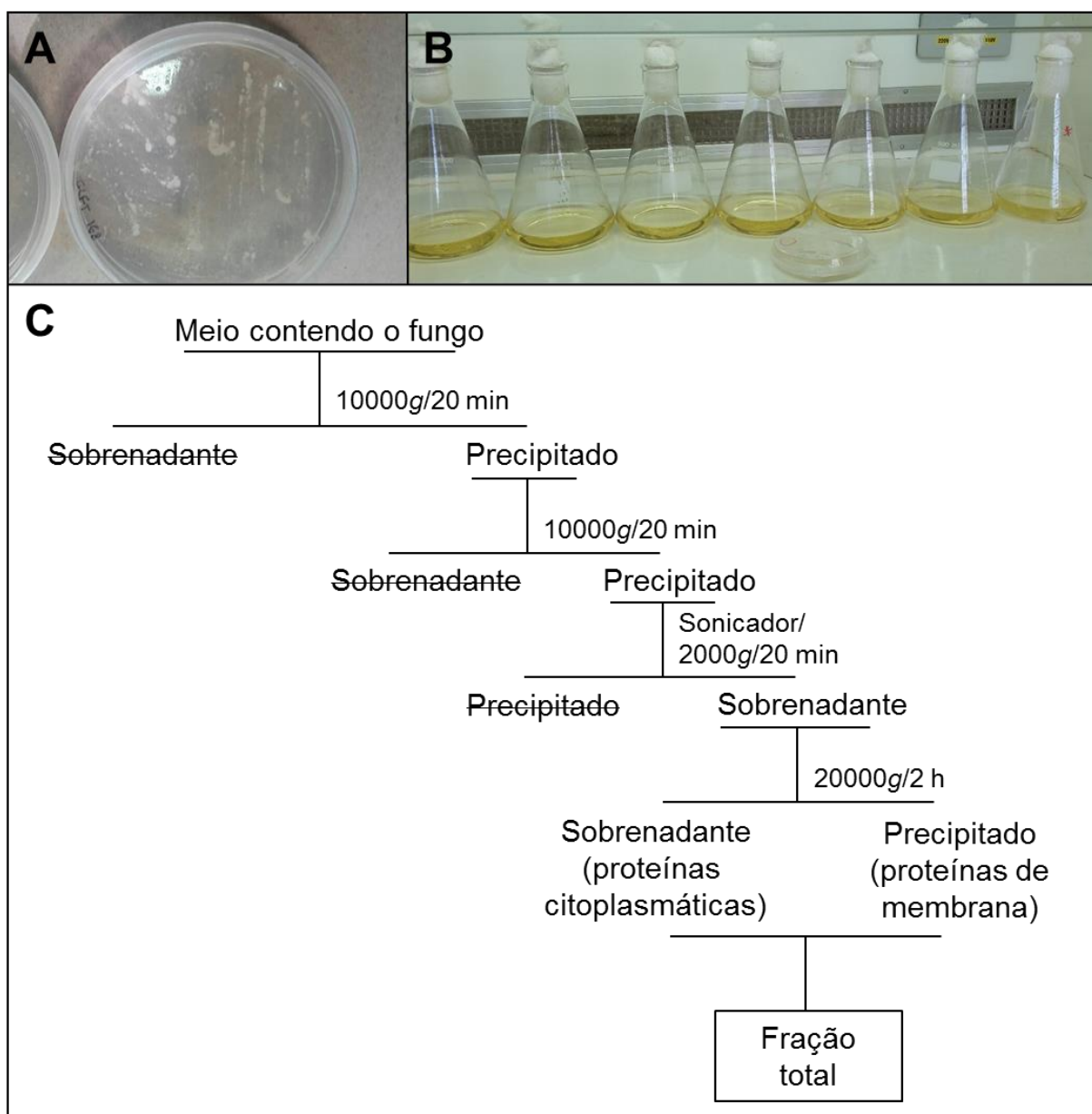
### 4.1 Isolamento das amostras de *B. dendrobatidis* e preparo do antígeno vacinal

As amostras de *B. dendrobatidis* (Cepa CLFT 168), placas contendo  $10^5$  a  $10^7$  zoósporos por placa, foram adquiridas do Laboratório de Quitridiomicose da UNICAMP (Figura 4A). Os fungos foram cultivados em triptona, segundo o protocolo desenvolvido por Longcore, Pessier e Nichols (1999) (Figura 4B).

Para obtenção do antígeno vacinal (Figura 4C) o meio contendo o fungo foi centrifugado a 10000 *g* durante 20 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 50 mL de PBS 150 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4 e centrifugado novamente. O novo precipitado foi ressuspenso em PBS, sonificado em sonicador Branson Sonifer 250 por 10 ciclos de 1 minuto em 20% de duty-cycle e em seguida centrifugado a 2000 *g* por 20 minutos. O precipitado contendo as células não rompidas foi descartado. O sobrenadante foi centrifugado a 20000 *g* por 2 horas. As alíquotas do sobrenadante (proteínas citoplasmáticas) e do precipitado (proteínas de

membrana) foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenados em freezer - 70°C.

**Figura 4** – Procedimento para a obtenção das frações proteicas do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*.



(A) Placa contendo cerca de  $10^5$  e  $10^7$  zoósporos de *Batrachochytrium dendrobatidis* cepa CLFT 168; (B) Cultivo do fungo em caldo 1% triptona; (C) Protocolo de obtenção das proteínas de membrana e citoplasmáticas do fungo. Elaborada pela autora.

## 4.2 Imunização e obtenção de amostras biológicas das aves (sangue e ovos)

Foram utilizadas 20 aves saudáveis da linhagem *White Leghorn* com idade de postura (60 semanas) mantidas em gaiolas individualizadas, em temperatura ambiente, com luminosidade natural, recebendo água potável à vontade e 110 g de ração de postura/ave/dia.

As aves foram observadas por um período de 50 dias, onde observou-se as condições de saúde bem como a postura das mesmas. As aves que obtiveram maior regularidade na postura foram dispostas no grupo experimental que recebeu as doses de antígeno.

As aves foram imunizadas com a fração total do antígeno *Bd*, por via intramuscular, no músculo peitoral, na concentração de 100 µg/ml de proteína total no volume de 200 µL diluída em PBS 150 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, e volume igual de adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, BR) na primeira inoculação e incompletos nas inoculações posteriores. Após a inoculação inicial, foram realizadas doses de reforço a cada 15 dias durante 90 dias.

As amostras de sangue foram coletadas da veia ulnar no dia zero (amostras pré-ímmunes) e a cada 15 dias após a primeira inoculação, e os ovos foram coletados diariamente durante 90 dias de imunização. As amostras foram utilizadas para determinar a produção de IgY, bem como sua afinidade, avidéz e especificidade anti-*Bd*. Os ovos coletados foram utilizados para a purificação de IgY de acordo com o procedimento descrito por Tong e colaboradores (2015) para as análises imunológicas.

