

DAYANNE CARLA FERNANDES

Produção de anticorpos IgY anti-*Aeromonas hydrophila* aplicados no imunodiagnóstico e imunoterapia em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)

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

Orientador: João Martins Pizauro Junior
Coorientador: Marco Antonio de Andrade Belo
Coorientador: Samir Issa Samara

Araraquara
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

F363p Fernandes, Dayanne Carla
Produção de anticorpos IgY anti-*Aeromonas hydrophila*
aplicados no imunodiagnóstico e imunoterapia em tilápias-do-
nilo (*Oreochromis niloticus*) / Dayanne Carla Fernandes. –
Araraquara : [s.n.], 2019
116 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: João Martins Pizauro Junior
Coorientador: Marco Antonio de Andrade Belo
Coorientador: Samir Issa Samara

1. Inflamação. 2. Imunoglobulinas. 3. Macrófagos.
4. Fagocitose. 5. Peixe. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Produção de anticorpos IgY anti- *Aeromonas hydrophila* aplicados no imunodiagnóstico e imunoterapia em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)"

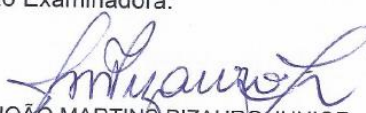
AUTORA: DAYANNE CARLA FERNANDES

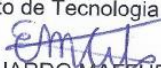
ORIENTADOR: JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR

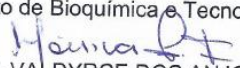
COORIENTADOR: SAMIR ISSA SAMARA

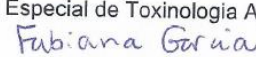
COORIENTADOR: MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

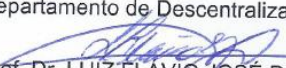
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Dr.^a MONICA VALDYRCE DOS ANJOS LOPES FERREIRA
Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada / Instituto Butantan - São Paulo


Prof.^a Dr.^a FABIANA GARCIA
Departamento de Descentralização do Desenvolvimento / Instituto de Pesca - APTA - Votuporanga


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

Araraquara, 09 de setembro de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Dayanne Carla Fernandes

Nome em citações bibliográficas: FERNANDES, D. C.; FERNANDES, DAYANNE, C.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Vila Industrial, CEP: 14884900 – Jaboticabal, SP – Brasil. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia. Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas – LEIA.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Bacharelado em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Norte do Paraná - Câmpus Luiz Meneghel Bandeirantes/ PR (06/2008 – 06/2013).

Mestrado em Medicina Veterinária área Patologia Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/ UNESP Jaboticabal/ SP (08/2013 – 10/2015).

Doutorado em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IQ/UNESP Araraquara/ SP (02/2016 – 09/2019).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

1. Curso de curta duração em 4º Curso de Manejo de Crias - Agregando Boas Práticas à Produção Animal. (Carga horária: 12h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/ SP, Brasil, 2018.

2. Curso de curta duração em Produzindo Tilápias - Da Reprodução à Terminação. (Carga horária: 16h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/ SP, Brasil, 2018.

3. Curso de curta duração em Técnicas de PCR em tempo real. (Carga horária: 12h). Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCFAR - UNESP/ SP, Brasil, 2016.

4. Curso de curta duração em Atualização em Leishmaniose: novidades e desafios! (Carga horária: 2h). Ensino e qualificação superior, EQUALIS, Brasil, 2016.
5. Curso de curta duração em Farmacologia Veterinária. (Carga horária: 6h). Ensino e qualificação superior, EQUALIS, Brasil, 2016.
6. Curso de curta duração em Células Tronco: Avanço ou Ilusão? (Carga horária: 2h). Ensino e qualificação superior, EQUALIS, Brasil, 2016.
7. Extensão Universitária em Biologia Marinha. (Carga horária: 40h). Universidade Estadual Paulista câmpus Botucatu, UNESP, Brasil, 2010.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1. Estágio Docência realizado no curso de Zootecnia, Disciplina: Bioquímica Geral. 1º semestre de 2018. Carga horária: 45 horas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/ FCAV/SP.
2. Estágio Docência realizado no curso de Zootecnia, Disciplina: Bioquímica Animal. 2º semestre de 2017. Carga horária: 45 horas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/ FCAV/ SP.
3. Treinamento Técnico em Boas Práticas e Técnica em Cultivo de Células Animais no Laboratório de Virose da Reprodução/ Departamento de Medicina Preventiva. Período: 06/2016 - 06/2017. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/ FCAV/ SP.
4. Estágio curricular obrigatório em Patologia Animal. Carga horária de 240 horas, 02/2013 - 04/2013. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/ FCAV/ SP.
5. Estágio curricular obrigatório realizado no laboratório AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ) do Departamento de Aquicultura, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC/ SC, Carga horária: 200.

6. Estágio em Patologia Animal. Carga horária de 120 horas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/ FCAV/ SP.

7. Bolsista de iniciação Científica, UENP/Fundação Araucária, no período de 1º de agosto de 2012 a 31 de julho de 2013. Projeto de pesquisa intitulado “Memória imunológica e resposta imune humoral e celular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Imunizadas com hemácia de carneiro” desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia de Peixes- UENP- Campus Luiz Meneghel – Bandeirantes/ PR.

8. Bolsista de iniciação Científica, UENP/Fundação Araucária, no período de 1º de agosto de 2011 a 31 de julho de 2012. Com o Projeto de pesquisa intitulado “Resposta Imune Humoral em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Imunizadas com Hemácia de Carneiro” desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia de Peixes- UENP- Campus Luiz Meneghel – Bandeirantes/ PR.

9. Estágio no Laboratório de Imunopatologia de Peixes (LIPPE), UENP- Campus Luiz Meneghel – Bandeirantes/ PR. Carga horária de 812 horas (03/2011 - 12/2012).

10. Estágio no Plantão do Hospital Veterinário de Pequenos Animais e Grandes Animais, UENP- Campus Luiz Meneghel – Bandeirantes/ PR. Carga horária de 114 horas, 03/2011 - 06/2011.

11. Estágio no Hospital Veterinário na Clínica Médica de Pequenos Animais, UENP- Campus Luiz Meneghel – Bandeirantes/ PR. Carga horária de 233 horas, 01/2011 - 02/2011.

12. Estágio na área de Suinocultura, UENP - Campus Luiz Meneghel – Bandeirantes/ PR. Carga horária de 60 horas, 08/2008 - 12/2008.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em Periódicos

1. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; MEDEIROS, A. S. R.; BELO, M. A. A.; SAMARA, S. I.; COSTA, P. I.; PIZAURO, J. M. Phagolysosomal activity of macrophages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected in vitro by *Aeromonas hydrophila*: Infection and immunotherapy. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 87, p. 51-61, 2019.
2. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; FUNNICELLI, M. I. G.; FERNANDES, C. C.; CHARLIE-SILVA, I.; BELO, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Immunoglobulin Y in the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 500, p. 576-575, 2019.
3. CHARLIE-SILVA, I.; KLEIN, A.; GOMES, J. M. M.; PRADO, E. J. R.; MORAES, A. C.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; FAGLIARI, J.; CORRÊA JUNIOR, J. D.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CONCEIÇÃO, K.; MANRIQUE, W. G.; BELO, M. A. A. Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1-13, 2019.
4. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; YUNIS-AGUINAGA, J.; CLAUDIANO, G. S.; SHIMADA, M. T.; SALVADOR, R.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Characterization and production of antibodies anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: therapeutic and prophylactic use in *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, v. 513, 734424, 2019.
5. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; BALDASSI, A. C.; MANRIQUE, W. G.; SILVA, I. C.; MEDEIROS, A. S. R.; BELO, M. A. A.; BALBUENA, T. S.; SAMARA, S. I.; PIZAURO, J. M. Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 76, p. 153-160, 2018.

6. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; ROSOLEM, M.C.; MARINHO-NETO, F. A.; PIZAULO JUNIOR, J. M.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Ativação de células de memória na produção de anticorpos e na expressão de células IgM positivas no baço de tilápias-do-nilo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, p. 205-212, 2018.
7. YUNIS-AGUINAGA, J.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; MARINHO-NETO, F. A.; FERNANDES, J. B. K.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Dietary camu camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 58, p. 284-291, 2016.
8. FAGUNDES, L. C.; ETO, F. S.; MARCUSO, P. F.; **FERNANDES, D. C.**; MARINHO-NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; LOYOLA, W.; FREITAS, J. C.; SALVADOR, R. Transferência passiva de soro hiperimune anti-*Streptococcus agalactiae* e seu efeito profilático em tilápias-do-nilo infectadas experimentalmente: sobrevivência e títulos de anticorpos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, p. 379-386, 2016.
9. MARCUSO, P. F.; AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MELLO, H.; MARINHO NETO, F. A.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Influence of temperature on *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 52, p. 57-62, 2015.
10. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; MORAES, R. E. J.; PIZAULO JUNIOR, J. M.; MORAES, F. R. Histologia dos órgãos e tecidos linfóides de galinhas poedeiras White Leghorn. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 110, p. 74-78, 2015.
11. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; VIEIRA, F. C. F.; SHIMADA, MARINA T.; SILVA, THIAGO F. A.; SOUZA, ELAINE C.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E. ; MORAES, F. R. Humoral immune response in *Oreochromis niloticus*: modified direct agglutination test. *Comparative Clinical Pathology*, v. 24, p. 617-623, 2015.

12. MARCUSO, P. F.; NOVO, S. M. F.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; PEIXOTO, E. C. T. M.; SALVADOR, R. Sources of contamination and contagion *Prototheca zopfii* in dairy property. Archives of Veterinary Science, v. 20, p. 16-20, 2015.
13. ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; **FERNANDES, D. C.**; MARCUSO, P. F.; SALVADOR, R. Biologia do Sistema Imune dos Teleósteos. Revista Científica da Faculdade Dom Bosco de Cornélio Procopio, do Estado do Paraná, v. 1, p. 2-21, 2014.
14. MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; SALVADOR, R. Imunologia das Vacinas Bacterianas em Teleósteos: Revisão. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 13, p. 50-57, 2013.
15. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; LOUREIRO, B. A. Biologia do Sistema Imune de Aves: Revisão. Ensaios e Ciência (Campo Grande. Impresso), v. 17, p. 131-140, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

Resumos expandidos

1. MORAES, A. C.; KOTZENT, S.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; PRADO, E. J. R.; BELO, M. A. A. Determinação da concentração inibitória mínima e bactericida da amoxicilina para bactéria *S. agalactiae* isolada de tilápia do Nilo. In: 1º Semana Acadêmica de Medicina Veterinária (1º SEMAVE), Rolim de Moura. 1º Semana Acadêmica de Medicina Veterinária. Jaboticabal: Ars Veterinária, v. 34, p. 168-205, 2018.
2. MARINHO NETO, F. A.; TAMEHIRO, C. Y.; SALVADOR, R.; SOUZA, F. P.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; PORTO, E. P. Detecção de anticorpos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas contra *Streptococcus agalactiae* administrado por diferentes vias. In: XXIII Encontro Anual de Iniciação Científica, Londrina, 2014.
3. CLAUDIANO, G. S.; **FERNANDES, D. C.**; MORAES, R. E. J.; MORAES, F. R. Imunomodulação pela *Saccharomyces cerevisiae* e carboquelato de cromo na inflamação aguda em tilápias do Nilo. In: Congresso Mineiro de Engenharia e Inovação Tecnológica, Patos de Minas – MG, 2013.

4. TAMEHIRO, C. Y.; MARINHO NETO, F. A.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F. SALVADOR, R. Importância em Monitorar a Sanidade das Aves, e a Interpretação dos Resultados por meio de Elisa Indireto. In: Conferência FACTA, 2013.
5. SANTOS, M. A. P.; MARINHO NETO, F. A.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; SALVADOR, R. Dosagem de anticorpos séricos em muco cutâneo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a estímulo vacinal bacteriano de *Streptococcus agalactiae*. In: 22º EAIC (Encontro Anual de iniciação Científica), Foz do Iguaçu-PR, 2013.
6. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; MARINHO NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSSO, P. F.; SHIMADA, M. T.; SALVADOR, R. Memória imunológica em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com hemácia de carneiro. In: 22º EAIC Encontro Anual de Iniciação Científica, Foz do Iguaçu, 2013.
7. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; MARINHO NETO, F. A.; SANTOS, M. A. P.; SALVADOR, R. Memória imunológica em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com hemácia de carneiro. In: III Jornada de iniciação da UENP, Cornélio Procopio-PR, 2013.
8. MARINHO NETO, F. A.; TAMEHIRO, C. Y. ; **FERNANDES, D. C.**; SANTOS, M. A. P.; SALVADOR, R. ; ETO, S. F. Memória imunológica em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com *Streptococcus agalactiae*. In: 22º Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC, Foz do Iguaçu-PR, 2013.
9. MARINHO NETO, F. A.; TAMEHIRO, C. Y.; SANTOS, M. A. P.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; SALVADOR, R. Memória imunológica em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com *Streptococcus agalactiae*. In: III Jornada de Iniciação Científica da UENP, Cornélio Procopio-PR, 2013.
10. SANTOS, M. A. P.; MARINHO NETO, F. A.; **FERNANDES, D. C.**; MARTINS, I. M.; OMURA, J.; ETO, S. F.; SALVADOR, R.; TAMEHIRO, C. Y. Dosagem de anticorpos séricos em muco cutâneo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a estímulo vacinal bacteriano de *Streptococcus agalactiae*. In: III Jornada de Iniciação Científica da Uenp, Cornélio Procopio, 2013.

11. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; MARINHO NETO, F. A.; TAMEHIRO, C. Y.; SALVADOR, R. Avaliação da Dinâmica da Resposta Imune Humoral em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Imunizadas com Hemácias de Carneiro. In: 21º Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC 21º, Maringá-PR, 2012.
12. **FERNANDES, D. C.**; SALVADOR, R.; ETO, S. F.; MARINHO NETO, F. A.; SANTOS, M. A. P. Dinâmica da Resposta Imune Humoral em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Imunizadas com Hemácias de Carneiro. In: II Jornada de Iniciação Científica da UENP, 2012.
13. MARINHO NETO, F. A.; SANTOS, M. A. P.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; SALVADOR, R.; CARANDINA, L. Resposta Imune Humoral de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Imunizadas com Antígenos de *Streptococcus Agalactiae*. In: 21º Encontro de Iniciação Científica - 21º EAIC, Maringá-PR, 2012.
14. MARINHO NETO, F. A.; SANTOS, M. A. P.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; SALVADOR, R. Resposta Imune Humoral de Tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) Imunizadas com Antígenos de *Streptococcus Agalactiae*. In: II Jornada de Iniciação Científica da UENP - II JOIC, Bandeirantes - PR, 2012.

Resumos simples

1. ARACATI, M. F.; OLIVEIRA, S. L.; RODRIGUES, L. F.; **FERNANDES, D. C.**; FARIAS, T.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; BELO, M. A. A. Zafirlukast, Cys-LTRs antagonist, modulate the acute inflammatory response of tilapias, *Oreochromis niloticus*, induced by bacterins of *Aeromonas hydrophila*. In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Rio de Janeiro. XV ENBRAPOA, 2018.
2. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; COLOSIO, R. R.; MEDEIROS, A. S. R.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; OLIVEIRA, G. M.; GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; LEITÃO, N. J.; SAMARA, S. I.; BELO, M. A. A.; PIZAULO JUNIOR, J. M. Validation of IgY in diagnosis of endocarditis and bacterial meningitis caused by *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia. In: 46 th Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Águas de Lindóia. 46º SBBQ, 2017.