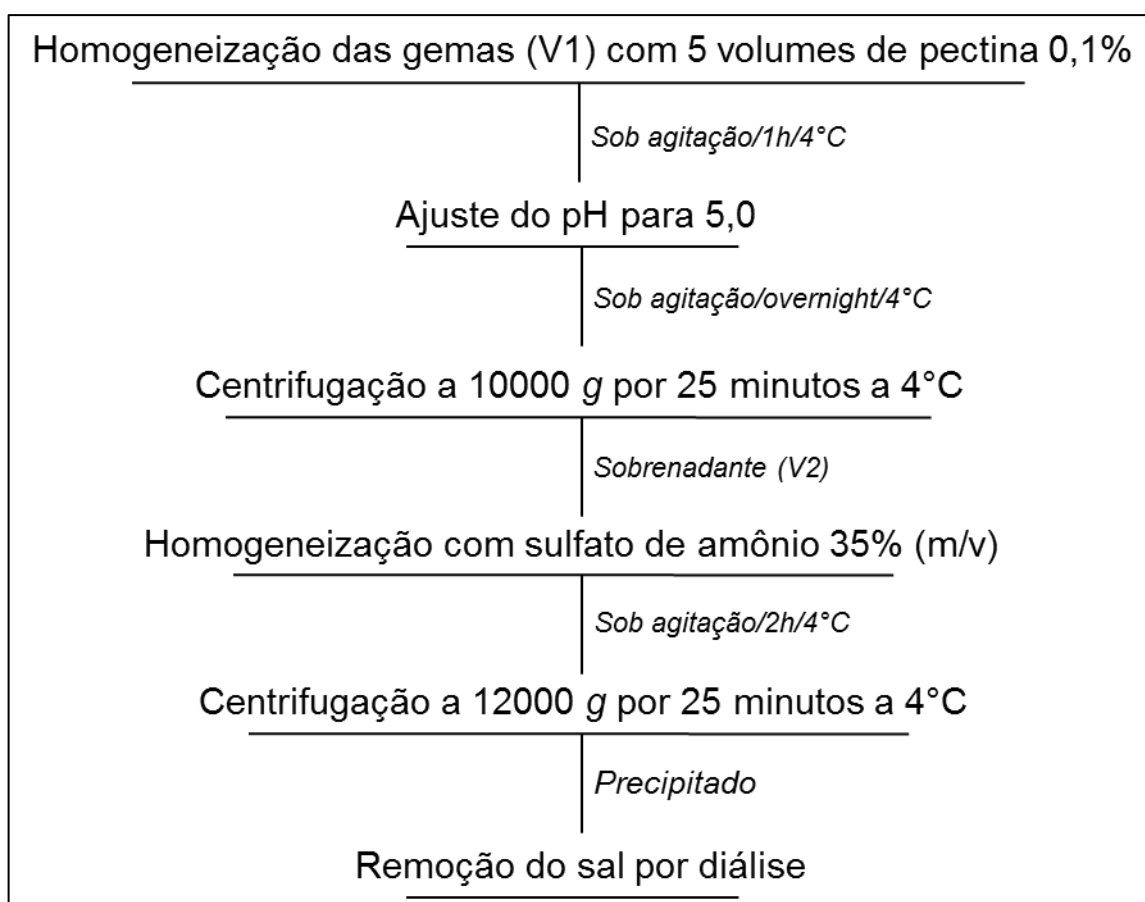
## 4.3 Purificação dos anticorpos IgY

Os ovos de cada momento da coleta foram utilizados para a purificação dos anticorpos de acordo com a metodologia descrita por Tong e colaboradores (2015) (Figura 5), onde, inicialmente as gemas foram separadas da clara e da membrana da gema. O *pool* de gemas foi pesado e convertido em ml (relação de 1 g = 1 ml), sendo diluído cinco vezes o seu volume pela adição de solução delipidante de pectina na concentração final de 0,1%, incubado por 1 hora a 4°C sob agitação.

Após esse período o pH do extrato foi ajustado para 5,0 e deixado *overnight* a 4°C sob agitação.

O extrato então foi centrifugado a 10000 g por 25 minutos, a 4°C. Após a centrifugação foi adicionado, em pequenas parcelas, ao sobrenadante, sulfato de amônio para uma concentração final de 35% (m/v), sob agitação durante 2 horas a 4°C. Novamente centrifugado a 12000 g, por 25 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em água destilada. Em seguida foi realizada diálise contra água para a remoção do sal da amostra.

**Figura 5** – Procedimento para a purificação dos anticorpos presentes nas gemas.



Fonte: Tong e colaboradores (2015), modificada pela autora.

#### 4.4 Dosagem da concentração de proteínas nas amostras

A concentração de proteína das frações total, citoplasmática e de membrana do fungo foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

O extrato purificado da gema foi determinado de acordo com o método descrito por Hartree (1972). Ambos utilizando-se de soroalbumina bovina fração V como padrão proteico.

A leitura da absorbância foi realizada a 595 e 650 nm, para o Bradford e Hartree, respectivamente. Os resultados foram expressos em miligrama de proteína por mililitro de solução.

#### 4.5 Análise eletroforética

As proteínas presentes em no extrato purificado das gemas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 9%, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

Para tanto, as amostras do extrato purificado foram tratadas com uma solução tampão de Tris.HCl 62 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,8 contendo β-mercaptoetanol 5%, SDS 4%, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0,02%, colocadas em fervura por 2 minutos e em seguida em de banho de gelo. Após o tratamento, 10 µg de proteína das amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida. Foi aplicado também padrão de referência Bio-Rad Precision Plus. O gel de empilhamento com concentração igual a 5% foi preparado com tampão Tris.HCl 130 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,8 contendo SDS adicionado de persulfato de amônio 10% e tetrametil etilenodiamina. O gel de separação foi preparado da mesma forma na concentração de 9%, em pH 8,8.

Os tamanhos das bandas foram determinados com o auxílio do programa Image Lab™ Software (Bio-Rad)

Foi utilizado o sistema de eletroforese Mini-Protean II (Bio-Rad) (10x10cm) conectado a uma fonte à qual foram aplicados 200 V/h.

#### 4.6 Cinética da produção e determinação da afinidade e avidéz da IgY anti-*Bd* no soro e na gema das aves imunizadas

A quantificação dos títulos séricos dos anticorpos IgY anti-*Bd* presentes no soro e na gema, foi realizada por meio da técnica de ELISA indireto de acordo com Andrade e colaboradores, 2013. Foi utilizado *pool* para quantificação nas gemas, enquanto que o soro foi analisado individualmente.

A sensibilização da microplaca de 96 poços fundo chato (Costar®) foi realizada com a adição 100 µl/poço da fração total do antígeno na concentração de 10 µg de proteína total por poço, *overnight* a 4°C. Em seguida foi realizado o bloqueio dos sítios não específicos com 250 µl/poço de PBS-leite 5% (150 mmol.L<sup>-1</sup>, ph 7,2, contendo 5% de leite em pó desnatado) por 2 horas em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-Tween-20 a 0,005%, 100 µl das amostras de soro e gema, diluídas em PBS na proporção de 1:100, foram adicionadas a cada poço e deixadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período a placa foi lavada por três vezes e foi adicionado a cada poço 100 µl do conjugado anti-IgY-peroxidase (HRP). Após mais quatro lavagens a reação se iniciou com a adição do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS), após 15 minutos a densidade óptica foi determinada em leitor multiskan a 640 nm.

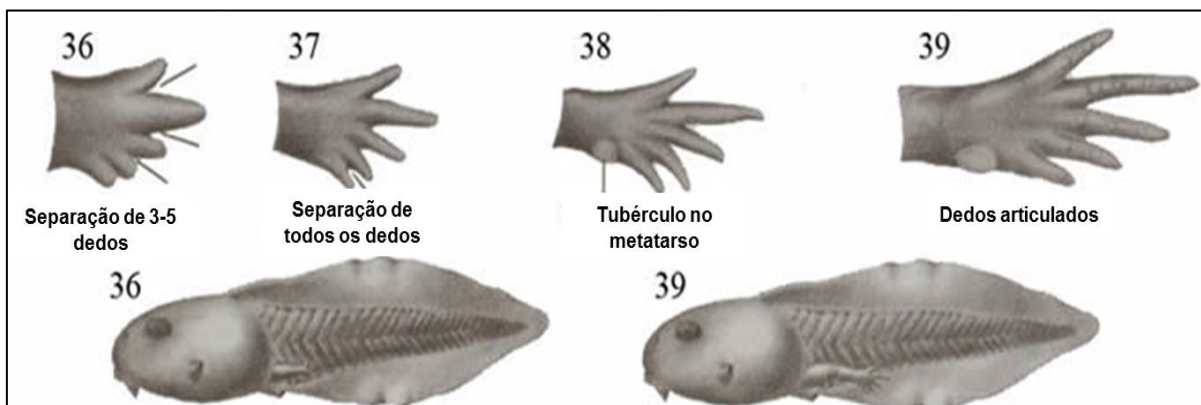
O ensaio imunoenzimático para avaliar a avidéz e afinidade dos anticorpos da classe IgY anti-*Bd* foi realizado pelo mesmo método, onde após a encubação das amostras, o cloreto de magnésio foi usado como agente caotrópico, que enfraquece as ligações inespecíficas. A reação foi determinada da mesma maneira descrita acima.

#### 4.7 Tratamentos, soroterapia e infecção experimental dos girinos de rã-touro

Os girinos de *L. catesbeianus* foram acondicionados em recipientes, onde a densidade utilizada foi de um girino por litro de água, com temperatura média de 25°C. Para alimentação foi fornecida ração comercial para peixes, constituída por 40% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo e 6% de matéria fibrosa, fornecida duas

vezes ao dia até aparente saciedade. Os animais foram classificados de acordo com Gosner (1960) (Figura 6).

**Figura 6** – Tabela de Gosner (1960), utilizada para classificar os girinos em estádios de desenvolvimento de 36 a 39 da metamorfose.



Fonte: Gosner, 1960 (modificada pela autora).

Os girinos foram divididos em 5 tratamentos, contendo 30 animais cada, acondicionados em potes plásticos na densidade de 1 girino por litro. Tratamento 1 (t1): controle negativo, os animais não foram imunizados ou desafiados; tratamento 2 (t2): controle positivo, os animais não foram imunizados, porém foram desafiados; tratamento 3 (t3): os animais foram imunizados 48 horas antes do desafio; tratamento 4 (t4): os animais foram imunizados após o desafio; tratamento 5 (t5): os animais foram imunizados e receberam uma dose de reforço antes do desafio.

As imunizações ocorrem de forma passiva através da permeabilidade da pele dos girinos de rã-touro, onde os animais foram submersos em solução composta de água mais a IgY purificada das gemas de galinhas na concentração de 3 mg de anticorpo/girino. Os animais permaneceram por 48 horas nessa solução e depois foram transferidos para água onde se prosseguiu com os desafios. Os grupos controles não foram submetidos a esse tratamento.

Os desafios foram realizados colocando os girinos dos tratamentos 2, 3, 4 e 5 em contato com o fungo, na concentração de  $10^5$  zoósporos por girino, determinados

por microscopia de luz em câmara de Neubauer, durante 36 horas. No controle negativo o animal foi colocado em contato com PBS 150 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, esterilizado, durante o mesmo período.

#### **4.8 Coleta de amostras biológicas para análise hematológicas e imunológicas dos girinos de rã-touro**

Os animais foram anestesiados em solução de benzocaína 0,1%. As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal, através da secção da cauda, com o auxílio de uma pipeta. As amostras de sangue foram utilizadas para análises hematológicas (Contagem de eritrócitos e leucócitos), determinação dos títulos séricos de anticorpos e realização de esfregaço sanguíneo.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos plásticos com tampa e mantidas em gelo. A contagem de eritrócitos no sangue (N/mm<sup>3</sup>) foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se solução fisiológica. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas por panótico rápido, em microscopia de luz comum. Foram contadas 100 células por lâmina, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse.

Após a coleta do sangue, os animais foram guilhotinados (CZESNIK et al., 2006) e seus fígados foram coletados e armazenados individualmente em tubos de criopreservação em freezer a -70°C, para análises posteriores.

Os fígados foram homogeneizados em um aparelho tipo turrax marca OMNI modelo GLH-2511, em tampão TRIS.HCl 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5 contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mmol.L<sup>-1</sup> e ZnCl<sub>2</sub> 1 µmol.L<sup>-1</sup>, na proporção de 1 g de tecido para 10 mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro, aliquoteado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70 °C.

#### 4.9 Determinação da atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina do extrato hepático

A atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina foi determinada descontinuamente, a 37°C, através da dosagem do fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do substrato, em tampão Ampol 105 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 9, contendo MgCl<sub>2</sub> 1 mmol.L<sup>-1</sup>, ZnCl<sub>2</sub> 20 µmol.L<sup>-1</sup> e LPS (2 mg/mL).