3. OLIVEIRA, G. M.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; MEDEIROS, A. S. R.; GONCALVES, A. M.; LEITÃO, N. J.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; SAMARA, S. I.; BELO, M. A. A.; PIZAURO JUNIOR, J. M. Opsonization and activation of the classic complement pathway of Nile tilapia on the neutralization of *Streptococcus agalactiae* in vitro. In: 46 th Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Águas de Lindóia. 46° SBBq, 2017.
4. ARACATI, M. F.; OLIVEIRA, S. L.; RODRIGUES, L. F.; MORAES, A. C.; FARIAS, T. H. V.; PRADRO, E. J. R.; **FERNANDES, D. C.**; BELO, M. A. A. B. Alterações proteicas durante estímulo infeccioso por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo. In: III Simpósio de Bem-Estar e Comportamento Animal, Descalvado, 2017.
5. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; GONCALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO JUNIOR, J. M. Método Imunoenzimático de ELISA Utilizando IgY para a Detecção de Proteínas Microbianas de Células Bacterianas de *Streptococcus agalactiae*. In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, Jaboticabal. 1º CBMAAA, 2016.
6. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA, G. M.; PIZAURO JUNIOR, J. M. Produção e Purificação de Anticorpos IgY anti-*Aeromonas hydrophila*: Padronização para o Ensaio de Dot Blot. In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, Jaboticabal. 1ºCBMAAA, 2016.
7. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA, G. M.; PIZAURO JUNIOR, J. M. Uso da IgY anti-*Lactococcus lactis* e sua aplicação como biomolécula marcadora no ensaio de Dot Blot. In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, Jaboticabal. 1º CBMAAA, 2016.
8. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA, G. M.; PIZAURO JUNIOR, J. M. Imunoensaio para a detecção de células bacterianas neutralizadas in vivo por anticorpos: estudo farmacocinético e farmacodinâmico durante o percurso na soroterapia. In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, Jaboticabal. 1º CBMAAA, 2016.

9. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; OLIVEIRA, G. M.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; PIZAULO JUNIOR, J. M. Padronização do método de ELISA indireto para a detecção de proteínas bacterianas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. In: I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, Jaboticabal, 2016.
10. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; PIZAULO JUNIOR, J. M. Uso de anticorpo policlonal IgY-FITC em imunofluorescência direta. In: VIII Congresso Regional de Histotecnologia - IBILCE/ UNESP, São José do Rio Preto, 2016.
11. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; PIZAULO JUNIOR, J. M. Técnica de imuno histoquímica (IHC) para a detecção de anticorpos neutralizados á células bacterianas durante o percurso da soroterapia. In: VIII Congresso Regional de Histotecnologia - IBILCE/ UNESP, São José do Rio Preto, 2016.
12. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; PIZAULO JUNIOR, J. M. Método de imunofluorescência para a detecção de *Streptococcus agalactiae* em tecido cerebral parafinizado de tilápias do Nilo utilizando a imunoglobulina Y. In: VIII Congresso Regional de Histotecnologia - IBILCE/ UNESP, São José do Rio Preto, 2016.
13. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; PIZAULO JUNIOR, J. M. Técnica de imuno-histoquímica para a avaliação da farmacocinética de anticorpos durante a soroterapia de peixes teleósteos como modelo experimental. In: VIII Congresso Regional de Histotecnologia - IBILCE/ UNESP, São José do Rio Preto, 2016.
14. AGUINAGA, J. Y.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; MARTINS, I. M.; MALVESTIO, Dietary Camu Camu *Myrciaria dubia* Enhances Immunological Response in Nile Tilapia In: Fenacam 2015 & Lacqua 2015 International Conference & Exposition, 2015.
15. MORAES, F. R.; CLAUDIANO, G. S.; ETO, S. F.; MARINHO NETO, F. A.; **FERNANDES, D. C.**; AGUINAGA, J. Y.; MIRANDA, R. L.; MUNDIM, A. V.; MACHADO, C. M. M.; MORAES, R. E. J. Immune Endocrine Depression in Sepsis of *Piaractus mesopotamicus* Induced by *Aeromonas hydrophila*. Fenacam 2015 & Lacqua 2015 International Conference & Exposition, Fortaleza, 2015.

16. MORAES, F. R.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; **FERNANDES, D. C.**; GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; BALBUENA, T. S.; MORAES, R.E.J; SALVADOR, R.; AGUINAGA, J. Y.; PIZAURO JUNIOR, J. M. Production of IgY anti-*Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and its therapeutic and prophylactic use in *Rachycentron canadum* In: Fenacam 2015 & Lacqua International, 2015.
17. MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MARINHO NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; AGUINAGA, J. Y.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Alterações hematológicas de tilápias do Nilo vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*. I Simpósio Científico do Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, Jaboticabal, SP, 2014.
18. MARCUSO, PAULO F.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MARINHO NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; AGUINAGA, J. Y.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Alterações nas concentrações de proteínas totais plasmáticas, albumina e globulinas séricas de tilápias do Nilo vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*. I Simpósio Científico do Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, Jaboticabal, SP, 2014.
19. SILVA, T. F.; PETRILLO, T. R.; DELGADO, D. C.; **FERNANDES, D. C.**; AGUINAGA, J. Y.; SHIMADA, M. T.; MARCUSO, P. F.; MARTINS, I. M.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Efeito da Administração do Probiótico Contendo *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., e *Enterococcus* sp nos Parâmetros Hematológicos em *Oreochromis niloticus*. XIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, 2014, Aracajú, Sergipe.
20. CLAUDIANO, G. S.; MANRIQUE, W. G.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; SHIMADA, M. T.; MARCUSO, P. F.; SILVA, T. F.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Expression of MIF in the induced granuloma in *Piaractus mesopotamicus*. World Aquaculture Adelaide, Austrália, 2014.

21. CLAUDIANO, G. S.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; SHIMADA, M. T.; MANRIQUE, W. G.; AGUINAGA, J. Y.; SALVADOR, R.; MORAES, R.E.J; MORAES, F. R. First Report of Neurophatological Sings in *Piaractus mesopotamicus* Inoculated with Different Concentrations of *Aeromonas hydrophila*. World Aquaculture Adelaide, Austrália, 2014.
22. SHIMADA, M. T.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, F. S.; MARINHO NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; SILVA, T. F.; PAULILLO, A. C.; MORAES, F. R.; SALVADOR, R.; MORAES, R. E. J. High Mortality Caused by *Streptococcus agalactiae* Infection in *Oreochromis niloticus* reared in Brazil. World Aquaculture Adelaide, Austrália, 2014.
23. SHIMADA, M. T.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; SILVA, T. F.; MARCUSO, P. F.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Humoral and cellular immune response in Nile tilapia inoculated with sheep red blood cells. World Aquaculture Adelaide, Austrália, 2014.
24. SHIMADA, M. T.; MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; AGUINAGA, J. Y.; **FERNANDES, D. C.**; MANRIQUE, W. G.; MARINHO NETO, F. A.; SALVADOR, R.; MORAES, R. E. J.; MORAES, F. R. Humoral Immune Response of Tilapia *Oreochromis niloticus* Immunized with sonicated bacterial extract of *Streptococcus agalactiae*. World Aquaculture, Adelaide, Austrália, 2014.
25. AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, GUSTAVO S.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MARCUSO, P. F.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Imunização Passiva em Tilápias com Soro Iperimune Anti-*Streptococcus agalactiae*: Sobrevivência e Título de Anticorpos. XIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Aracajú, Sergipe, 2014.
26. MARCUSO, P. F.; ROSOLEM, M. C.; CLAUDIANO, G. S.; AGUINAGA, J. Y.; MARINHO NETO, F. A.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; SALVADOR, R.; VASCONCELOS, R. O.; MORAES, F. R. Padronização da técnica de imunohistoquímica para marcação da imunoglobulina M em tecidos de *Oreochromis niloticus*. VII Encontro dos Pós-graduandos, Jaboticabal, 2014.

27. SHIMADA, M. T.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; AGUINAGA, J. Y.; MARINHO NETO, F. A.; MARCUSSO, P. F.; URBANETTI, A. L. N.; MARTINS, I. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Sciaenidae) Infected by *Austrodiplostomum compactum* Metacercariae (Trematoda, Diplostomidae). World Aquaculture, Adelaide, Austrália, 2014.
28. MORAES, R. E. J.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; **FERNANDES, D. C.**; AGUINAGA, J. Y.; SILVA, T. F.; SHIMADA, M. T.; SALVADOR, R.; MORAES, F. R. Production of Ig-Y specific to bacterial antigens of *Photobacterium damsela* in the preventive therapy of *Rachycentron canadum* experimentally infected. In: XI Congresso on the biology of fish, Edinburgh, 2014.
29. CLAUDIANO, G. S.; SOUZA, E. C.; SILVA, C. F.; MARTINS, I. M.; AGUINAGA, J. Y.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; SHIMADA, M. T.; MANRIQUE, W. G.; SALVADOR, R.; MORAES, R. E. J.; MORAES, F. R. Standardization of processing and extraction techniques of bacterial rna from *Piaractus mesopotamicus* blood. World Aquaculture Adelaide, Austrália, 2014.
30. AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; ETO, S. F.; MARCUSSO, P. F.; SILVA, T. F.; **FERNANDES, D. C.**; MORAES, F. R.; MORAES, R. E. J. The use of cat's claw in the feeding of tropical fish: growth and immune response. XI Congresso on the biology of fish, Edinburgh, 2014.
31. AGUINAGA, J. Y.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; CLAUDIANO, G. S.; SILVA, T. F.; SHIMADA, M. T.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Uso do Camu camu (*Myrciaria dubia*) na Alimentação de Tilápia do Nilo: Crescimento e Resposta Imune. XIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Aracajú, Sergipe, 2014.
32. AGUINAGA, J. Y.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; DELGADO, D. C.; SHIMADA, M. T.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Uso do camu-camu (*Myrciaria dubia*) na piscicultura tropical. XI Workshop de Plantas Medicinais, Botucatu, SP, 2014.

33. MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; **FERNANDES, D. C.**; MARINHO NETO, F. A.; PETRILLO, T. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus* prepared by sonication. XI Congresso on the biology of fish, Edinburgh, 2014.
34. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MARCUSO, P. F.; CLAUDIANO, G. S.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Anticorpos Naturais e Quantificação de Lactobacilos em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com Diferentes Pesos Corporais. 40º Conbravet, Salvador, 2013.
35. CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; AGUINAGA, J. Y.; LOUREIRO, B. A.; **FERNANDES, D. C.**; MANRIQUE, W. G.; SALVADOR, R.; BELO, M. A. A.; MORAES, R. E. J.; MORAES, F. R. Eicosanoides e citocinas proinflamatórias na aerocistite aguda de *Piaractus mesopotamicus*. 40º CONBRAVET, Salvador, 2013.
36. MORAES, J. R. E.; **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; SALVADOR, R.; MORAES, F. R. Humoral and cellular immune response in Nile tilapia inoculated with sheep red blood cells. In: World Aquaculture Society Meetings In: Asian-Pacific Aquaculture, Vietnã, 2013.
37. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; AGUINARA, J. Y.; MARCUSO, P. F.; LOUREIRO, B. A.; SALVADOR, R.; MORAES, R. E. J.; MORAES, F. R. Identificação simultânea de anticorpos contra hemácias de carneiro em tilápias por soro aglutinação e eletroforese. 40º CONBRAVET, Salvador, 2013.
38. AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; SHIMADA, M. T.; SILVA, T. F.; PETRILLO, T. R.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Influência da Temperatura e do Sal na Resposta Imuno-Fisiológica ao Estresse Agudo em Tilápias do Nilóticas In: 40º CONBRAVET, Salvador, 2013.

39. MARCUSO, P. F.; CLAUDIANO, G. S.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MARINHO NETO, F. A.; SALVADOR, R.; MORAES, F. R. Porcentagem relativa de sobrevivência de tilápias do Nilo inoculadas com diferentes vacinas de *Streptococcus agalactiae*. I Simpósio de Piscicultura-SIMPEIXE, Londrina, 2013.
40. MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; **FERNANDES, D. C.**; MARINHO NETO, F. A.; ZAVASKI, M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; SALVADOR, R. Produção de bacterina de *Streptococcus agalactiae* isolado de tilápias naturalmente infectadas por meio de sonicação. I Simpósio de Piscicultura - SIMPEIXE, Londrina, 2013.
41. ETO, S. F.; MARCUSO, P. F.; MARINHO NETO, F. A.; SANTOS, M. A. P.; TAMEHIRO, C. Y.; SALVADOR, R.; **FERNANDES, D. C.** Anticorpos Naturais Contra Antígeno de Hemácia de Coelho em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com Diferentes Pesos Corporais In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos EMBRAPOA, Bonito-MS, 2012.
42. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MARCUSO, P. F.; MARINHO NETO, F. A.; Maicon Alan Paiva dos Santos; TAMEHIRO, C. Y.; SALVADOR, R.; MORAES, F. R.; MORAES, R. E. J. Dinâmica da Resposta Imune Humoral a Antígeno de Hemácia de Carneiro em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos EMBRAPOA, Bonito-MS, 2012.
43. AGUINARA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Estudo toxicológico agudo através do bioensaio do extrato aquoso da casca de *Uncaria tomentosa* em *Hyphessobrycon eques*. Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Bonito-MS, 2012.
44. LOURENCO, K. G.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; AGUINAGA, J. Y.; MARCUSO, P. F.; CARANDINA, L.; **FERNANDES, D. C.**; SALVADOR, R.; MORAES, F. R. Pesquisa de hemoparasitas em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanque rede. V Aquaciência, Palmas, TO, 2012.

45. ETO, F.S; MARINHO NETO, F. A.; MARCUSSO, P. F.; **FERNANDES, D. C.**; SANTOS, M. A. P.; OMURA, J.; TAMEHIRO, C. Y.; SALVADOR, R.; MORAES, R. E. J.; MORAES, F. R. Resposta Imune Humoral de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Imunizadas com Antígenos Bacterianos de *Streptococcus agalactiae* e aplicação do método de aglutinação direta para titulação dos anticorpos séricos. Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos EMBRAPOA, Bonito-MS, 2012.

Apresentação de trabalho ou palestra

1. **FERNANDES, D. C.** O Uso da Imunoglobulina Y como Ferramenta Biotecnológica. 2017. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

2. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J. ; OLIVEIRA, G. M.; PIZAULO JUNIOR, J. M. Produção e Purificação de Anticorpos IgY anti-*Aeromonas hydrophila*: Padronização para o ensaio de Dot Blot. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAULO JUNIOR, J. M. Método Imunoenzimático de ELISA utilizando IgY para a Detecção de Proteínas Microbianas de Células Bacterianas de *Streptococcus agalactiae*. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; PIZAULO JUNIOR, J. M. Técnica de imuno-histoquímica (IHC) para a detecção de anticorpos neutralizados á células bacterianas durante o percurso da soroterapia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; PIZAULO JUNIOR, J. M. Uso de anticorpo policlonal IgY-FITC em imunofluorescência direta. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6. **FERNANDES, D. C.**; ETO, F. S.; MARINHO NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSSO, P. F.; SHIMADA, M. T.; SALVADOR, R. Memória imunológica e resposta imune humoral e celular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com hemácias de carneiro. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).

7. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; MARINHO NETO, F. A.; SANTOS, M. A.; SALVADOR, R. Memória imunológica em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com hemácia de carneiro. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).