A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e interrompida após 1 hora pela adição de 100 µL de solução gelada de TCA 50% (p/v). Esse meio reacional foi centrifugado por 2 minutos a 10000 g. A dosagem do fósforo inorgânico presente no meio de reação foi efetuada de acordo com o método descrito por Pizauro, Ciancaglini e Leone (1995). Neste método, o fosfato inorgânico liberado no meio de reação é complexado pelo molibdato de amônio acidificado com ácido sulfúrico. O fosfomolibdato formado é imediatamente extraído com acetona, sob agitação contínua durante 15 segundos. O excesso de molibdato presente no meio de reação é complexado pelo citrato e, em seguida o fosfomolibdato formado é dosado espectrofotometricamente a 355 nm.

As determinações foram efetuadas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se hidrólise de substrato sempre inferior a 5%. Em cada experimento foram incluídos controles para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato.

A concentração de proteína do extrato hepático foi determinada de acordo com o método descrito por Hartree (1972), utilizando-se soroalbumina bovina fração V como padrão proteico.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato, nas condições de ensaio.

#### 4.10 Determinação da atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (PNFFásica) das fosfatases ácida e alcalina

A atividade PNFFásica das enzimas fosfatase ácida e alcalina foi determinada a 37°C, através da liberação do íon *p*-nitrofenolato ( $\epsilon = 17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , pH 13), a partir da hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (PNFF) 5 mmol.L<sup>-1</sup>, em um volume final de 1 mL, em pH ótimos previamente estabelecidos (SANTANA, 2015), em 410 nm em espectrofotômetro, da marca Hitachi®, modelo U-2000.

A reação foi iniciada pela adição de 80 µL de extrato enzimático ao meio de reação e interrompida pela adição de 1 mL de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. As determinações foram realizadas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se uma hidrólise de substrato sempre inferior a 5%, a fim de se garantir sempre a velocidade máxima da reação. Em cada experimento foram incluídos controles sem a reação enzimática para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de *p*-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato, nas condições de ensaio.

#### 4.11 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos em cada experimento foram comparados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade e a diferença entre as médias foi comparada pelo teste de Tukey no programa Statistica (Statsoft 7.0).

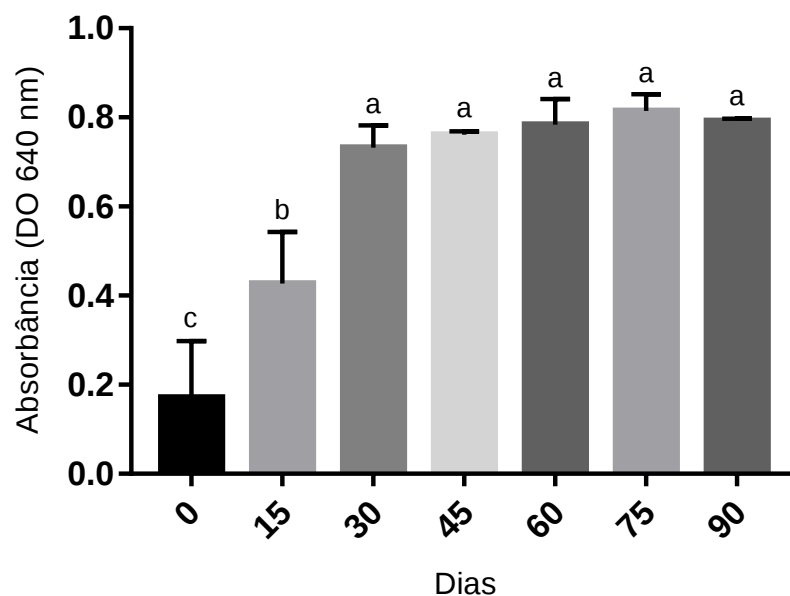
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de anticorpos da classe IgY extraídos de gema de ovos de galinhas é uma alternativa aos anticorpos obtidos de mamíferos, especialmente coelhos e ratos (GUIMARÃES; CORREIA; GAMA FILHO, 2008; MICHAEL et al., 2010; MUNHOZ et al., 2014), por ser um método de obtenção menos invasivo. Estes anticorpos podem ser utilizados em ensaios de imunodiagnósticos, imunoterapia e estudos de proteômica, além de fornecerem dados sobre infecções por patógenos (TAVARES et al., 2013).

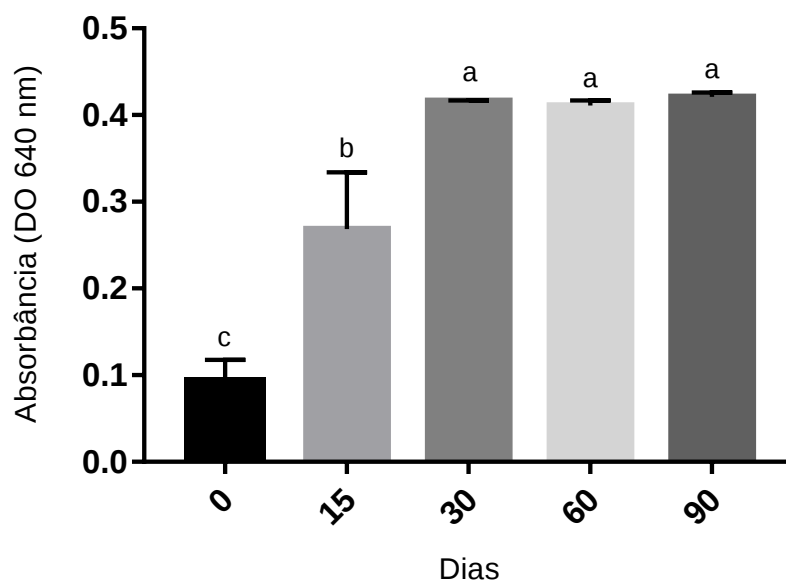
As cinéticas da produção e transferência dos anticorpos IgY anti-*Bd* no soro e purificados das gemas de galinhas poedeiras são apresentadas na figura 7 e 8, onde pode-se observar o aumento significativo da quantidade dos títulos de anticorpos ao decorrer do protocolo de imunização das aves, tanto para o soro quanto para a gema. Esse aumento pode ser observado a partir de 15 dias após a primeira imunização, atingindo os maiores valores em 30 dias, mantendo-se os títulos constantes até os 90 dias de experimento.

O aumento da produção dos anticorpos pela ave observados no presente trabalho (Figura 7), acompanham os resultados de outros autores que demonstraram que a partir de 30 dias do início do protocolo de imunização são alcançados os maiores níveis de IgY, mantendo alta concentração durante as sucessivas imunizações por aproximadamente 400 dias (ANDRADE et al., 2013; TAVARES et al., 2013; MUNHOZ et al., 2014).

**Figura 7** – Cinética da produção dos anticorpos IgY específicos no soro de galinhas poedeiras imunizadas com a fração total de *Bd* durante o período experimental (90 dias). Médias que apresentam letras diferentes se diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8** – Cinética da produção dos anticorpos IgY específicos na gema de galinhas poedeiras imunizadas com a fração total de *Bd* durante o período experimental (90 dias). Médias que apresentam letras minúsculas diferentes se diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

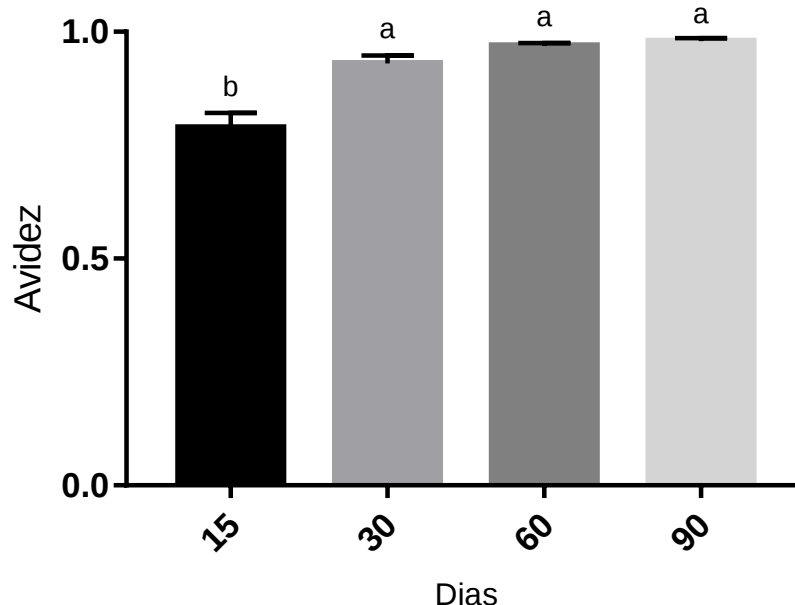


Nas aves a produção de anticorpos se inicia por volta do sexto dia de vida dos animais. Ao longo da vida da ave os linfócitos B maduros produzem os anticorpos que são secretados na corrente sanguínea (5 a 15 mg/ml), esses anticorpos produzidos são transferidos para os ovos durante a passagem pelo oviduto por meio de receptores presentes no saco vitelínico, e irão proteger os animais jovens (SILVA; TAMBOURGI, 2010; MUNHOZ et al., 2014).

Os níveis crescentes de anticorpos presentes no soro das aves imunizadas (Figura 7) demonstram a capacidade de reconhecimento do antígeno bem como a produção de IgY específicas anti-*Bd* pelas aves imunizadas. Também é possível observar que a transferência dos anticorpos para gema (Figura 8) acompanha os níveis séricos. Dessa forma a utilização de galinhas poedeiras para a obtenção de anticorpos anti-*Bd* é viável e vantajosa, uma vez que o sistema imune humoral desses animais respondeu de forma positiva à vacinação, além da produção de anticorpos, mg/ml, ser cerca de 12 vezes maior que a observada em coelho (KOUSTED et al. 2017) e poderem ser utilizados para a produção de IgY específicas, base para diversos outros estudos, sem que seja necessário o abate dos mesmos.

Houve também aumento na avidéz durante todo o protocolo de imunização (Figura 9). A avidéz está relacionada à capacidade dos anticorpos em reconhecerem e neutralizarem a adesão do patógeno a célula alvo do hospedeiro. Assim o aumento da avidéz da IgY anti-*Bd* pode ser importante na diminuição do potencial de fixação do fungo no estrato córneo dos anfíbios. O aumento da avidéz também foi observado por outros autores ao utilizarem diferentes antígenos para a obtenção de IgY específicas por imunização de galinhas (TAVARES et al., 2013; ANDRADE et al., 2013, MUNHOZ et al., 2014).

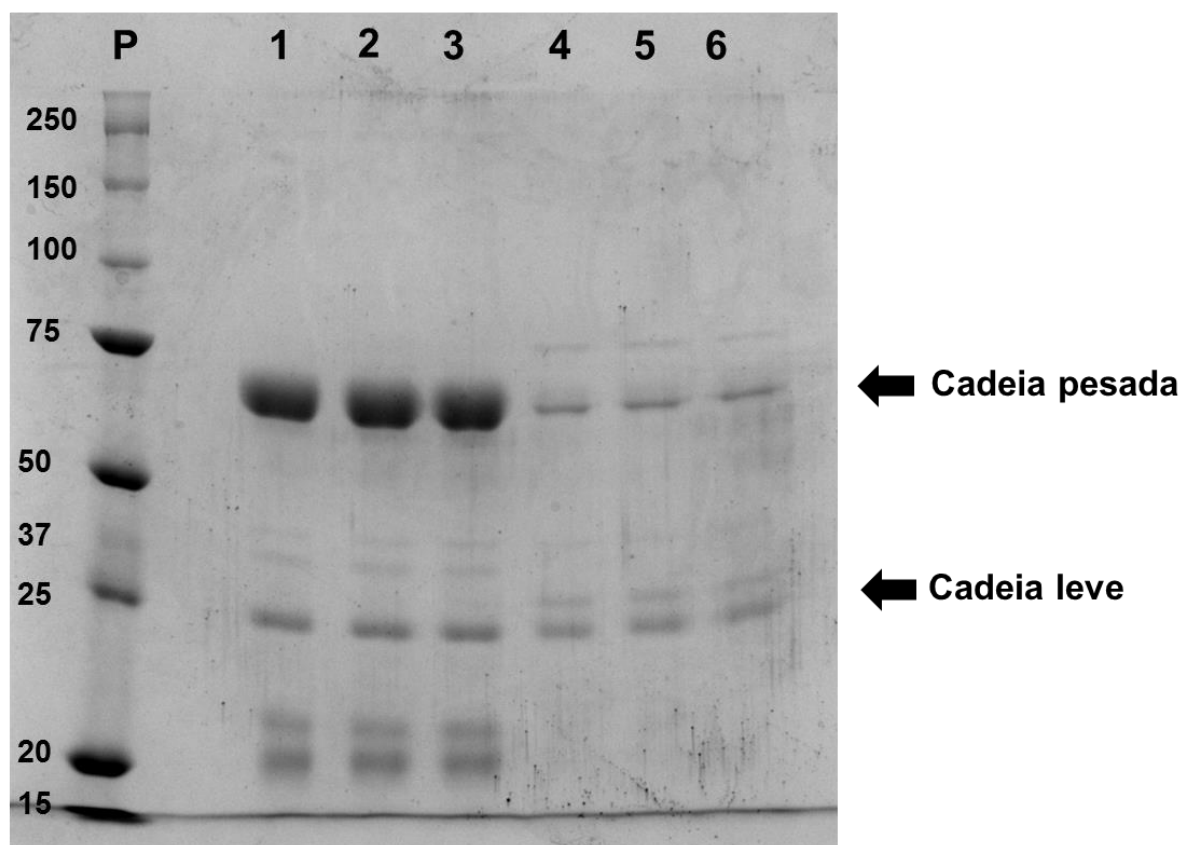
**Figura 9** – Potencial de avides dos anticorpos específicos produzidos no soro de galinhas poedeiras imunizadas com a fração total de *Bd*. Médias que apresentam letras minúsculas diferentes se diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



A purificação da IgY anti-*Bd* presente nas gemas das aves utilizando o protocolo de Tong e colaboradores (2015) foi eficiente. Este método utilizado é simples, de fácil reprodutibilidade, com boa recuperação de anticorpos e baixo custo, o que a torna vantajosa tanto para pesquisa quanto para indústria.