8. **FERNANDES, D. C.**; SALVADOR, R.; ETO, S. F.; MARINHO NETO, F. A.; SANTOS, M. A. Avaliação da dinâmica da resposta imune humoral em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com hemácias de carneiro. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).

9. **FERNANDES, D. C.**; ETO, S. F.; MARINHO NETO, F. A.; TAMEHIRO, C. Y.; SALVADOR, R. Avaliação da dinâmica da resposta imune humoral em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com hemácias de carneiro. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Demais produções técnicas

Prêmios

1. Premio de 1º lugar de melhor apresentação de poster: Uso de anticorpo policlonal IgY-FITC em imunofluorescência direta, VIII Congresso Regional de Histotecnologia - IBILCE/UNESP São José do Rio Preto - SP, 2016.

2. Prêmio de Menção honrosa 2º lugar pelo trabalho: Uso do camu-camu (*Myrciaria dubia*) na piscicultura tropical, XI Workshop de Plantas Medicinais: A Academia e os estudos com Plantas Medicinais - Unesp Botucatu - SP, 2014.

3. Prêmio de 2º lugar: Imunomodulação pela *Saccharomyces cerevisiae* e carboquelato de cromo na inflamação aguda em tilápias-do-nilo, Congresso Mineiro de Engenharia e Inovações Agrárias – COMEIA - Patos de Minas - MG, 2013.

4. Prêmio de Menção Especial, XVIII Jogos Florais (Trovas) de Bandeirantes – PR, 2001.

Patente

1. ALMEIDA, C. C.; PIZAURO, L.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; PIZAURO, J. M.; SAMARA, S. I.; AVILA, F. A. Complexo de Imunoproteínas e Uso do Mesmo, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201807397, título: "Complexo de Imunoproteínas e uso do mesmo", Instituição de registro: INPI. Depósito PCT: 22/11/2018.

2. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.**; PIZAURO JUNIOR, J. M. Kit de Imunodiagnóstico Múltiplo e Usos do Mesmo. Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170087360, título: "Kit de Imunodiagnóstico Múltiplo e Uso do Mesmo", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depositante: Unesp, Depósito: 26/04/2017, Instituição financiadora: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ UNESP/ FCAV.

3. ETO, S. F.; KUSUO ETO, A.; MORAES, F. R.; MORAES, R. E. J.; PIZAURO JUNIOR, J. M.; **FERNANDES, D. C.**; CLAUDIANO, G. S.; GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SALVADOR, R.; NAOMI ETO, A.; BALBUENA, T. S. Rações Nutracêuticas e Seus Usos, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150141548, título: "Rações Nutracêuticas e Seus Usos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 16/06/2015.

Arte Gráfica

1. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Método de conjugação da IgY com FITC e aplicação na técnica de imunofluorescência direta, 2016, Brasil. Número do registro: 51172211, data de registro: 11/11/2016, título: "Método de conjugação da IgY com FITC e aplicação na técnica de imunofluorescência direta Instituição de registro: HoodID Registros Online Ltda., Instituição financiadora: Financiamento Privado.

2. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Produção e transferência passiva da IgY em aves. 2016, Brasil. Número do registro: 57181326, data de registro: 26/12/2016, título: "Produção e transferência passiva da IgY em aves", Instituição de registro: HoodID Registros Online Ltda., Instituição financiadora: Financiamento Privado.

3. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Diferenças estruturais e funcionais entre a IgY das aves e IgG dos mamífero. 2016, Brasil. Número do registro: 57181226, data de registro: 26/12/2016, título: "Diferenças estruturais e funcionais entre a IgY das aves e IgG dos mamífero", Instituição de registro: HoodID Registros Online Ltda., Instituição financiadora: Financiamento Privado.

4. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Cinética da produção de anticorpos em aves. 2016, Brasil. Número do registro: 14181126, data de registro: 26/12/2016, título: "Cinética da produção de anticorpos em aves", Instituição de registro: HoodID Registros Online Ltda., Instituição financiadora: Financiamento Privado.

5. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Mecanismo de infecção por *Streptococcus agalactiae* no tecido cerebral de *Oreochromis niloticus*. 2018, Brasil. Número do registro: 2897108, data de registro: 08/05/2018, título: "Mecanismo de infecção por *Streptococcus agalactiae* no tecido cerebral de *Oreochromis niloticus*", Instituição de registro: HoodID Registros Online Ltda., Instituição financiadora: Financiamento Privado.

6. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Mecanismo de ação da IgY anti- *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* no bloqueio das fosfolipases A2 (PLA2), 2015, Brasil. Instituição de Registro: Instituto Nacional de Tecnologia da Informação (ITI), Número do Registro: 498605, Data de depósito: 05/11/2015, Data da concessão: 05/11/2015, Instituição Financiadora: Financiamento Privado. Finalidade: Científica.

7. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Mecanismo de ação indireto da IgY anti- *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* na opsonização dos lipopolissacarídeos e redução da transcrição de citocinas proinflamatórias, 2015, Brasil. Instituição de Registro: Instituto Nacional de Tecnologia da Informação (ITI), Número do Registro: 138625, Data de depósito: 05/11/2015, Data da concessão: 05/11/2015, Instituição Financiadora: Financiamento Privado. Finalidade: Científica.

8. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Mecanismo de ação proposto da IgY anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* no bloqueio da exotoxina de 56 kDa indutora de apoptose (AIP56) em fagócitos de teleósteos marinhos, 2015, Brasil. Instituição de Registro: Instituto Nacional de Tecnologia da Informação (ITI), Número do Registro: 558655, Data de depósito: 05/11/2015, Data da concessão: 05/11/2015, Instituição Financiadora: Financiamento Privado. Finalidade: Científica.

9. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Método de imunohistoquímica (IHC) para a detecção do microrganismo (A) e (B) aplicados para evidenciar a bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* opsonizada pela IgY nos órgãos de *Rachycentron canadum*, 2015, Brasil. Instituição de Registro: Instituto Nacional de Tecnologia da Informação (ITI), Número do Registro: 328585, Data de depósito: 05/11/2015, Data da concessão: 05/11/2015, Instituição Financiadora: Financiamento Privado. Finalidade: Científica.

10. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Método de imunohistoquímica (IHC) para a detecção do microrganismo *Aeromonas hydrophila* (A) e (B) aplicados para detectar a exotoxina 15kDa no tecido cerebral de *Piaractus mesopotamicus*, 2015, Brasil. Instituição de Registro: Instituto Nacional de Tecnologia da Informação (ITI), Número do Registro: 578575, Data de depósito: 05/11/2015, Data da concessão: 05/11/2015, Instituição Financiadora: Financiamento Privado. Finalidade: Científica.

11. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Proposto mecanismo de ação da IgY anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp) no bloqueio dos fatores de virulência do Phdp, 2015, Brasil. Instituição de Registro: Instituto Nacional de Tecnologia da Informação (ITI), Número do Registro: 508595, Data de depósito: 05/11/2015, Data da concessão: 05/11/2015, Instituição Financiadora: Financiamento Privado. Finalidade: Científica.

12. ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Proposto mecanismo de ativação das células de memória em baço de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com hemácia carneiro, 2015, Brasil. Instituição de Registro: Instituto Nacional de Tecnologia da Informação (ITI), Número do Registro: 558665, Data de depósito: 05/11/2015, Data da concessão: 05/11/2015, Instituição Financiadora: Financiamento Privado. Finalidade: Científica.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Comissão julgadora

1. XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ Fcav, 2016.

Bancas de graduação

1. SALVADOR, R.; **FERNANDES, D. C.**; CLAUDIANO, G. S. Participação em banca de Fausto de Almeida Marinho Neto. Parâmetros Hematológicos e Resposta Humoral de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Imunizadas com *Streptococcus agalactiae* pelas Vias Intramuscular e Intracelomática, Universidade Estadual do Norte do Paraná Campus Luiz Meneghel, 2014.
2. SALVADOR, R.; ETO, S. F.; **FERNANDES, D. C.** Participação em banca de Henrique Ragazzi de Moraes. Principais Doenças Bacterianas em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Cultivadas em Tanques-Rede, Universidade Estadual do Norte do Paraná Campus Luiz Meneghel, 2014.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. Inova Campinas, 2018.
2. I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental - CBMAAA, 2016.
3. VIII Congresso Regional de Histotecnologia - IBILCE/ UNESP, 2016. (Congresso)
4. Pré-simpósio – 2º SimpAN 2016 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/ Unesp.
5. 33º Congresso Brasileiro da Anclivepa, 2012.
6. IX SEVELM - Semana Acadêmica de Medicina Veterinária Luiz Meneghel, 2011.
7. Simpósio de Doenças Infecciosas Veterinária, 2011.
8. Simpósio de Nefrologia Veterinária, 2011.
9. Curso de Extensão Universitária Biologia Marinha, 2010.
10. VIII SEVELM - Semana Acadêmica de Medicina Veterinária Luiz Meghel, 2010.
11. VII Semana de Veterinária Luiz Meneghel, 2009.
12. Primeiro Ciclo de Palestras em Reprodução de Ruminantes, 2008.

COORIENTAÇÕES

1. Trabalho de Conclusão de Curso: Gustavo de Moraes Oliveira. Estudo da via clássica do complemento na infecção *in vitro* por *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). (Graduação em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ Fcav, 2017.

2. Iniciação Científica: Gustavo de Moraes Oliveira (Bolsista Prope). Efeito da via clássica do complemento na atividade fagolisossomal de células fagocíticas de tilápias-do-nilo na infecção experimental *in vitro* por *Streptococcus agalactiae*. (Graduando em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ Fcav, 2017.

DEDICO

À minha avó Julieta Fernandes (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, e suas forças, acima da nossa compreensão.

A toda minha família, em especial aos meus pais, Luiz C. Fernandes e Ione A. Fernandes, pelos ensinamentos, por todo apoio e amor incondicional.

Aos meus irmãos Élcio Fernandes e Fábio Fernandes e a todos meus amigos.

Ao Prof. Dr. João M. Pizauro pela orientação, oportunidade e inspiração em seguir carreira acadêmica.

Ao Dr. Silas F. Eto pelos ensinamentos, parceria e por me ajudar em todas as análises imunológicas, histopatológicas e correções dos artigos do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco A. A. Belo pela coorientação, parceria, encorajamento e disponibilizar o seu biotério.

Ao Prof. Dr. Samir I. Samara pela coorientação, ensinamentos, atenção e disponibilizar seu laboratório de cultivo celular animal.

À Prof. Dra. Eliana G. Macedo Lemos por disponibilizar seu laboratório para realizar as técnicas de microbiologia.

À Profa. Dr. Alessandra C. Moraes pela parceria e ajuda na infecção *in vivo*.

Aos técnicos de laboratório da Unesp/ Fcav João C. Campanharo, Andrea S. R. Medeiros, José H. Tebaldi e Hermes Ascari que sempre me ajudaram, confiaram, respeitaram e nunca me disseram um “não”, eterna gratidão.

Aos técnicos da USP/ Ribeirão Preto Maria D. S. Ferreira, Maria T. P. Maglia e Fabiana R. Moraes, com o auxílio nas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, varredura e citometria de fluxo.

À colega de pós-graduação Michelli I. G. Funicelli, pela ajuda e momentos de descontração.

Ao Dr. Ed Johnny R. Prado pelas dicas sobre a bexiga natatória.

Aos colegas de pós-graduação do LEIA Gustavo, Gabriella, Carol, Rafael, Flávio e Adriano por momentos de descontração no laboratório.

Aos membros da comissão examinadora de Defesa da Tese pela disposição e presença na contribuição de minha formação.

Ao CNPq (número de processo: 140505/2016-4) pela bolsa e apoio financeiro.

Ao Projeto Universal CNPq (número de processo: 429245/2016-5) pelo apoio financeiro.

Aos animais, minha inspiração, pois contribuíram com minha formação.

RESUMO

A *Aeromonas hydrophila* é um patógeno oportunista com capacidade de infectar peixes, mamíferos e humanos. É cosmopolita e responsável por infecções hospitalares em humanos e causadora da aeromonose em peixes. O uso de antibióticos na água, como forma terapêutica na aquicultura, apesar de controlar a infecção, favorece o desenvolvimento de resistência microbiana através do efeito residual destes fármacos no peixe e consequentemente no consumidor final humano, tornando-se um agravo para a saúde pública. Pensando nisso, foi produzido uma imunoglobulina Y (IgY), extraída da gema do ovo de galinhas poedeiras, específica para as proteínas de membrana e citoplasmática de *A. hydrophila*. No início, a IgY foi validada quanto a capacidade de detectar o patógeno no tecido de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) infectadas com a bactéria homóloga. Após a validação da IgY anti-*A. hydrophila*, a mesma foi testada *in vitro* na imunoterapia, e seus efeitos na atividade fagolisossômica de macrófagos (MΦs) de tilápias-do-nilo, infectados com *A. hydrophila* viva opsonizada/ neutralizada ou não. Os resultados provaram a eficácia e a aplicação da IgY para o ensaio de imunofluorescência direta (IMF) e imuno-histoquímica (IHC) validando a IgY para o diagnóstico e estudo fisiopatológico da infecção por *A. hydrophila* em tilápias-do-nilo. Na imunoterapia *in vitro* a IgY anti-*A. hydrophila* teve efeito positivo no controle da infecção, postulando ainda, o uso dos MΦs da tilápia-do-nilo como um importante modelo experimental *in vitro* para o estudo funcional e terapêutico da infecção por *A. hydrophila*.

Palavras-chave: Imunoglobulina Y. Inflamação. Teleósteo.

ABSTRACT

Aeromonas hydrophila is an opportunistic pathogen with the capacity to infect fish, mammals and humans. It is cosmopolitan and is responsible for hospital infections among humans and for aeromonosis in fish. Although using antibiotics in water for therapeutic purposes in fish-farming has the effect of controlling infection, it also favors development of microbial resistance through the residual effect of these drugs on fish and consequently on the final human consumers. Thus, their use has become a public health hazard. With the aim of investigating alternative ways of combating *A. hydrophila*, an immunoglobulin Y (IgY) extracted from the yolk of the eggs of laying hens that was specific for the proteins of the membrane and cytoplasm of *A. hydrophila* was produced. This IgY was firstly validated regarding its capacity to detect *A. hydrophila* in the tissues of Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) that were infected with the homologous bacterium. The anti-*A. hydrophila* IgY was then tested *in vitro* for immunotherapy to determine its effects on the phagolysosomal activity of macrophages (MΦs) in Nile tilapias that were infected with live *A. hydrophila* that was either opsonized/neutralized or not. The results demonstrated that application of IgY was effective. Direct immunofluorescence (IMF) tests and immunohistochemical (IHC) analysis validated IgY for diagnosing the presence of *A. hydrophila* and for conducting physiopathological studies on *A. hydrophila* in Nile tilapias. In *in vitro* immunotherapy, anti-*A. hydrophila* IgY had a positive effect with regard to controlling the infection. It can also be postulated that MΦs from Nile tilapias could be used as an important *in vitro* experimental model for functional and therapeutic studies on infection due to *A. hydrophila*.