Os resultados observados no SDS-PAGE (Figura 10) das etapas de purificação da IgY, mostram claramente a presença de duas bandas que representam as cadeias leves e pesadas que compõem o anticorpo. Nas linhas 1, 2 e 3 observa-se a purificação parcial do extrato após o tratamento com uma solução de delipidação por pectina 0,1%, que proporcionou a remoção de glicoproteínas do *pool* de gemas. Após a precipitação com sulfato de amônio, ocorreu a remoção de vários contaminantes proteicos aumentando o grau de pureza ao final do protocolo (linhas 4, 5 e 6).

**Figura 10** – Eletroforese (SDS-PAGE 9%) do extrato purificado da gema. (P) Padrão Bio-Rad Precision Plus, (1, 2, 3) Amostras parcialmente purificadas de IgY e (4, 5, 6) Amostras purificadas.



Semelhante a IgG, a imunoglobulina Y apresenta duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. A cadeia pesada apresenta massa molecular de cerca de 66,6 kDa, enquanto que a cadeia leve é da ordem de 28,7 kDa. Como a IgY apresenta duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, a massa total do anticorpo purificado foi de aproximadamente 190,6 kDa. Estudos realizados com anticorpos da classe IgY mostram que sua massa molecular é cerca de 180 kDa (WARR et al., 1995; AKITA et al., 1998; BIZANOV et al., 2004; TAVARES et al., 2013).

A fixação do *Bd* no seu hospedeiro se concentra no aparato bucal dos girinos, onde se instala e se prolifera, interferindo na obtenção dos alimentos, através da desqueratinização da mesma; o fungo também se fixa na pele dos organismos, interferindo tanto nas trocas gasosas quanto no processo de osmorregulação, acarretando diminuição das concentrações dos íons sódio e potássio, levando a

parada cardíaca dos indivíduos (BAITCHMAN; PESSIER, 2013; VAN ROOIJ et al., 2015).

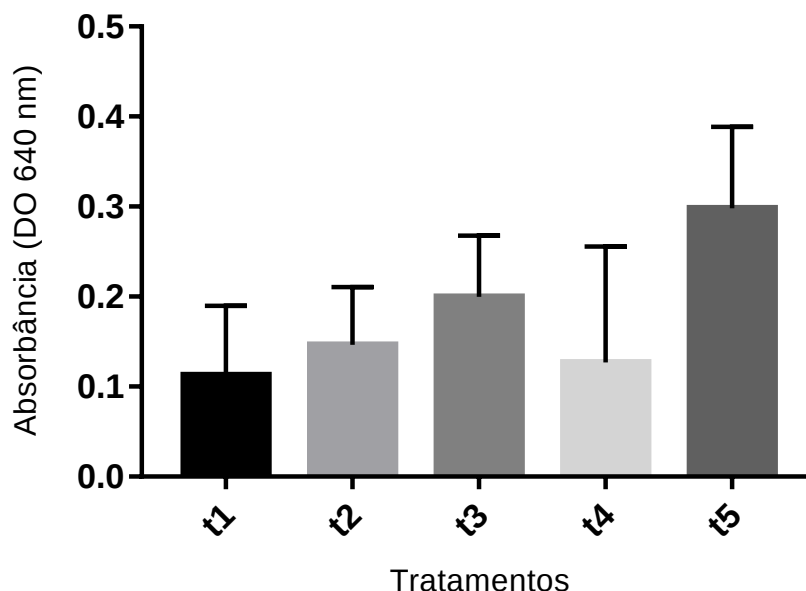
Neste sentido, ressalta-se o uso da imunoterapia com anticorpos extraídos dos ovos de galinhas poedeiras, os quais podem auxiliar tanto no tratamento de organismos já infectados, como em organismos que ainda não tenham tido contato com o fungo. Além disso, os anticorpos podem dificultar a fixação do fungo em organismos que apresentem resistência aos mesmos, diminuindo dessa forma a proliferação e dispersão da doença, além de diminuir o uso de antibióticos e por consequência a seleção de organismos resistentes. Importante também ressaltar que os ovos produzidos contendo anticorpos têm seu valor agregado.

A imunização passiva dos girinos foi realizada colocando os mesmo em um tanque contendo o anticorpo. As concentrações e os tempos de exposição foram os mesmos para todos os tratamentos. A transferência dos anticorpos para o soro dos girinos ocorreu de forma passiva através da permeabilidade de sua pele bem como pela ingestão da água dos tanques. Para o completo desenvolvimento de uma terapia envolvendo a utilização de anticorpos faz-se necessário estudos adicionais acerca da melhor concentração bem como o tempo de exposição a IgY.

Os títulos séricos de anticorpos foram avaliados individualmente em cada tratamento na imunização de girinos de rã-touro (Figura 11), os quais não apresentaram diferença estatística, isto possivelmente devido ao grau de variação individual entre o sistema imune destes animais, porém pode-se observar que todos os tratamentos tiveram um pequeno aumento em relação ao controle negativo (0,112).

O tratamento 5, que recebeu duas doses de anticorpos, o que possui o maior valor (0,298), já no tratamento 2, que não foi imunizado, esse aumento na concentração dos títulos séricos (0,146) pode ser explicado como uma resposta do próprio organismo frente ao patógeno. O baixo valor encontrado no tratamento 4 pode indicar que o fungo dificultou a absorção dos anticorpos pelos girinos, uma vez que este tratamento foi imunizado somente após o contato dos girinos com o fungo.

**Figura 11** - Produção média dos anticorpos da classe IgY específicos presentes no soro de girinos nos diferentes tratamentos.



t1 – controle negativo; t2 – controle positivo; t3 – Pré-imunizados-desafiados; t4 – Pré-desafiados-imunizados; t5 – Pré-imunizados-reforço-desafiados.

Para se fixar ao organismo do anfíbio, seja no estrato córneo seja no estrato granuloso, o *Bd* enfrenta algumas barreiras na primeira linha de defesa do organismo. A pele desses animais contém lisozimas (ZHAO et al., 2006), peptídeos antimicrobianos, capazes de inibir o crescimento do fungo (ROLLINS-SMITH et al., 2002; ROLLINS-SMITH, 2009), além de alguns anticorpos, como no caso da *Xenopus leavis* (RAMSEY et al., 2010), que se ligam ao fungo interferindo no estabelecimento da infecção.