Keywords: Immunoglobulin Y. Inflammation. Teleost.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II..... 59

Figura 1 - Caracterização da IgY anti-*A. hydrophila* produzida nas aves. (a-c) Produção sistêmica de anticorpos e em (b-d) índice de avides para proteínas de membrana (PMs) e citoplasmáticas (PCs). (e) SDS-PAGE das PMs e PCs e western blot da especificidade da IgY anti- *A. hydrophila*. (f) Extrato purificado da gema, pool de ovos 150 dias após a 3ª imunização, seta aponta para imunomarcação positiva para a fração constante (Fc) da IgY. Médias com respectivo desvio padrão, letras diferentes os valores se diferem pelo método de Tukey ($p < 0,05$). P: padrão bio-rad)..... 67

Figura 2 - Teste de sensibilidade *in vitro* da IgY anti-*A. hydrophila*. (a) Proteínas de membrana (PMs) e (b) citoplasmática (PCs) de *A. hydrophila*. Eixo superior, diferentes concentrações da IgY e no eixo inferior concentrações homólogas de proteínas bacterianas. Médias com respectivo desvio padrão, letras diferentes os valores se diferem pelo método de Tukey ($p < 0,05$)..... 68

Figura 3 - Pele de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. (a) Colônia imunorreativa para IgY anti- *A. hydrophila* na derme internalizada por fagócito, (b) próximo ao perímetro do endotélio da vênula e (c) colônias aderidas na periferia da arteríola. (d) Bastonetes difusos na derme. (e) Colônias na derme (ponta da seta) e na hipoderme (setas), associadas à lesão ulcerativa com infiltrado leucocitário na mesoderme (asterisco) e melanóforos em marrom (setas pontilhadas). Barra 20 μ m; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 69

Figura 4 - Baço de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. (a) Bastonetes engolfados por fagócitos no interstício do órgão marcados com IgY anti- *A. hydrophila* e (b) formas livres e difusas entre os sinusóides esplênicos. (c) Bastonetes associados ao centro de melanomacrófagos. (d) Bastonetes difusos (asterisco) na polpa branca (WP) e polpa vermelha (RP) com acúmulo de hemossiderina (setas) e centro de melanomacrófagos (pontas das setas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 70

Figura 5 - Cinética da infecção por *A. hydrophila* no sistema hepático. (a-b) Colônias aderidas na periferia de uma veia centro lobular (VCL) e (f) no endotélio vascular. Em (c) colônias próximas ao ducto biliar (DB) e (d) bastonetes engolfados por melanomacrófagos, mostrados também em (e). Em (g) o H&E mostra o DB (asterisco), circundada por melanomacrófagos e áreas degeneradas (setas pontilhadas) e em (h) alterações vasculares com infiltrado leucocitário na periferia da VCL (setas) e melanomacrófagos na periferia do vaso (pontas das setas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 71

Figura 6 - Sistema renal de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. Em (a-c) difusão das colônias de *A. hydrophila* da luz da veia renal para o interstício do órgão. Imagem (b-d) colônias associadas aos túbulos renais e (e) nos glomérulos. (f) Acúmulo de melanomacrófagos e infiltrados leucocitários (ponta das setas) na periferia de uma veia central (CV) e (g) degeneração glomerular (asterisco) e aumento do espaço intra-capsular (setas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 72

Figura 7 - Brânquia de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. Colônias difusas no interstício da lamela (a-c) e em (b-d) aderidos ao endotélio do seio venoso central. (e-f) Colônias aderidas no epitélio lamelar (setas) e infiltrado leucocitário (pontas das setas) próximos a veia central (CV). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 73

Figura 8 - Sistema cardiovascular de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. (a-b) Colônias de *A. hydrophila* aderidas nas fibras cardíacas e em (c) infiltrado leucocitário (pontas das setas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 74

Figura 9 - Tecido nervoso central de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. (a) Imunomarcagem positiva para *A. hydrophila*, (b) colônias livres e em (c) fagócitos engolfados com *A. hydrophila* infiltrando as camadas mais internas da meninge e (d) na região cerebelar. A IHC mostra a entrada da *A. hydrophila* por via epitélio da meninge (e) e por via circulatória (f). E no H&E áreas com lesões hemorrágicas com infiltrado leucocitário (asterisco) e necrose (pontas das setas) em (g) e vacúolos na região cerebelar (setas) (h). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 75

CAPÍTULO III 81

Figura 1 - Caracterização funcional da IgY anti-*Aeromonas hydrophila* *in vitro*. (a) Ensaio de opsonização *in vitro* da IgY e (b) atividade neutralizante do crescimento bacteriano. *Aeromonas hydrophila* na concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, controle positivo tampão fosfato salino (PBS) e placebo (IgY inespecífica) testado na concentração constante de 300 µg/mL. Médias em triplicatas e respectivo desvio padrão, letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos na mesma concentração e maiúsculas entre as concentrações, letras diferentes se diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) 91

Figura 2 - Caracterização celular e inflamatória de MΦs isolados da bexiga natatória de tilápias-do-nilo. (a) Citologia e perfil proteico do exsudado inflamatório (ExD); (b) imunocitoquímica (IC) da cultura de MΦs; (c) (I) cultura bacteriológica e (II) microscopia eletrônica de varredura (MEV) da *Aeromonas hydrophila* e (d) (I-II) MΦ em atividade fagocítica, setas apontam para o bastonetes engolfados e (III) na microscopia eletrônica de transmissão (MET) ponta da seta mostra a *A. hydrophila*, setas mostram a formação do pseudópode do MΦ e (N) núcleo; (IV) seta aponta o fagossoma e (L) lisossomo. Barras Wright e Giemsa (citologia): 10 µm; IC: 10 µm, hematoxilina de Harris e 3,3'-diaminobenzidina; MEV e MET: 0,5-1 µm 92

Figura 3 - Efeito da imunoglobulina Y na atividade fagolisossômica de MΦs de tilápias-do-
nilo. (a) Detecção da *A. hydrophila* com a IgY específica conjugada com isotiocianato de
fluoresceína (IgY anti- *A. hydrophila* FITC); (b) Imunofluorescência direta mostrando a
fagocitose de *A. hydrophila* por MΦs no tempo de 48 h com respectivos tratamentos da IgY e
marcada com IgY anti- *A. hydrophila* FITC; (c) Fosfatase ácida lisossomal, (d) atividade do
burst respiratório e em (e) a produção de óxido nítrico. Barras: 10 µm. Médias em triplicatas e
respectivo desvio padrão, letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos no mesmo
tempo e maiúsculas entre os tempos, letras diferentes se diferem significativamente pelo teste
de Tukey ($p<0,05$) 94

Figura 4 - Efeito da imunoglobulina Y na viabilidade intracelular da *A. hydrophila* em MΦs
de tilápias-do-nilo. (a) Análise das fragmentações de DNA da *A. hydrophila* em cultivo de
MΦs e marcadas com iodeto de propídio (PI). (b) porcentagem de células bacterianas
inviáveis, (c) plaqueamento do conteúdo citoplasmático de MΦs infectados com *A.*
hydrophila e (d) imagem representativa dos respectivos plaqueamentos após 24 h da infecção.
Médias em triplicatas e respectivo desvio padrão, letras minúsculas comparam os diferentes
tratamentos no mesmo tempo e maiúsculas entre os tempos, letras diferentes se diferem
significativamente pelo tes de Tukey ($p<0,05$) 96

Figura 5 - Atividade mitocondrial dos MΦs infectados com *A. hydrophila*. (a-b) Cultura de
MΦs, setas pontilhadas apontam para células em atividade; (c) mostra a adesão da *A.*
hydrophila ao corpo necrótico de um MΦ (ponta da seta); em (d) a aderência do pili à célula
(setas) e (e) mensuração da atividade mitocondrial dos MΦs infectados com *A. hydrophila*.
Barras microscopia invertida: 10 µm; MEV: 0,5-1 µm. Médias em triplicatas e respectivo
desvio padrão, letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos no mesmo tempo e
maiúsculas entre os tempos, letras diferentes se diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$) 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs – células apresentadoras de antígeno	MET – Microscopia eletrônica de varredura
BSA – Soro albumina bovina	mg – Miligrama
CD68 – Cluster of differentiation 68	MHC de classe II – moléculas do complexo de histocompatibilidade classe II
cm – Centímetros	Min – Minuto
°C – Graus Celsius	mL – Mililitro
DAB – 3,3'-Diaminobenzedina	mM – Milimolar
DL – Dose letal	MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio
DO – Densidade óptica	MΦ – Macrófago
DAPI – 4',6'-Diamino-2-fenil-indol dihydrochloride	NBT – Azul de nitrotetrazólio
EB – Energia bruta	NK – Natural Killers
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético	nm – Nanômetro
ELISA – Imunoensaio enzimático	ON – Óxido nítrico
FA – Fosfatase ácida	PBS – Tampão fosfato salino
FAL – Fosfatase ácida lisossomal	PC – Proteína citoplasmática
Fc – Fragmento cristalizável	PM – Proteína de membrana
FITC – Isotiocianato de fluoresceína	PGE – Polietilenoglicol
g – Grama	pH – Potencial hidrogênico
h – Hora	PI – Iodeto de propídio
H&E – Hematoxilina e Eosina	ROIs – Reativos intermediários do oxigênio
Ig – Imunoglobulina	SFB – Soro fetal bovino
IHC – Imuno-histoquímica	SDS – Dodecil sulfato de sódio
IL – Interleucina	t – Toneladas
IMF – Imunofluorescência	TNF- α – Fator de necrose tumoral α
iNOS – Óxido nítrico sintase	TSA – Ágar triptona de soja
kDa – Quilodalton	TSB – Caldo triptona de soja
kg – Quilograma	UFC – Unidade formadora de colônia
L – Litro	μ g – Micrograma
LPS – Lipopolissacarídeo	μ L – Microlitro
MET – Microscopia eletrônica de transmissão	μ m – Micrômetro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Considerações gerais.....	35
1 INTRODUÇÃO	35
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	36
2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	36
2.1.1 Epidemiologia da <i>A. hydrophila</i>	37
2.1.2 Fatores de virulência da <i>A. hydrophila</i>	38
2.2 Visão geral da resposta imune inata e adquirida em peixes	38
2.2.1 Macrófagos e processo fagocítico	41
2.3 Princípios gerais da resposta imune inata e adquirida em aves.....	43
2.3.1 Resposta imune humoral em aves	45
2.3.2 Mecanismos de transferência de anticorpos maternos em aves.....	45
2.3.3 Aplicação da IgY na imunoterapia e imunodiagnóstico.....	46
3 OBJETIVO GERAL	49
3.1 Objetivos específicos.....	49
REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO II – Imunoglobulina Y no diagnóstico da infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i> em tilápias-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT	59
1 INTRODUÇÃO	60
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1 Comitê de ética.....	61
2.2 Preparação do antígeno	61
2.3 Imunização e coleta de soro e gema das aves	62
2.4 Análise do título da IgY	62
2.5 Afinidade da IgY.....	63
2.6 Purificação da IgY	63
2.7 SDS-PAGE	63
2.8 Western blotting	63

2.9 Sensibilidade da IgY	64
2.10 Conjugação da IgY com FITC	64
2.11 Obtenção dos tecidos infectados.....	64
2.12 Exame histopatológico.....	65
2.13 Imunofluorescência	65
2.14 Imuno-histoquímica	65
2.15 Análise estatística.....	66
3 RESULTADOS	66
3.1 Produção e caracterização da IgY	66
3.2 Concentração detectora da IgY.....	68
3.3 Pele	69
3.4 Baço.....	70
3.5 Fígado	71
3.6 Rim.....	72
3.7 Brânquia.....	73
3.8 Coração.....	74
3.9 Cérebro	74
4 DISCUSSÃO	75
REFERÊNCIAS	77

CAPÍTULO III – Atividade fagolisossômica de macrófagos de tilápias-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) infectados <i>in vitro</i> por <i>Aeromonas hydrophila</i> : Infecção e imunoterapia	81
RESUMO.....	81
ABSTRACT	81
1 INTRODUÇÃO	82
2 MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1 Comitê de ética.....	84
2.2 Produção e caracterização da IgY anti- <i>A. hydrophila</i>	84
2.3 Ensaio de opsonização da <i>A. hydrophila</i>	84
2.4 Atividade neutralizante <i>in vitro</i> da IgY anti- <i>A. hydrophila</i>	85
2.5 Isolamento e cultivo celular	85

2.6 Fenotipagem celular	85
2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	86
2.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	86
2.9 Eletroforese e western blot	87
2.10 Delineamento experimental	87
2.11 Atividade da fosfatase ácida (FA)	87
2.12 Atividade do burst respiratório	88
2.13 Produção de óxido nítrico (ON)	88
2.14 Imunofluorescência direta (IMF).....	88
2.15 Citometria de fluxo.....	89
2.16 Viabilidade bacteriana intracelular nos macrófagos	89
2.17 Atividade mitocondrial	89
2.18 Análise estatística.....	90
3 RESULTADOS	90
3.1 Avaliação funcional da IgY <i>in vitro</i>	90
3.2 Cultura de macrófagos.....	91
3.3 Efeito da IgY na atividade fagolisossômica dos macrófagos infectados com <i>A. hydrophila</i>	93
3.4 IgY na neutralização e sobrevivência da <i>A. hydrophila</i> em macrófagos.....	95
3.5 Efeito da IgY na sobrevivência e proliferação de macrófagos infectados com <i>A. hydrophila</i>	97
4 DISCUSSÃO	99
REFERÊNCIAS	105
 CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES	 115
 APÊNDICE A	 116

CAPÍTULO I – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

Em 2018, a piscicultura nacional produziu cerca de 722,560 t de peixes de cultivo. Esse resultado é 4,5% superior em relação à produção de 2017 (640.510 t) (PEIXE BR, 2019). Dentre os peixes mais criados em águas continentais, a tilápia-do-nilo é a mais importante espécie cultivada no Brasil representando 51,7% da piscicultura nacional, com 357.639 t em 2017 (PEIXE BR, 2018). A média de consumo nacional de pescado *per capita* em 2016 foi em torno de 9,6 Kg/*per capita* de pescado (FAO, 2016). Nos anos de 2013 a 2015, a produção de pesca e aquicultura no Brasil foi de 1.327.000 t (FAO, 2016) e a causa desta expansão está relacionada ao acelerado desenvolvimento da aquicultura (FORNARI *et al.*, 2017). Todavia, a intensificação da piscicultura gera problemas sanitários, causando aumento nos níveis de estresse nos peixes, com baixa resposta de mecanismos de defesa e aumento da susceptibilidade às doenças infecciosas e às parasitárias (MORAES; MORAES, 2009). A prevalência de enfermidades bacterianas em peixes leva a perdas significativas nesta atividade. A bactéria Gram negativa *Aeromonas hydrophila* se inclui nestas, por ser importante patógeno encontrado na água, solo, alimentos contaminados, fezes humanas e animais (HIRSCH *et al.*, 2006; TAVARES; CERESER; TIMM, 2015).

Foi demonstrada a diversidade de espécies de *Aeromonas* em ambientes de piscicultura e diversos isolados apresentaram seleção de bactérias resistentes a antibióticos, mesmo sem o uso de tais substâncias para o controle de doenças infecciosas (HIRSCH *et al.*, 2006). O tratamento utilizado na aquicultura é feito com antibióticos na água ou na ração que representa riscos, devido ao desenvolvimento de seleção microbiana e, consequentemente, contaminando os organismos aquáticos, mamíferos, aves e humanos, além da contaminação ambiental (MARTI; JOFRE; BALCAZAR, 2013).