Estudos com peptídeos antimicrobianos têm demonstrado que as espécies mais resistentes apresentam uma mistura dessas moléculas que inibem o crescimento do *Bd in vitro* (ROLLINS-SMITH et al., 2011), assim como as espécies mais susceptíveis possuem agentes antimicrobianos menos potentes (WOODHAMS et al., 2006).

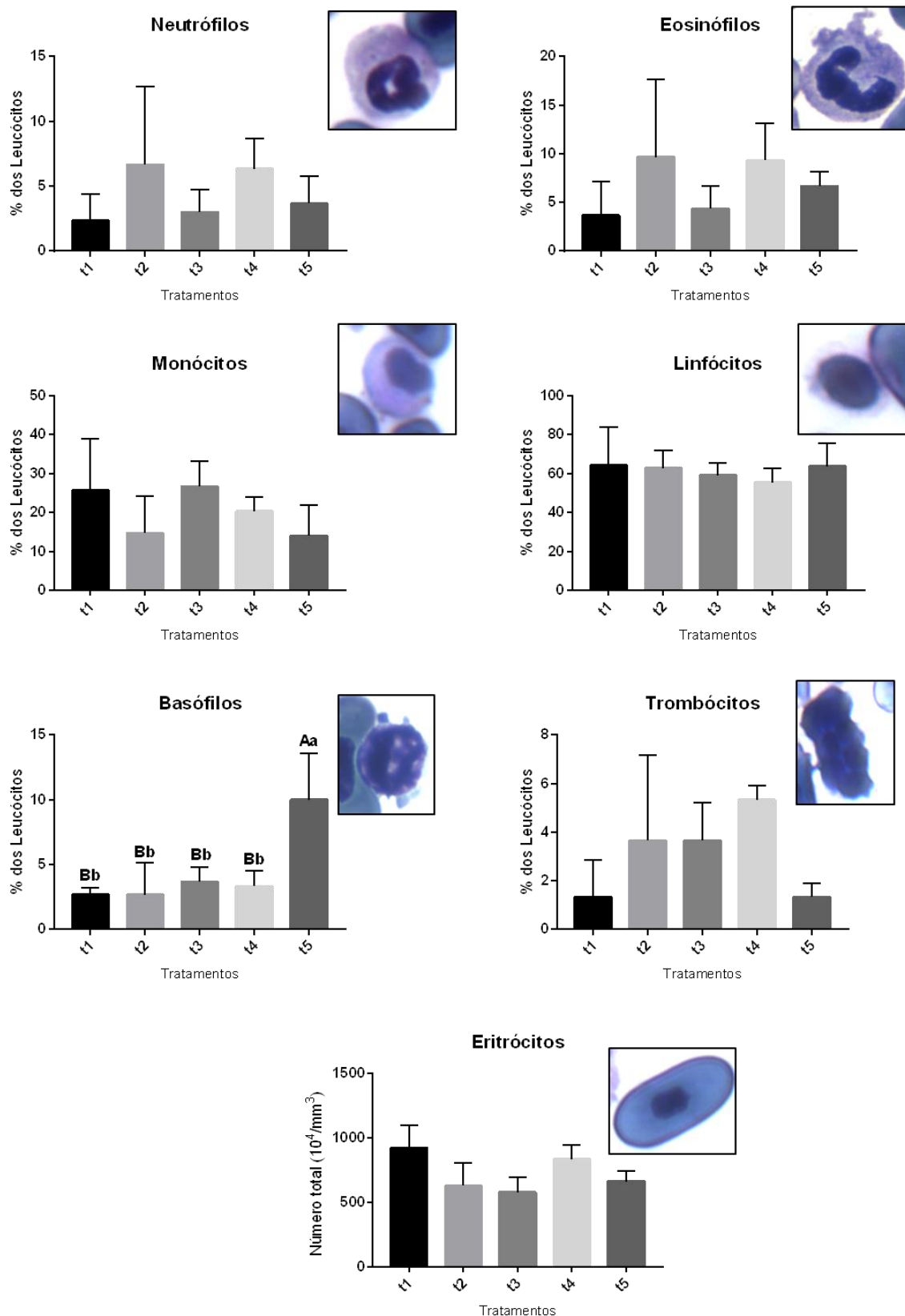
O papel do sistema imune adaptativo na quitridiomíose ainda não está perfeitamente esclarecido. Ramsey e colaboradores (2010) avaliaram que a

exposição de rãs à doses sub-letais de raios-X diminui a taxa leucocitária, aumentando a vulnerabilidade desses animais frente à infecção pelo *Bd*. Os mesmos autores ao vacinarem as rãs, intraperitonealmente, com o fungo desativado, observaram o aumento dos títulos séricos das imunoglobulinas Y e M. Estudos com *Bufo boreaus* e *Rana mucosa* também tiveram sucesso no aumento dos títulos séricos das imunoglobulinas através da imunização com o *Bd* inativo, porém sem aumentar a proteção contra o fungo (RAMSEY et al., 2010).

Esses estudos sugerem que uma maior produção de anticorpos séricos não seria suficiente para a proteção do organismo, uma vez que a instalação se dá na pele do animal (ROLLINS-SMITH et al., 2009; STICE; BRIGGS, 2010). Relacionado a isso, a liberação de substâncias solúveis pelo *Bd*, inibem a resposta imune mediada por células, uma vez que interrompem a proliferação dos linfócitos, induzindo-os a apoptose, além de diminuir a concentração dos anticorpos circulantes (ROLLINS-SMITH et al., 2011; FITES et al., 2013).

A avaliação das células sanguíneas pode ser observada na figura 12, onde foram descritas a presença de eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos e trombócitos. Essas células também foram encontradas por Duellman e Trueb (1986), Fenerick Jr, Stéfani e Martins (2006) e Fernández-Loras e colaboradores (2017) em seus estudos com rã-touro.

**Figura 12** – Número de eritrócitos; variação das porcentagens da contagem diferencial de leucócitos e morfologia hematológica (cloração: panótico rápido).



Os valores de eritrócitos não apresentaram diferença significativa ( $p>0,05$ ) (Figura 12). Porém as médias encontradas para os tratamentos que tiveram contato com o fungo foram menores aquelas encontradas no controle negativo ( $922,7 \times 10^4/\text{mm}^3$ ), resultados similares descritos por Baitchman e Pessier (2013) e Van Rooij e colaboradores (2015). Estes resultados mostram que a ligação do *Bd* a pele e boca do hospedeiro durante a infecção afeta as trocas gasosas do hospedeiro.

A análise de variância de neutrófilos, eosinófilos, monócitos, trombócitos e linfócitos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 12). Os valores médios das porcentagens de linfócitos variaram de 55,3 a 64,3%, resultados esses semelhantes aos encontrados por Fenerick Jr, Stéfani e Martins (2006) e Arauco, Stéfani e Nakaghi (2007). Os menores valores observados em relação ao controle negativo corroboram estudos que indicam que o fungo libera substâncias que induzem a apoptose dos linfócitos, além de diminuir a produção de anticorpos circulantes (RIBAS et al., 2009; ROSEMBLUM et al., 2009; ELLISON et al., 2014; VAN ROOIJ et al., 2015).

A porcentagem de neutrófilos variou de 2,3 a 6,6% e a de eosinófilos de 6,6 a 9,6%, esses resultados são semelhantes àqueles encontrados em outros estudos com *L. catesbeianus* (FENERICK JR; STÉFANI; MARTINS, 2006; ARAUCO; STÉFANI; NAKAGHI, 2007). Para ambas as células sanguíneas, pôde-se observar que nos tratamentos 2 e 4, que tiveram somente o contato com o fungo e que foram imunizados após o desafio, respectivamente, obtiveram os maiores valores, indicando assim que os neutrófilos e os eosinófilos podem ter papel importante na proteção dos organismos infectados.

Os trombócitos variaram de 1,3 a 5,3%, tendo valores maiores nos tratamentos 2, 3 e 4, indicando uma resposta regenerativa de algum tecido após a infecção. O mesmo não foi observado no tratamento 5 que obteve uma dose de reforço de anticorpos.

Os valores de monócitos encontrados (14,0 a 26,6%) foram superiores aqueles descritos por Fenerick Jr, Stéfani e Martins (2006), Arauco, Stéfani e Nakaghi (2007) e Rocha (2007), sendo menores quando comparados ao tratamento

1, podendo indicar que o fungo ataca essa célula que é uma das primeiras células da linha de defesa do organismo animal.

As medias do t5 para basófilos (10,0%) diferiram significativamente em relação aos grupos controles (t1: 2,6% e t2: 2,6), sugerindo uma possível resposta à dose de anticorpo utilizada, uma vez que nesse grupo foi realizado um reforço da imunização.

A mudança da composição leucocitária mostra que o tipo de defesa contra a instalação da infecção pelo fungo *Bd* pode não ser mediada somente pelas vias tradicionais, sendo necessários mais estudos bem como o desenvolvimento de um sistema com valores de referência para determinadas espécies, ambientes, estádios de desenvolvimentos e algumas patologias.

Não foram observadas alterações morfológicas nas células sanguíneas de *L. catesbeianus* nos tratamentos analisados durante a infecção experimental por *Bd* (Figura12).

A análise das atividades das fosfatases nos diferentes tratamentos mostrou que a imunização dos girinos e sua infecção pelo fungo não apresentou influência significativa sobre a ação das mesmas (Tabela 1).

A fosfatase alcalina hepática pode ser utilizada como indicador da sanidade animal, uma vez que é produzida e enviada a vários outros tecidos do organismo (McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979; MILLÁN, 2006), sendo também responsável por reações de detoxificação, defosforilando a porção do lipídeo A do LPS presentes em bactérias gram-negativas, bem como reaproveitamento de compostos fosforilados (PIZAURO et al., 1998), além, de nos girinos, participar ativamente da produção de células sanguíneas de defesa (CAMPBELL, 2015). A fosfatase ácida atua como um marcador de atividade lisossomal, atuando na digestão de macromoléculas que entram nas células, sendo importantes na proteção do organismo (SHIBKO; TAPPEL, 1963; CRUZ et al., 2012). Esses resultados sugerem que a soroterapia não apresentou efeito deletério sobre o metabolismo animal.

**Tabela 1** – Médias das atividades (U/mg) das fosfatases ácida e alcalina hepáticas de *L. catesbeianus* nos diferentes tratamentos.

| Tratamentos | Médias das atividades |                    |                   |
|-------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
|             | Fosfatase ácida       | Fosfatase alcalina |                   |
|             | <i>p</i> -NFFásica    | <i>p</i> -NFFásica | LPS-defosforilase |
| t1          | 91,13±17,14           | 92,02±6,26         | 60,69±2,38        |
| t2          | 69,13±3,74            | 83,31±5,74         | 45,98±5,98        |
| t3          | 76,34±7,18            | 77,46±9,36         | 52,04±2,34        |
| t4          | 65,64±4,15            | 82,66±9,30         | 46,84±3,83        |
| t5          | 90,26±12,25           | 93,93±14,2         | 57,97±4,97        |

t1 – controle negativo; t2 – controle positivo; t3 – pré-imunizados-desafiados; t4 – pré-desafiados-imunizados; t5 – pré-imunizados-reforço-desafiados.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que o fungo se fixa inicialmente na superfície do corpo do hospedeiro, aparato bucal e pele, espera-se que para o estabelecimento da infecção seja necessário que o *Bd* rompa as barreiras da primeira linha defesa, como peptídeos antimicrobianos, lisozimas e até mesmo metabólitos de outros microrganismos presentes na pele dos anfíbios. Essa infecção estimula o sistema imune adaptativo a produzir anticorpos, que dificultam a instalação do *Bd*. Porém alguns metabólitos secretados pelo fungo induzem a apoptose das células T e B, dificultando uma resposta satisfatória.

Dessa forma estudos em que o estímulo é voltado para o aumento das concentrações de anticorpos específicos anti-*Bd* diretamente na mucosa animal podem gerar resultados satisfatórios. Neste sentido, ressalta-se o uso da imunoterapia com anticorpos extraídos dos ovos de galinhas poedeiras, os quais podem auxiliar tanto no tratamento de organismos de forma preventiva.

## 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 Butiazaís 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: \_\_\_\_\_ THRALL, 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; PIZAULO 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.; MARCUSO, 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 bacteriophage 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.; HAESEBROUCK, 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.

## ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.



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



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "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*)", protocolo nº 16872/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de setembro de 2015.

|                     |                                                                                                          |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vigência do Projeto | 09/2015 a 08/2019                                                                                        |
| Espécie / Linhagem  | <i>Lithobates catesbeianus</i> e <i>White leghorn</i>                                                    |
| Nº de animais       | 300 e 20, respectivamente                                                                                |
| Peso / Idade        | ~ 5 g / 90 dias e ~ 2 Kg / 32 semanas, respectivamente                                                   |
| Sexo                | Machos e fêmeas / fêmeas, respectivamente                                                                |
| Origem              | <i>Lithobates catesbeianus</i> - Ranicultura / Caunesp / UNESP<br><i>White leghorn</i> - Aviário / UNESP |

Jaboticabal, 14 de setembro de 2015.

  
Profª Drª Paola Castro Moraes  
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n CEP 14884-000 - Jaboticabal - SP - Brasil  
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br