Por isso a idéia de se utilizar anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas poedeiras, representando uma alternativa promissora na imunoterapia de bacterioses em organismos aquáticos, devido à sua especificidade e ausência de efeito residual na água, no predador ou no consumidor humano. Além disso, esses anticorpos podem ser utilizados para o diagnóstico de doenças bacterianas e auxiliar na compreensão da fisiopatologia de peixes infectados, devido à deficiência de anticorpos comerciais específicos para doenças bacterianas presentes em organismos aquáticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aeromonas hydrophila*

A bactéria *A. hydrophila* pertence à família *Aeromonadaceae*, é Gram negativa, possui cápsula, é aeróbia e anaeróbia facultativa, tem forma de bastonete móvel, possui flagelos polares e não produz esporos (JANDA; ABBOTT, 2010).

A espécie foi isolada da água e ambientes aquáticos, como rios, lagos, água do mar, águas subterrâneas, esgoto e em vários estágios de tratamento da água (FIORENTINI *et al.*, 1998). E por estar presente na água, são mais conhecidas por causar doenças em peixes, do que doenças sistêmicas em humanos (HÄNNINEN *et al.*, 1997; HIRSCH *et al.*, 2006).

Infecções com a *A. hydrophila* foram relatadas em algumas espécies de peixes, como a carpa (*Cyprinus carpio*), tilápia (*O. niloticus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), peixe-gato (*Ictalurus punctatus*), bacalhau (*Gadus morhua*), salmão (*Salmo salar*), causando septicemia hemorrágica, além de infecções ulcerativas (JORGENSEN; HINDLER, 2007). Os sinais clínicos da infecção são as úlceras na pele que podem ocorrer em qualquer local do peixe e muitas vezes são circundadas por uma borda brilhante de tecido hiperêmico. Outros órgãos comumente afetados pela infecção incluem as brânquias, rins, fígado, baço, pâncreas e músculo esquelético. Os sinais clínicos variam de acordo com vários fatores, incluindo a virulência do microrganismo, a resistência do peixe à infecção, a presença ou ausência de bacteremia ou septicemia, e fatores de estresse ambientais associados à hemorragia no músculo do peixe e no interior dos órgãos (AUSTIN; ADANS, 1996; JANDA; ABBOTT, 2010). Devido à alta variabilidade dos sinais clínicos, o diagnóstico desta doença, baseado apenas nos sinais não é confiável, e pode ser economicamente desastroso para o piscicultor (SWANN; WHITE, 1991).

Posto isto, *A. hydrophila* está associada a grandes morbidades e mortalidades em peixes de todo o mundo ao longo da última década, resultando em enormes perdas econômicas. Em muitos desses casos, é a responsável por infecções secundárias em peixes imunossuprimidos (FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

2.1.1 Epidemiologia da *A. hydrophila*

A *A. hydrophila* é considerada um patógeno emergente e encontrada em grande diversidade de *habitat* (VILA, 2003). Ela apresenta distribuição em meios aquáticos e faz parte da microbiota associada aos animais pecilotérmicos e, por outros, como patógenos de peixes e dos seres humanos em enfermidades de veiculação hídrica (VIVEKANANDHAN *et al.*, 2002; HIRSCH *et al.*, 2006).

A transmissão do agente acontece de modo horizontal, estando associada à matéria orgânica na água e nos viveiros, e é transmitida por descarga do trato intestinal dos peixes e através de lesões externas na pele (COSTA, 2003). A alteração de parâmetros de manejo pode levar a predisposição dos peixes às enfermidades, causadas por altas temperaturas e densidades de estocagem, mudanças bruscas de temperatura, traumatismos decorrentes de manejo, transferência de peixes, baixos níveis de oxigênio dissolvido, condições nutricionais deficientes e infecções por fungos ou parasitas que contribuem para as mudanças fisiológicas e acabam aumentando a suscetibilidade a infecção (PILARSKI; SAKABE, 2009).

Atualmente, essa bactéria é considerada também como agente etiológico de infecções em humanos e tem relevância epidemiológica nos casos de infecções oportunistas em pacientes imunossuprimidos (JANDA; ABOTT, 2010; DI PINTO *et al.*, 2012). As manifestações podem ser ocasionadas por infecções intestinais ou extra-intestinais, casos de celulites, fasciites necrotizantes, meningites, síndrome hemolítica urêmica e sepse (PEIXOTO *et al.*, 2012). Essas infecções assumem papel de destaque especialmente em grupos suscetíveis como crianças, idosos e portadores de doenças crônico-degenerativas (PEREIRA *et al.*, 2008).

Atividades recreativas como passeios de barco, pesca e mergulho podem levar à infecção através de grandes ou pequenos traumas (VOSS; RHODES; JOHNSON, 1992; BOSSI-KÜPFER *et al.*, 2007). E como a expansão urbana continua a invadir ambientes rurais, o potencial para infecções por *Aeromonas* decorrentes de origens zoonóticas pode aumentar (KUNIMOTO *et al.*, 2004). Portanto, a *Aeromonas* spp. presente nos ambientes aquáticos tem potencial de risco à saúde e alguns países têm adotado a contagem da *Aeromonas* como indicador adicional de que a qualidade da água está inviável (BORCHARDT *et al.*, 2003).

2.1.2 Fatores de virulência da *Aeromonas hydrophila*

Vários fatores definem infecções e patogenicidade, incluindo o inóculo e a via de infecção, a suscetibilidade do hospedeiro e características de virulência da estirpe (FALKOW, 1990). A virulência da bactéria pode ser definida como a capacidade de uma determinada estirpe para incitar a doença e, para bactérias intactas, isso pode ser mediado em múltiplas maneiras, como estudos de letalidade (dose letal 50% [DL50]), grau de invasão ou produção de toxinas, entre outros. A patogenicidade está relacionada com a virulência de toxinas, ou características como a produção de cápsulas e exotoxinas (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999).

As fosfolipases, hemolisinas, proteases, citotoxinas, capacidade de aderência às células, camada-S, lipopolissacarídeos (LPS), exoenzimas, exotoxinas, como a aerolisina, lipases, entre outras (WONG *et al.*, 1998) são importantes fatores de virulência da *A. hydrophila* (SCOARIS *et al.*, 2008).

A formação de biofilme fornece às bactérias resistência a agentes antimicrobianos e bloqueio das defesas do hospedeiro (COSTERTON *et al.*, 1995; LYNCH *et al.*, 2002). As *Aeromonas* spp. desenvolveram mecanismos múltiplos de regulação para formação de biofilmes que estão ligados à produção de fatores de virulência, e a formação de biofilme foi identificada na maioria dos isolados de *A. hydrophila* (GUERRA *et al.*, 2007). Bizani e Brandelli (2001) identificaram a bactéria isolada da água de abatedouro bovino e foi positiva nas reações de hemólise e hemoaglutinação. Foram avaliados isolados de *Aeromonas* spp. de peixes congelados, quanto a presença de fatores de virulência importantes para o desenvolvimento de uma infecção bacteriana, sendo observada a presença dos genes aerolisina/hemolisina, lipases extracelulares (lip, lipH3, pla, plc e GCAT), proteases e DNases (CASTRO-ESCARPULLI *et al.*, 2003). Kingombe *et al.* (2010) analisaram isolados de *Aeromonas* spp. a partir de alimentos e tais isolados apresentaram aspectos multifatoriais para genes de virulência, evidenciando assim contaminante de risco a saúde pública.

2.2 Visão geral da resposta imune inata e adquirida em peixes

A resposta imune dos peixes é dividida em resposta inata e adaptativa, a inata consiste na primeira linha de defesa contra os agentes patogênicos, mediada por moléculas do complemento, e por células fagocíticas resultando no bloqueio e eliminação dos patógenos (ETO *et al.*, 2014). A resposta imune adaptativa é caracterizada pela especificidade e memória

imunológica gerada por linfócitos T e B produtores de anticorpos específicos (BERNSTEIN; SCHLUTER; MARCHALONIS, 1998; URIBE *et al.*, 2011).

Os peixes teleósteos apresentam um sistema imune inato desenvolvido representado por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores (WATTS; MUNDAY, 2001). Fazem parte das barreiras à pele, sistema complemento, enzimas antimicrobianas, interleucinas, interferon e defesa celular, como granulócitos, monócitos, macrófagos (MΦs), trombócitos e células Natural Killer (NK) (MAGNADOTTIR *et al.*, 2011). A fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento e a síntese de proteínas de fase aguda como as citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata (TURVEY; BROID, 2010).

A inflamação também é considerada um mecanismo da resposta imune inata, uma vez que um tecido tenha sido penetrado por um agente infeccioso, os fatores mediadores são liberados a fim de ampliar a migração de células de defesa, como os neutrófilos que são a primeira linhagem fagocítica a chegar ao foco da inflamação, sendo responsáveis pela depuração dos patógenos e caracterizam citologicamente a fase aguda da inflamação (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). Após 48 horas da infecção, as células migratórias principais são compostas por MΦs e linfócitos caracterizando o início da fase crônica da infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A ativação e migração das células fagocíticas está relacionada com a ativação de receptores específicos presentes nestas células e a produção de citocinas (MITCHELL *et al.*, 2006). O LPS, a manose e ácidos teicóicos são encontrados na superfície de microrganismos e constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), sendo assim são capazes de ativar a resposta imune inata, através da interação com diferentes receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões, dentre os quais a família dos receptores Toll-like (TLRs) (CRUVINEL *et al.*, 2010). Os TLRs se destacam por seu papel central na ligação a patógenos, participando da opsonização, ativação do complemento, na fagocitose e iniciação da resposta inflamatória. Esses receptores estão presentes principalmente em MΦs e neutrófilos. Outros receptores presentes em fagócitos são aqueles para frações do complemento C3b, citocinas, interleucinas e para a fração constante (Fc) das imunoglobulinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O sistema complemento é composto por uma cascata de enzimas com ação lítica, quimiotática, pró-inflamatória e na opsonização de microrganismos (TIZARD, 2010). Os neutrófilos e MΦs produzem reativos intermediários do oxigênio (ROIs) através da ação de enzimas lisossomais, que são produzidas durante o processo fagocítico para a depuração do microrganismo (MAGNADOTTIR *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2019).

Em síntese, a resposta imune inata em peixes é a principal ferramenta de defesa contra patógenos, sendo compensatória à resposta imune adquirida que se desenvolve lentamente nos invertebrados, em relação aos dos mamíferos (BLY; CLEM, 1994).

O sistema imune adquirido dos peixes é composto por resposta imune humoral e celular, constituído por tecidos linfóides, células apresentadoras de antígeno (APCs), linfócitos T e B e imunoglobulinas (WILSON *et al.*, 1995; CRUVINEL *et al.*, 2010). Os peixes apresentam tecidos linfóides primários e secundários, sendo o timo e o rim cranial órgãos primários, equivalentes funcionalmente à medula óssea dos mamíferos, o baço, os tecidos linfóides associados à mucosa intestinal (MALTS), as brânquias e a pele são órgãos secundários (PRESS; EVENSEN, 1999).

A resposta imune humoral dos peixes teleósteos é diferente dos mamíferos, por não apresentar a produção de anticorpos de classe IgG na resposta imune humoral secundária, apresentando a imunoglobulina M (IgM) como principal anticorpo da resposta imune humoral primária e secundária (MASHOOF; CRISCITIELLO, 2016). A IgM é tetramérica, composta por quatro cadeias polipeptídicas, duas pesadas e duas leves (WILSON *et al.*, 1997). Estas imunoglobulinas estão presentes no plasma, muco e bile em peixes, (BRADSHAW *et al.*, 1971). Além da IgM, outras classes de imunoglobulinas foram encontradas em peixes como a IgD (HIRONO *et al.*, 2003), e a IgT/IgZ (ZIMMERMAN *et al.*, 2011), sendo a maioria dos estudos realizada com peixes marinhos (VELIKOVSKY *et al.*, 2009).

Algumas características da resposta imune humoral e celular foram descritas em peixes teleósteos, com presença de células T e B, imunoglobulinas, moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) tipo I e II e citocinas (WILSON, 1995). Estudos em trutas arco-íris demonstraram a expressão de genes α e β ligados à formação dos receptores de células T, confirmando a presença destas células na resposta imune humoral e celular dos teleósteos (SCHLUTER *et al.*, 1999). A apresentação de antígeno através das APCs, MΦs e células dendríticas, foi documentada em peixes teleósteos, confirmando a presença de uma

resposta imune inata e adquirida nesta espécie, tanto celular como humoral (KAATTARI, 1992).

2.2.1 Macrófagos e processo fagocítico

Os fagócitos profissionais de mamíferos derivam de uma célula progenitora mielóide comum (MURPHY, 2014). Entre estes fagócitos profissionais, as populações de MΦs teciduais residentes são as células que englobam e depuram as bactérias, usando enzimas hidrolíticas e a produção de espécies reativas do oxigênio (RIOs). Uma variedade de receptores em MΦs é usada para detectar o patógeno e seus subprodutos secretados (ZHANG; WANG, 2014). A maioria dos estudos realizados com fagócitos de peixes mostraram que, como em mamíferos, monócitos, MΦs residentes e os neutrófilos são as principais células fagocíticas (NEUMANN *et al.*, 2001). De fato, a fagocitose foi considerada a principal função que caracteriza ou mesmo identifica os MΦs em teleósteos (BRAUN-NESJE; KAPLAN; SELJELID, 1982) e, além disso, foram descritos como os fagócitos mais ativos e ávidos em peixes (ENANE *et al.*, 1993). Além disso, os MΦs profissionais fagocitam e regulam respostas pró-inflamatórias e homeostáticas *in vivo* (RIEGER, 2012).

A atividade fagocítica, é um mecanismo pelo qual o fagócito elimina a maioria dos microrganismos patogênicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Além disso, a fagocitose é essencial para a manutenção da homeostasia e remodelação no processo de cicatrização de tecidos lesionados (PEDRERA *et al.*, 1992; FLANNAGAN; JAUMOUILLE; GRINSTEIN, 2012). Atualmente, o termo fagocitose é utilizado para descrever o processo pelo qual fagócitos englobam microrganismos, corpos estranhos, glóbulos vermelhos envelhecidos e debris celulares (MORETTI; BLANDER, 2014).

Segundo Esteban *et al.* (2015) o processo fagocítico consiste em uma série de etapas conectadas. Inicialmente, ocorre o reconhecimento dos PAMPs via receptor de reconhecimento padrão presentes nestas células, seguido do engolfamento ou internalização do patógeno/partícula estranha e a formação do fagossoma, que na sequência funde-se ao lisossoma para formar o fagolisossoma. Esta vesícula endossomal, produz os RIOs, e utiliza enzimas com ação hidrolítica e proteolítica para a depuração da partícula e do patógeno e no caso de células fagocíticas, com função de apresentação de antígeno, como por exemplo MΦs e células dendríticas, ocorre após o processo descrito, a apresentação de antígeno via MHC classe II para os linfócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O processo fagocítico foi estudado em leucócitos de peixes, mensurando a atividade fagocítica de células bacterianas como partículas alvo e foi demonstrado que este processo é variável no que diz respeito ao número de bactérias engolfadas e o tempo necessário para a depuração de cada bactéria pelo mesmo fagócito. Essa variabilidade no potencial fagocítico está estreitamente relacionado à capacidade de defesa do hospedeiro (ESTEBAN; MESEGUER, 1994). O processo da fagocitose é estimulado pela interação de moléculas de superfície alvo ou PAMPs com os receptores de reconhecimento padrão presentes nas células fagocíticas como abordado inicialmente neste contexto (DESJARDINS; HOUDE; GAGNON, 2005). A superfície dos fagócitos possui muitos receptores que são capazes de reconhecer e decodificar seus ligantes cognatos expressos na superfície do alvo e desencadear o englobamento. Esses receptores podem reconhecer diretamente partícula ou reconhecer alvos que são revestidos com moléculas opsonizadas. Inicialmente, esses ligantes eram referidos como PAMPs, na verdade, há uma necessidade de incluir nestes padrões o reconhecimento de bactérias comensais e células apoptóticas e necróticas. Por esta razão, um termo mais abrangente de padrão molecular (MP) foi proposto retirando o termo que priva esta molécula apenas a patógenos (MORETTI; BLANDER, 2014). Vários tipos de receptores de reconhecimento de padrões estão envolvidos na identificação de fatores estranhos em vertebrados e invertebrados (AKIRA, 2006). Entre esses receptores de diferentes origens evolutivas estão os receptores TLRs em particular o TLRs 4 que tem afinidade por LPS (KAISER, 2010).

Em macrófagos de tilápias-do-nilo foi demonstrado que os lisossomos se fundem com fagossomas e formam fagolisossomas na infecção por *A. hydrophila*, e que parte deste processo está correlacionado com a atividade da enzima fosfatase ácida, provando a semelhança deste mecanismo com células homólogas de mamíferos (FERNANDES *et al.*, 2019). Além disso, a fagocitose é conhecida por desencadear vários mecanismos antimicrobianos. Indiscutivelmente, o mais importante e bem conhecido desses mecanismos envolvem a produção de radicais superóxido e óxido nítrico, que são conhecidos por depurar os microrganismos ingeridos contidos nos fagolisossomos (NEUMANN *et al.*, 2001).

Devido à importância desses processos, muitos patógenos intracelulares desenvolveram mecanismos para superar as defesas dos macrófagos, e sobreviver na forma intracelular, usando essas células imunes como veículo e estratégia para a disseminação para diferentes tecidos do hospedeiro. As infecções por patógenos causam importantes prejuízos

para populações antimicrobianas e fagocíticas de peixes, sendo de grande interesse compreender as respostas fagocíticas desta espécie e os mecanismos pelos quais os agentes patogênicos aquáticos são capazes de superar a atividade dos MΦs (ESTEBAN *et al.*, 2015).

2.3 Princípios gerais da resposta imune inata e adquirida em aves

O sistema imune das aves é funcionalmente semelhante ao dos mamíferos, constituído por dois sistemas que apesar de ser dividido em inato e adquirido, ambos atuam em sinergismo, em uma lógica sequencial de eventos moleculares e celulares com a defesa e sobrevivência do hospedeiro (FERNANDES *et al.*, 2013). Durante a evolução dos seres vivos, o sistema imune inato foi o primeiro mecanismo a se especializar na defesa do hospedeiro, e está presente em invertebrados e vertebrados inferiores e superiores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A imunidade inata é composta por mecanismos que incluem barreiras físicas, tais como a pele, pena, mucosas e moléculas químicas como peptídeos antimicrobianos, citocinas, moléculas do sistema complemento, células especializadas, os leucócitos mononucleares (linfócitos, monócitos e células NK) e polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), além dos tecidos e órgãos linfoides (OLÁH; VERVEDE, 2008).

A resposta imune inata das aves pode ser dividida em resposta imune inata, que representa a primeira linha de defesa do organismo após o rompimento das barreiras físicas, químicas e biológicas iniciais, e a resposta imune adaptativa (OLÁH; VERVEDE, 2008). A resposta imune inata envolve a participação de células fagocíticas, moléculas do sistema complemento, anticorpos naturais e células não linfóides (ETO *et al.*, 2012). Por outro lado, a resposta imune adaptativa é o resultado da cooperação entre linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos e anticorpos específicos, e tem duas propriedades básicas sendo a especificidade e a memória imunológica (FERNANDES *et al.*, 2013). A especificidade é a capacidade da molécula de anticorpo e dos receptores de membrana dos linfócitos T se ligarem ao antígeno específico. Enquanto a memória imunológica é um fenômeno relacionado à expansão clonal, ocorrendo a diferenciação de dois clones de células: efectoras e de memória, a partir de um linfócito B ou T específico para um antígeno. As células de memória são células que têm a mesma especificidade do linfócito B do qual são originadas e sobrevivem no organismo por um longo período de tempo (FELLAH; JAFFREDO; DUNON, 2008).

A resposta imune inata é composta de células fagocíticas, moléculas do sistema complemento e anticorpos naturais da classe IgM (KAISER, 2010). A fagocitose ocorre diretamente por meio de receptores de membrana dos fagócitos, ou por opsonização dos microrganismos e por anticorpos ou moléculas do complemento (TIZARD, 2010). A opsonização via anticorpos e molécula C1q do complemento interligam a resposta imune inata à resposta imune adaptativa, colaborando para a eliminação e neutralização do patógeno ou agente agressor (SCOTT, 2004). Desta forma a resposta imune adaptativa pode potencializar a resposta imune inata, facilitando a captura e fagocitose do microrganismo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Por outro lado, a resposta imune inata estimula a resposta imune adaptativa por meio da captura do antígeno por células especializadas, conhecidas como APCs, que apresentam peptídeos antigênicos aos linfócitos T, via moléculas de histocompatibilidade principal, e estimulam a ativação e produção de anticorpos pelos linfócitos B (MITCHELL; JOHNS, 2008).

A resposta imune adaptativa pode ser subdividida em resposta imune humoral e em resposta imune celular (ABBAS; LICHTMAN; SHIV, 2015). A primeira tem como moléculas efectoras os anticorpos produzidos pelos plasmócitos (VOGT, 2005). A resposta imune humoral é em parte, dependente dos linfócitos T auxiliares (CD4+), especificamente a população de células efectoras auxiliares do tipo 2 (*T helper 2*, Th2). Esta resposta é mais eficiente na eliminação de microrganismos extracelulares (ERF, 2008; MURPHY, 2014). A imunidade celular é dirigida contra patógenos intracelulares (vírus, bactérias e parasitas intracelulares) ou contra células alteradas do próprio organismo. Esta resposta é dependente de linfócitos T CD4+ sub-população efectora Th1, linfócitos T CD8+ (citotóxico) e células NK (OLÁH; VERVEDE, 2008).

As respostas imune celular e humoral estão ligadas aos órgãos e tecidos linfóides, e nas aves, os leucócitos, trombócitos e eritrócitos são gerados na medula óssea. Assim, o local onde os eritrócitos, os heterófilos, basófilos e eosinófilos e monócitos sofrem o processo de desenvolvimento e maturação e migram para a circulação sistêmica e para tecidos e órgãos linfóides secundários (ETO *et al.*, 2012).

2.3.1 Resposta imune humoral em aves

Na resposta imune humoral, os anticorpos são produzidos pelos linfócitos B e podem reconhecer antígenos por meio de imunoglobulinas de membrana, semelhante ao que ocorre em mamíferos (FERNANDES *et al.*, 2013). As imunoglobulinas presentes nas aves são a IgM, IgY e IgA (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002).

A IgM é o primeiro anticorpo a aparecer após uma infecção assim como a IgA, sendo que esta última se encontra presente nas secreções e mucosas. A classe IgY é classificada nas aves como sendo IgG e IgE dos mamíferos e aparecem posteriormente, além de ser mais específica para reconhecimento pelo linfócito B e produção de anticorpos (MORGULIS *et al.*, 2002).

As citocinas presentes na resposta imune humoral são IL-4, IL-5, IL-10 e o fator de crescimento transformador - β (TGF- β) (SCOTT, 2004). Em aves a IL-6 é responsável pela diferenciação das células B em plasmócitos secretores de anticorpos (RATCLIFFE, 2002). As citocinas IL-5 e IL-15 foram identificadas em aves e atuam na resposta humoral, na diferenciação das células B nos tecidos linfóides associado ao trato gastrointestinal (GALT) (HIROI *et al.*, 2000; RATCLIFFE, 2002).

2.3.2 Mecanismos de transferência de anticorpos maternos em aves

A transferência de anticorpos maternos nas aves ocorre através da passagem de anticorpos para a gema do ovo em desenvolvimento (CHALGHOUMI *et al.*, 2009). A transferência ocorre em duas etapas (HAMAL *et al.*, 2006), sendo que a primeira tem início com a deposição de anticorpos na gema, utilizando receptores para IgY localizados nos capilares presentes nos folículos ovarianos, que capturam estas moléculas da circulação sanguínea materna (WEST; HERR; BJORKMAN, 2004). A proporção de IgY depositada no folículo é proporcional a quantidade presente no soro materno. A porcentagem de IgY transferida do plasma materno para a gema é de 30%, enquanto apenas 1% de IgM e IgA são depositadas na clara, através dos tecidos linfóides ligados as mucosas do oviduto (HAMAL *et al.*, 2006).

A transferência de anticorpos na segunda etapa é feita no saco da gema para o embrião em formação. Acredita-se que os anticorpos IgY sejam transferidos por difusão do saco da gema para a circulação embrionária. A transferência de IgY inicia-se no 7º dia do estágio embrionário e aumenta progressivamente do 14º ao 21º dias da vida intra-ovo

(CARLANDER, 2002). A IgA e IgM são imunoglobulinas predominantes na clara do ovo e sua taxa de transferência da circulação maternal sistêmica para a prole é de 1% (FAULKNER *et al.*, 2013)

2.3.3 Aplicação da IgY na imunoterapia e imunodiagnóstico

As aves produzem anticorpos com alto grau de afinidade contra antígenos de mamíferos, devido à distância filogenética entre aves e mamíferos (CHACANA *et al.*, 2004; SPILLNER *et al.*, 2012). A IgY reconhece mais epítomos quando o imunógeno utilizado é uma proteína de mamífero altamente conservada o que pode resultar na amplificação do sinal (CARLANDER, 2002; MUNHOZ *et al.*, 2014). Estudos mostraram que as aves têm anticorpos com 3 a 5 vezes mais afinidade para anticorpos de suínos do que a IgG de coelho, amplificando o sinal no teste imunológico (OLOVSSON; LARSSON, 1993; MUNHOZ *et al.*, 2014).

Estas características mostraram vantagens substanciais da tecnologia IgY em muitas áreas médicas, especialmente para imunodiagnóstico. Os anticorpos IgY específicos demonstraram serem efetivos contra ampla variedade de antígenos incluindo proteínas, componentes de vírus, bactérias e fungos (SCHADE *et al.*, 1994; MUNHOZ *et al.*, 2014).

Devido a especificidade dos anticorpos IgY para a ligação e inativação de moléculas tóxicas ou antígenos (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004), estes podem ser utilizados para diagnóstico, terapia e inativação de substâncias (TAVARES *et al.*, 2013). Os anticorpos específicos, policlonais ou monoclonais, são obtidos principalmente de mamíferos (NARAT, 2003; TAVARES *et al.*, 2013). De maneira alternativa, os anticorpos purificados da gema de ovos de galinhas poedeiras imunizadas, a IgY tem propriedades distintas que podem ser exploradas em vários campos de pesquisa, imunoterapia e estudos de proteômica (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; MUNHOZ *et al.*, 2014).

A IgY tem massa molecular de aproximadamente 160 kDa, apresenta ponto isoelétrico variando entre 5,7 e 7,6 e é constituída por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Cada cadeia leve apresenta massa molecular de aproximadamente 18 kDa, é formada por uma região variável e uma região constante. A cadeia pesada tem uma massa molecular de 65 kDa e é formada por uma região variável e quatro regiões constantes. Como ocorre na IgG de mamíferos a região Fc da IgY aviária é responsável por suas funções biológicas

efetoras como a fixação do complemento e opsonização (CARLANDER, 2002; MUNHOZ *et al.*, 2014).

O uso da IgY representa uma alternativa interessante para o controle e prevenção de enfermidades infecciosas em peixes, além de sua produção ter baixo custo, podendo ser produzida em grandes escalas, e não é necessário eutanasiar a ave (CHACANA, 2004; BAE *et al.*, 2009; ETO *et al.*, 2018).

A porção Fc da IgY não ativa o sistema complemento, nem apresenta reações cruzadas com fatores reumatóides. Assim, minimizam as falsas reações positivas quando são avaliados marcadores de inflamação como a proteína C reativa, uma característica importante para o estudo dos processos inflamatórios. Além disso, a IgY apresenta menor fluorescência inespecífica em preparações imunofluorescentes (ETO *et al.*, 2018) e também pode ser usada na maioria dos testes de aglutinação (MUNHOZ *et al.*, 2014).

Galinhas poedeiras inoculadas com antígenos bacterianos transferem anticorpos específicos da classe IgY para gema do ovo (MORRISON *et al.*, 2001). A imunoglobulina pode ser purificada e transferida para imunização do hospedeiro (CHACANA *et al.*, 2004; MUNHOZ *et al.*, 2014).

A transferência passiva de IgY como método profilático contra doenças infecciosas neutraliza a aderência de agentes microbianos aos tecidos alvo, como observado em estudos sobre a profilaxia de diarreia de leitões por *Escherichia coli*, em micoses causadas por *Candida albicans*, a cinomose de cães e contra toxinas de venenos de animais peçonhentos (CHALGHOUMI *et al.*, 2009). O tratamento com anticorpos IgY, específicos para antígenos de *Edwardsiella sp.*, administrados diretamente na água, apresentou níveis relevantes de proteção em enguias japonesas (HATTA *et al.*, 1994). Em trutas arco-íris a administração de IgY anti-*Yersinia ruckeri* na ração resultou na proteção contra infecção (LEE *et al.*, 2000). Os anticorpos IgY específicos na profilaxia e terapêutica das infecções estreptocócicas, poderiam reduzir a resistência causada pelo uso indiscriminado de antibióticos (CHACANA *et al.*, 2004).

Posto isso, a maioria das enfermidades bacterianas dos peixes de cultivo tem como agentes bacterianos comensais, causando infecção ao hospedeiro em função da imunossupressão causada pelo estresse (MORAES; MORAES, 2009). Por isso, a efetividade da resposta imune aos agentes bacterianos depende dos níveis de estresse a qual os peixes

são submetidos. Este tipo de problema não afetaria a efetividade da imunização produzida pela transferência passiva de anticorpos IgY específicos.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo central do presente estudo é a produção e purificação da imunoglobulina Y extraída da gema de ovo de galinhas poedeiras, específica para proteínas de membrana e citoplasmática da *Aeromonas hydrophila* e sua utilização no imunodiagnóstico, assim como investigar o potencial imunoterapêutico da IgY anti-*A. hydrophila* na atividade fagolisossômica de MΦs de tilápias-do-nilo (*O. niloticus*) infectados com *A. hydrophila in vitro*.

3.1 Objetivos Específicos

- 1- Separar e purificar as frações citoplasmáticas e de membrana de células bacterianas de *A. hydrophila*;
- 2- Produzir e purificar anticorpos IgY monoespecíficos policlonais em galinhas poedeiras inoculadas com as frações citoplasmática e de membrana de *A. hydrophila* e avaliar o índice de avidéz, afinidade e especificidade da IgY produzida até 150 dias;
- 3- Utilizar a IgY específica para proteínas de *A. hydrophila* no imunodiagnóstico, com as técnicas de imunofluorescência direta e imuno-histoquímica, além de avaliar o perfil fisiopatológico em tecidos infectados de tilápias-do-nilo com *A. hydrophila*;
- 4- Isolar, cultivar e caracterizar MΦs da bexiga natatória de tilápias-do-nilo utilizados *in vitro* como modelo experimental;
- 5- Investigar *in vitro* a capacidade fagocítica dos MΦs de tilápias-do-nilo desafiadas com *A. hydrophila*, comparando a ação do anticorpo IgY anti-*A. hydrophila* na neutralização e opsonização da bactéria;
- 6- Demonstrar a fagocitose na presença ou não de IgY anti-*A. hydrophila*, pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura, transmissão e fluorescência direta e
- 7- Testar os efeitos moduladores da IgY anti-*A. hydrophila* na atividade lisossômica e fagolisossômica, e por fim na viabilidade intracelular do patógeno e na atividade/proliferação dos MΦs durante o percurso da infecção nos tempos de 6, 24 e 48 horas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System**. 15 ed. Elsevier. Sta Louis, Missouri, 2015.
- AKIRA, S. TLR signaling. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 311, p. 1-16, 2006.
- AUSTIN, B.; ADAMS, C. **Fish pathogens**, p. 197–243. In B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling, and S. Joseph (ed.), *The genus Aeromonas*. JohnWiley & Sons Ltd., West Sussex, England, 1996.
- BAE, H. D.; KITAGUCHI, K.; HORIO, F.; MURAI, A. Higher incorporation of heterologous chicken immunoglobulin Y compared with homologous quail immunoglobulin Y into egg yolks of Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Poultry Science**, v. 88, p. 1703-1711, 2009.
- BILLER-TAKAHASHI, J.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 1483-1495, 2014.
- BERNSTEIN, R. M; SCHLUTER, S. F; MARCHALONIS, J. J. Immunity. In: EVANS, D.H. **The physiology of fishes**. 2. ed. London: CRC Press LLC, p. 215-242, 1998.
- BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and emagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p.334-339, 2001.
- BLY, J. E.; CLEM, L. W. 1994. **Temperature adaptation of lymphocyte function in fish**. In: COSSINS, A. R. (ed.). *Temperature adaptation of biological membranes*. London: Portland Press, p. 169-184.
- BORCHARDT, M. A.; STEMPER, M. E.; STANDRIDGE, J. H. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and ground water compared by pulsed-field gel electrophoresis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 224-228, 2003.
- BOSSI-KÜPFER, M.; GENINI, A.; PEDUZZI, R.; DEMARTA, A. Tracheobronchitis caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* after near-drowning. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1563-1564, 2007.
- BRADSHAW, C. M.; RICHARD, A. S.; SIGEL, M. M. IgM antibodies in fish mucus. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 136, p. 1122 -1124, 1971.
- BRAUN-NESJE, R.; KAPLAN, G.; SELJELID, R. Rainbow trout macrophages in vitro: Morphology and phagocytic activity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 6, p. 281-291, 1982.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPINSCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-461, 2010.

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

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3703-3713, 1999.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M. J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; APARICIO, G. O.; GUARRO, J.; CHACÓN, M. R. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for consumption in México. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p.41-49, 2003.

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, 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.

COSTA, A. B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. Orientador: Jose Eurico Possebon Cyrino. 2003. 54 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DAVIES, B.; CHATTINGS, L. S.; EDWARDS, S. W. Superoxide generation during phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*: similarities to the respiratory burst of immune phagocytes. **Journal of General Microbiology**, 137, v. 705-710, 1991.

DESJARDINS, M.; HOUDE, M.; GAGNON, E. Phagocytosis: The convoluted way from nutrition to adaptive immunity. **Immunological Reviews Journal**, v. 207, p. 158-165, 2005.

DI PINTO, A.; TERIO, V.; DI PINTO, P.; TANTILLO, G. Detection of potentially pathogenic *Aeromonas* isolates from ready-to-eat seafood products by PCR analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 269-273, 2012.

ENANE, N. A.; FRENKEL, K.; O’CONNOR, J. M.; SQUIBB, K. S.; ZELIKOFF, J. T. Biological markers of macrophage activation: Applications for fish phagocytes. **Immunology**, v. 80, p. 68-72, 1993.

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

ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Phagocytic defence mechanism in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): An ultrastructural study. **Anatomical Record**, v. 240, p. 589-597, 1994.

ESTEBAN, M. A.; CUESTA, A.; CHAVES-POZO, E.; MESEGUER, J. Phagocytosis in Teleosts. Implications of the New Cells Involved. **Biology**, v. 4, p. 907-922, 2015.

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

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

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; BALDASSI, A. C.; MANRIQUE, W. G.; SILVA, I. C.; MEDEIROS, A. S. R.; BELO, M. A. A.; BALBUENA, T. S.; SAMARA, S. I.; PIZAURO, J. M. Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 76, 153-160, 2018.

FALKOW, S. 1990. The “zen” of bacterial pathogenicity, p. 3-9. In B. H. Iglewski and V. L. Clark (ed.), Molecular basis of bacterial pathogenesis. Academic Press, San Diego, CA.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation. **The state of world fisheries and aquaculture**. Roma: FAO, 2016. Disponível em <<http://www.fao.org/3/ai5555e.pdf>> <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

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

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

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSSO, PAULO F.; LOUREIRO, B. A. Biologia do Sistema Imune de Aves: Revisão. **Ensaio e Ciência**, v. 17, p. 131-140, 2013.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; MORAES, A. C.; PRADO, J. R. P.; MEDEIROS, A. R.; BELO, M. A. A.; SAMARA, S. I.; COSTA, P. I.; PIZAURO, J. M. Atividade fagolisossômica de macrófagos de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) infectados in vitro por *Aeromonas hydrophila*: Infecção e imunoterapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, p. 51-61, 2019.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 08-14, 2008.

FIORENTINI, C.; BARBIERI, E.; FALZANO, L.; BAFFONE, W.; PIANETTI, A.; KATOULI, M.; KÜHN, I.; MÖLLBY, R.; BRUSCOLINI, F.; CASIERE, A.; DONELLI, G. Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 501-511, 1998.

FLANNAGAN, R. S.; JAUMOUILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **The Annual Review of Pathology**, v. 7, p. 61-98, 2012.

FORNARI, C. A. C.; COSTA, R. P. B.; CAROLINE PIRES, C. R. F.; KATO, H. C. A.; SOUSA, D. N. Estudo sobre os hábitos alimentares e de consumo de pescado da população de Palmas (TO). **Revista Desafios**, v. 4, p. 136-142, 2017.

GUERRA, I. M. F.; FADENELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A. P. L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, 2007.

HAMAL, K. R.; BURGESS, C.; PEVZNER, I. Y.; ERF, G. F. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. **Poultry Science**, v. 22, p. 1364-1372, 2006

HÄNNINEN, M. L.; OIVANEN, P.; HIRVELÄ-KOSKI, V. *Aeromonas* species in fish, fisheggs, shrimps and freshwater. **Food Microbiology**, v. 34, p. 17-26, 1997.

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

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

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

HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; PICCOLI, R. H.; LOGATO, P. V. R.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, p. 35-73, 2010.

- JORGENSEN, J. H.; HINDLER, J. F. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. **Clinical Infection Diseases**, v. 44, p. 280-286, 2007.
- KAATTARI, S. L. Fish B lymphocytes: defining their form and function. **Annual Review Of Fish Diseases**, v. 2, p. 161-180, 1992.
- KAISER, P. **Advances in avian immunology - prospects for disease control: a review**. Avian pathology, Oxford, v. 39, n. 5, p. 309-324, 2010.
- KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2004.
- KINGOMBE, C. I. B.; D'AOUST, J.; HUYS, G.; HOFMANN, L.; RAO, M.; KWAN, J. Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 425-433, 2010.
- KUNIMOTO, D.; RENNIE, R.; CITRON, D. M.; GOLDSTEIN, E. J. C. Bacteriology of a bear bite wound to a human: case report. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3374-3376, 2004.
- LEE, S. B.; MINEY, Y.; STEVENSON, R. M. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 110-115, 2000.
- LYNCH, M. J.; SWIFT, S.; KIRKE, D. F.; KEEVIL, C. W.; DODD, C. E.; WILLIAMS, P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 18-28, 2002.
- MACARI, M.; FURLAN, R. R.; GONZALES, E. 2002. **Fisiologia aviaria aplicada a frangos de corte**. 2. ed. São Paulo: FUNEP.
- MAGNADOTTIR, B.; AUDUNSDOTTIR, S. S.; BRAGASON, B. T. H.; GISLADOTTIR, B.; JONSSON, Z. O.; GUDMUNDSDOTTIR, S. The acute phase response of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Humoral and cellular responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 1124-1130, 2011.
- MARCHALONIS, J. J.; SCHLUTER, S. F.; BERNSTEIN, R. M.; HOHMAN, V. S. Antibodies of sharks: revolution and evolution. **Immunological Reviews**, v. 166, p. 103-122, 1998.
- MARTI, E.; JOFRE, J.; BALCAZAR, J. L. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. **PLoS One**, v. 8, p. 1-8, 2013.
- MASHOOF, S.; CRISCITIELLO, M. F. Fish Immunoglobulins. **Biology**, v. 45, p. 1-23, 2016.

- MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Inflamação aguda e crônica**. In: Robbins & Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 29-54, 2006.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. J. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 44, p. 338-343, 2000.
- MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian haematology and associated disorders. **Veterinary Clinics: Exotic Animal**, v. 11, n. 3, p. 501-522, 2008.
- MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. **Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico**. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 625-723.
- MORETTI, J.; BLANDER, J. M. Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes. **Current Opinion in Immunology**, v. 26, p. 100-110, 2014.
- MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 231-245.
- MORRISON, S.; MOHAMMED, S. M.; WIMS, L. A.; TRINH, K. R.; ETCHES, R. J. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 619-625, 2001.
- MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NARAT, M. Production of antibodies in chickens. **Food Technology Biotechnology**, v. 41, p. 259-267, 2003.
- NEUMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A. J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 807-825, 2001.
- NIKOSKELAINEN, S.; VERHO, S.; AIRAS, K.; LILIUS, E. M. Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by bacterium *Aeromonas salmonicida* can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, p. 525-537, 2005.
- OLÁH, I.; VERVELDE, L. 2008, **Structure of the avian lymphoid system**. In: DAVISON, F.; BERND, K. SCHAT, K. A. Avian Immunology. London: Elsevier. cap. 2, p. 13-50.
- OLOVSSON, M.; LARSSON, A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, p. 145-152, 1993.

PEDRERA, I. M.; COLLAZOS, M. E.; ORTEGA, E.; BARRIGA, C. In vitro study of the phagocytic processes in splenic granulocyte of the tench (*Tinca tinca*, L.). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 16, p. 431-439, 1992

PEIXOTO, L. J. S.; SÁ, M. C. A.; GORDIANO, L. A.; COSTA, M. M. *Aeromonas* spp.: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p.453-461, 2012.

PEREIRA, C. S.; AMORIM, S. D.; SANTOS A. F. M.; REIS, C. M. F.; THEOPHILO, G. N. G.; RODRIGUES, D. P. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, 2008.

PILARSKI, F.; SAKABE, R. **Principais enfermidades diagnosticadas no Estado de São Paulo: Profilaxia ou Tratamento?** In: PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M.; CYRINO, J. E. P.; FERNANDES JÚNIOR, A. C. (Ed). Anais do 3º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes, Botucatu, 2009, p.101-130.

PEIXE BR. **Anuário PeixeBR da Piscicultura**. 2019. Produção brasileira cresce 4,5% e atinge 722.560 t.

PRESS, C. M.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 309-318, 1999.

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

RIEGER, A. M.; KONOWALCHUK, J. D.; GRAYFER, L.; KATZENBACK, B. A.; HAVIXBECK, J. J.; KIEMELE, M. D.; BELOSEVIC, M.; BARREDA, D. R. Fish and mammalian phagocytes differentially regulate pro-inflammatory and homeostatic responses in vivo. **PLoS One**, v. 7, e47070, 2012.

SCOARIS, D. O.; BIZERRA, F. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; ABREU FILHO, B. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. The occurrence of *Aeromonas* spp. in bottled mineral water, well water and tap water from the municipal supplies. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n.5, p. 1049-1055, 2008.

SCHADE, R. BÜRGER, W.; SCHÖNEBERG, T.; SCHNIERING, A.; SCHWARZKOPF, C.; HLINAK, A.; KOBILKE, H. Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. **Alternativen zu Tierexperimenten**, v. 11, p. 75-84, 1994.

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

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

SPELLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S.; DU PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v. 40, p. 13-22, 2012.

SWANN, L.; WHITE, M. 1991. **Diagnosis and Treatment of “*Aeromonas hydrophila*” Infection of Fish**. Urbana, IL: Illinois-Indiana Sea Grant Program.

TAVARES, T. C. F.; SOARES, P. M.; NEVES, J. H. F.; SOARES, M. M.; JUNIOR, A. F.; SOUZA, D. L. N.; ÁVILA, V. M. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Produção e purificação de imunoglobulinas Y policlonais anti-*Leptospira* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 97-102, 2013.

TAVARES, A. B.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Occurrence of *Aeromonas* spp. In foods of animal origin and its importance in public health. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-8, 2015.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**, New York, v. 199, n. 1, p. 19-48, 2010.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Chapter 2: Innate Immunity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 1-17, 2010.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486-503, 2011.

VELIKOVSKY, C. A.; DENG, L.; TASUMI, S.; IYER, L. M.; KERZIC, M. C.; ARAVIND, L.; PANCER, Z.; MARIUZZA, R. A. Structure of a lamprey variable lymphocyte receptor in complex with a protein antigen. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, p. 725-730, 2009.

VILA, J.; RUIZ, J.; GALLARDO, F.; VARGAS, M.; SOLER, L.; FIGUERAS, M. J.; GASCON, J. *Aeromonas* spp. and Traveler's Diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, 2003.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; lakshmanaperumalsamy, p. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 165-168, 2002.

VOGT, L. K. **Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte**. 2005. 160 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

VOSS, L. M.; RHODES, K. H.; JOHNSON, K. A. Musculoskeletal and soft tissue *Aeromonas* infection: an environmental disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 67, p. 422-427, 1992.

ZHANG, L.; WANG, C. C. Inflammatory response of macrophages in infection. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 13, p. 138-152, 2014.

ZIMMERMAN, A. M.; MOUSTAFA, F. M.; ROMANOWSKI, K. E.; STEINER, L. A. Zebrafish immunoglobulin IgD: unusual exon usage and quantitative expression profiles with IgM and IgZ/T heavy chain isotypes. **Molecular Immunology**, v. 48, p. 15-16, 2011.

WATTS, M.; MUNDAY, B. L.; BURKE, C. M. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 153-164, 2001.

WILSON, M. R.; VAN RAVENSTEIN, E.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W.; MIDDLETON, D. L.; WARR, G. W. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 153-164, 1995.

WILSON, M.; BENGTE, N. E.; MILLER, N.; CLEM, L. W.; DU PASQUIER, L.; WARR, G. W. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 4593-4597, 1997.

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

WONG, C. Y. F.; HEUZENROEDER, M. W.; FLOWER, R. L. P. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. **Microbiology**, v.144, p.291-298, 1998.

CAPÍTULO II – Imunoglobulina Y no diagnóstico da infecção por *Aeromonas hydrophila* em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)

Artigo publicado na revista Aquaculture, intitulado como “Immunoglobulin Y in the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)”, volume 500, páginas 576-585, 2019.

RESUMO

A bactéria *A. hydrophila* é um bastonete, Gram-negativa, móvel e de vida aquática, infecta dentre as espécies os peixes, mamíferos e humanos. Devido à importância deste patógeno para a sanidade aquícola e saúde pública, o presente estudo produziu uma imunoglobulina Y específica, imunizando galinhas poedeiras com proteínas celulares de *A. hydrophila* e testou sua eficácia na detecção desta bactéria pelo método de imunofluorescência direta e imunohistoquímica indireta nos tecidos de tilápias-do-nilo infectados. A IgY produzida teve especificidade e afinidade para as proteínas de membrana e citoplasmática de *A. hydrophila*, essas peculiaridades, possibilitaram a localização intracelular da bactéria e suas proteínas no fagossoma dos fagócitos e extracelular colonizando o tecido do hospedeiro. Desta forma, os achados trouxeram uma nova perspectiva no uso da IgY para o diagnóstico e estudo da patogênese por *A. hydrophila* e mostrou a tilápia-do-nilo como biomodelo de estudo para esta enfermidade.

Palavras-chaves: Imunodiagnóstico. Anticorpo. Aeromonose. Teleósteo. Sepsé.

ABSTRACT

A. hydrophila are rod-shaped, Gram-negative, motile aquatic bacteria that can infect fish and mammals, including humans. Due to the importance of this pathogen for fish farming and public health, the present study produced a specific immunoglobulin (Ig) Y by immunizing laying hens with *A. hydrophila* cell proteins. The antibody efficacy in detecting *A. hydrophila* was tested by direct immunofluorescence and indirect immunohistochemistry using tissues from infected Nile tilapia. The produced IgY exhibited specificity and affinity for membrane and cytoplasmic *A. hydrophila* proteins, which enabled detection of the intracellular localization of the bacteria and their proteins within the phagosomes of phagocytes and

detection of extracellular bacteria colonizing host tissues. Thus, the findings offer a new perspective on the use of IgY for the diagnosis and analysis of *A. hydrophila* pathogenesis, and the Nile tilapia is an appropriate biomodel to study this disease.

Keywords: Immunodiagnosis. Antibody. Aeromonosis. Teleost. Sepsis.

1 INTRODUÇÃO

A *A. hydrophila* pertence à família *Aeromonadaceae* é Gram negativa, possui cápsula, é aeróbia e anaeróbia facultativa, tem forma de bastonete móvel, possui flagelos polares e não produz esporos (JANDA; ABBOTT, 2010). A infecção por *A. hydrophila* inicia-se com a aderência, invasão, colonização e disseminação sistêmica para os órgãos vitais, com instalação do quadro da síndrome inflamatória sistêmica, seguido de falência orgânica múltipla e morte do hospedeiro (PARKER *et al.*, 2011). A bactéria é considerada a mais virulenta dentre o complexo das *Aeromonas* móveis (RHODES *et al.*, 2000). Além disso, está associada às doenças humanas como patógeno veiculado à água e alimentos contaminados (ZHANG *et al.*, 2016). Na tilápia-do-nilo a infecção por *A. hydrophila* é caracterizada por úlceras dérmicas, lesões hemorrágicas nas nadadeiras e sua disseminação nos tecidos causam inflamação, necrose e falência múltipla dos órgãos (STRATEV *et al.*, 2015).

A migração da *A. hydrophila* para os órgãos vitais está sob a regência direta dos fatores de virulência como a cápsula de polissacarídeo, lipopolissacarídeo, exotoxinas, enzimas extracelulares, fímbrias e flagelos entre outros (TOMÁS, 2012). A primícia, a cápsula de polissacarídeo e a enzima dismutase têm função de evasão dos mecanismos fagocíticos, através do bloqueio físico e químico respectivamente da atividade fagolisossômica, resultando na sobrevivência intracelular no fagócito do hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2003). Todos estes mecanismos de virulência operam na capacidade da *A. hydrophila* em sobreviver e colonizar o tecido do hospedeiro, desta forma o desenvolvimento de biomarcadores para o diagnóstico e estudo do mecanismo da migração são essenciais para o entendimento da doença.

Revisões bem fundamentadas têm relatado a eficácia da IgY das aves, como biomarcadora para o diagnóstico de doenças infectocontagiosas (CHALGHOUMI *et al.*, 2009) e neoplásicas (XIAO *et al.*, 2008). No tratamento de infecções microbianas em

organismos aquáticos foi demonstrado para *Vibrio anguillarum* em *Cynoglossus semilaevis* (GAO *et al.*, 2016), *Shewanella marisflavi* em *Apostichopus japonicus* (XU *et al.*, 2019) e para o tratamento do Vírus da Síndrome da Mancha Branca em camarão (LU *et al.*, 2008). A IgY é produzida nos órgãos linfóides secundários das aves, após o estímulo antigênico (ETO *et al.*, 2012) e transferida da circulação sistêmica para a gema, por translocação via receptores específicos para a fração constante (Fc) da IgY presentes nas células endoteliais dos vasos sanguíneos que circundam o ovócito (TESAR *et al.*, 2013). A produção de anticorpos em aves está diretamente relacionada ao bem estar animal, visto que a IgY é extraída e purificada da gema de galinhas poedeiras, sem a necessidade de sangria ou sacrifício do animal como ocorre na produção de poli/monoclonal em mamíferos (ANDRADE *et al.*, 2013). A IgY da ave é funcionalmente semelhante a IgG de mamíferos e teve efetividade superior quando aplicada para a imuno-histoquímica (IHC) (MUNHOZ *et al.*, 2014) e imunofluorescência (IMF) (BENTES *et al.*, 2015), por não apresentar reação cruzada com os fatores reumatóides de espécies filogeneticamente distantes, reduzindo assim, as reações falso positivas para ensaios imunológicos (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

Devido a estes fatos e a importância da *A. hydrophila* como patógeno na saúde animal e humana, uma IgY específica para proteínas bacterianas de *A. hydrophila* foi produzida, para o diagnóstico e estudo do percurso infeccioso desta bactéria na tilápia-do-nilo como modelo experimental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Comitê de ética

O experimento foi realizado de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ FCAV/ UNESP protocolo número 017204/15).

2.2 Preparação do antígeno

A cepa de *A. hydrophila* (número de acesso GenBank: MH305534.1) foi cultivada e a separação de proteínas realizada de acordo com Sato *et al.* (2016) com modificações. Resumidamente, a bactéria foi semeada em meio caldo triptona de soja (TSB) (Difco, Detroit, MI, USA), incubada por 24 h, a 28 °C, e o meio de cultura removido por centrifugação por 10

min a 10.000 xg, e o pellet bacteriano lavado com PBS 0.15 M pH 7,4 e suspenso em Tris HCl 50 mM pH 7,8 a uma densidade de 10^8 UFC/mL. Na sequência, as células foram lisadas no sonicador ultrassônico Sonifier 250 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) e as células intactas foram removidas por centrifugação durante 20 min a 2.000 xg e o sobrenadante filtrado em filtro 0,22 μ m, seguido de ultracentrifugação (Beckman, Optima L-80 K) durante 2 h a 100.000 xg. O pellet contendo as proteínas de membrana (PMs), e o sobrenadante com as proteínas citoplasmáticas (PCs) foram dosados pelo método de Bradford (1976) e armazenados a -70 °C.

2.3 Imunização e coleta de soro e gema das aves

Vinte galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn* (*Gallus gallus domesticus*) com 20 semanas de idade, foram mantidas em gaiolas individuais em temperatura ambiente com 17 h de luz/dia com água potável na temperatura ambiente entre 26-29 °C e ração comercial de postura a vontade. As aves imunizadas (n= 10) (IgY específica), receberam a fração bacteriana total contendo as PMs e PCs de *A. hydrophila* na concentração de 100 μ g/mL, no volume de 200 μ L, diluído em PBS 0.15 M pH 7.4, conjugado com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), injetado em dois pontos distintos do músculo peitoral e as aves controle (n= 10) (IgY inespecífica), inoculadas apenas com solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65%. Após a primeira imunização no dia 0, duas doses reforço foram feitas com 30 e 90 dias e a coleta de sangue e ovos procedeu-se nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 150°.

2.4 Análise do título da IgY

O título da IgY específica e inespecífica para PMs e PCs de *A. hydrophila* foi determinado por ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) de acordo com Shi *et al.* (2017). A placa de microtitulação foi pré-sensibilizada com as frações PMs e PCs na concentração de 10 μ g/mL. Os soros das aves imunizadas e o controle foram diluídos na proporção de 1:2.000 e adsorvidos no volume de 200 μ l/poço. A IgG de coelho anti-IgY ligada à peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, diluição 1:30.000) foi usada como anticorpo secundário. A reação foi revelada com substrato/cromógeno (H_2O_2 /ABST) e a leitura realizada em leitor de microplaca (Molecular Devices SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 640 nm.

2.5 Afinidade da IgY

Após a incubação do soro como descrito no item anterior a placa foi lavada e foram adicionados 100 µL/poço de cloreto de magnésio 2 M, e na amostra controle 100 µL/poço de PBS. Após 30 min em temperatura ambiente, a placa foi lavada com PBS-Tween e adicionado 100 µL/poço de IgG de coelho anti-IgY e incubado por uma hora, em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e adicionados 100 µL/poço de substrato/cromógeno (H₂O₂/ABTS) e absorbância medida a 640 nm. Os valores foram transformados em índice de afinidade.

2.6 Purificação da IgY

Os anticorpos IgY foram purificados de acordo com a metodologia descrita por Pauly *et al.* (2011). A gema do ovo foi diluída 3 vezes em polietilenoglicol (PEG) (Sigma Aldrich Laboratory, Steinheim, Alemanha) na concentração de 4,66% e centrifugada a 10.000 xg, por 15 min à 4 °C. Após, o sobrenadante foi filtrado e diluído em PEG a 48% e novamente centrifugado a 10.000 xg 15 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 2 mL de PBS 0,15 M pH 7,2 e dialisado em solução salina 1% durante 18 h a temperatura de 4 °C, sob agitação contínua.

2.7 SDS-PAGE

A pureza da IgY e as proteínas bacterianas foram avaliadas por meio de eletroforese de gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). O extrato da IgY (20, 40 e 80 µg/mL) e das proteínas bacterianas (8.0 µg/mL) foram adicionados ao gel SDS-PAGE a 9,0% em tampão tris-glicina e corados com Coomassie brilhante azul R 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e analisados em software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

2.8 Western blotting

O gel com as proteínas foi transferido para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sob voltagem constante (90 V), a 4 °C, durante uma h. A seguir a membrana foi incubada com PBS-leite (Molico, Nestlé Brazil, São Paulo, Brazil) a 10% 0,25 M pH 7,2, em temperatura ambiente, por 2 h, sob agitação contínua, lavada com PBS-Tween 20 0,1% e, incubada sob agitação por 2 h, com solução IgY anti- *A. hydrophila* (1 mg/mL), dissolvida em PBS na proporção de 1:2.000, lavada com PBS-Tween 20 0,1%, e o

conjugado anti-IgY peroxidase, diluído em PBS 0,25 M pH 7,2 a 1% na proporção de 1:2.000, adicionado a membrana e incubado por uma h, sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi novamente lavada com PBS-Tween 20 0,1%, e o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) incubado. A reação foi bloqueada com adição de água destilada deionizada e a membrana escaneada e analisada com Image Lab software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.9 Sensibilidade da IgY

A sensibilidade da IgY específica e inespecífica reagente com as PMs e PCs, foi realizada em placa de microtitulação, para tal foram adicionadas quatro concentrações das proteínas 5, 10, 15 e 20 µg/mL incubadas durante 18 h à 4 °C. Como anticorpo primário a IgY específica e inespecífica foram adicionadas nas mesmas concentrações das proteínas. Outras etapas do procedimento foram realizadas de acordo com o item 2.4.

2.10 Conjugação da IgY com FITC

Os extratos purificados da IgY específica e inespecífica, foram conjugados com o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) seguindo a recomendação do fabricante. De maneira que a solução de 1 mg/mL de FITC foi preparada e 50 µL adicionado lentamente em uma solução na concentração de 1 mg/mL da IgY diluída em PBS 0,15M pH 7,4 deixado em rotação por 4 h a 4 °C. Em seguida a solução foi saturada com 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e a reação bloqueada com solução de nitrato de amônia (NH₄) 25 mM. Na sequência foi adicionado xileno cianol e a solução filtrada em coluna de resina Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e a fração contendo a IgY conjugada foi coletada e armazenada a -20 °C.

2.11 Obtenção dos tecidos infectados

Tilápias-do-nilo (180,5 ± 7g, n= 10) foram distribuídas aleatoriamente em dois tanques com capacidade para 1.500 L cada (5 peixes/ tanque). No período experimental, a qualidade da água permaneceu na faixa de conforto do peixe (DO: 7,0 ± 0,5 mg L⁻¹; T °: 25,0 ± 1,2 °C; pH: 7,2 ± 0,5; e condutividade: 141,4 ± 15,8 S cm⁻¹). Foi usada uma sonda de parâmetro (YSI Models 55-63, Chicago, EUA). Os peixes foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, GER) (1: 20.000 v/ v) diluído

em etanol a 98% (0,1 g / mL) e desafiados com a dose letal 50 (DL50) pré-determinada com cepa viva de *A. hydrophila* (aproximadamente $1,8 \times 10^9$ UFC/mL), inoculada na bexiga natatória no volume de 100 µL/peixe, o grupo controle (n= 10) recebeu 100 µL/peixe de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65%. Após 48 h os peixes foram eutanasiados e submetidos à anestesia com benzocaína (Sigma Aldrich Laboratory, Steinheim, Alemanha) diluída em etanol a 98% (1:500 v/v).

2.12 Exame histopatológico

Fragmentos de pele, baço, fígado, rim, brânquia, coração e cérebro foram coletados e fixados em formaldeído 10% em tampão fosfato por 24 h. Estas amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina. Em resumo, as secções de bloco de parafina com uma espessura de 5 µm foram cortadas e montadas em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (H&E).

2.13 Imunofluorescência

O método de imunofluorescência foi feito em tecido parafinizado de acordo como descrito por Robertson *et al.* (2008). Os cortes do tecido foram desparafinizados e hidratados e a recuperação antigênica feita em calor úmido com tampão tris EDTA pH 7,4, por 10 min. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena, durante uma h, seguido de um banho em tampão tris HCl pH 7,4, por 5 min e um novo bloqueio dos sítios inespecíficos. As lâminas dos tecidos foram incubadas com 1:2.000 de IgY específica e com IgY inespecífica, conjugadas com FITC e incubadas por 18 h em câmara escura e úmida à 4 °C. As lâminas foram lavadas com PBS-Tween 20 e o núcleo foi marcado com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), montadas com *Fluoromount* e analisadas em microscópio de fluorescência (série Olympus BX56; Olympus Life Ciência, Center Valley, PA, EUA).

2.14 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada de acordo com Eto *et al.* (2018). A desparafinização, recuperação antigênica e os bloqueios, foram executados como descrito no item 2.13. Após os bloqueios e lavagem, a lâmina foi incubada com a IgY específica e IgY inespecífica, na diluição de 1:1.000, durante 18 h à 4 °C. Em seguida, o anticorpo IgG de

coelho anti-IgY ligado a peroxidase na diluição de 1:2.000 foi incubado por 2 h e revelado com substrato DAB. As lâminas foram montadas e analisadas em microscopia de luz e as imagens capturadas Olympus Stream Software (Olympus Life Science, Center Valley, PA, EUA).

2.15 Análise estatística

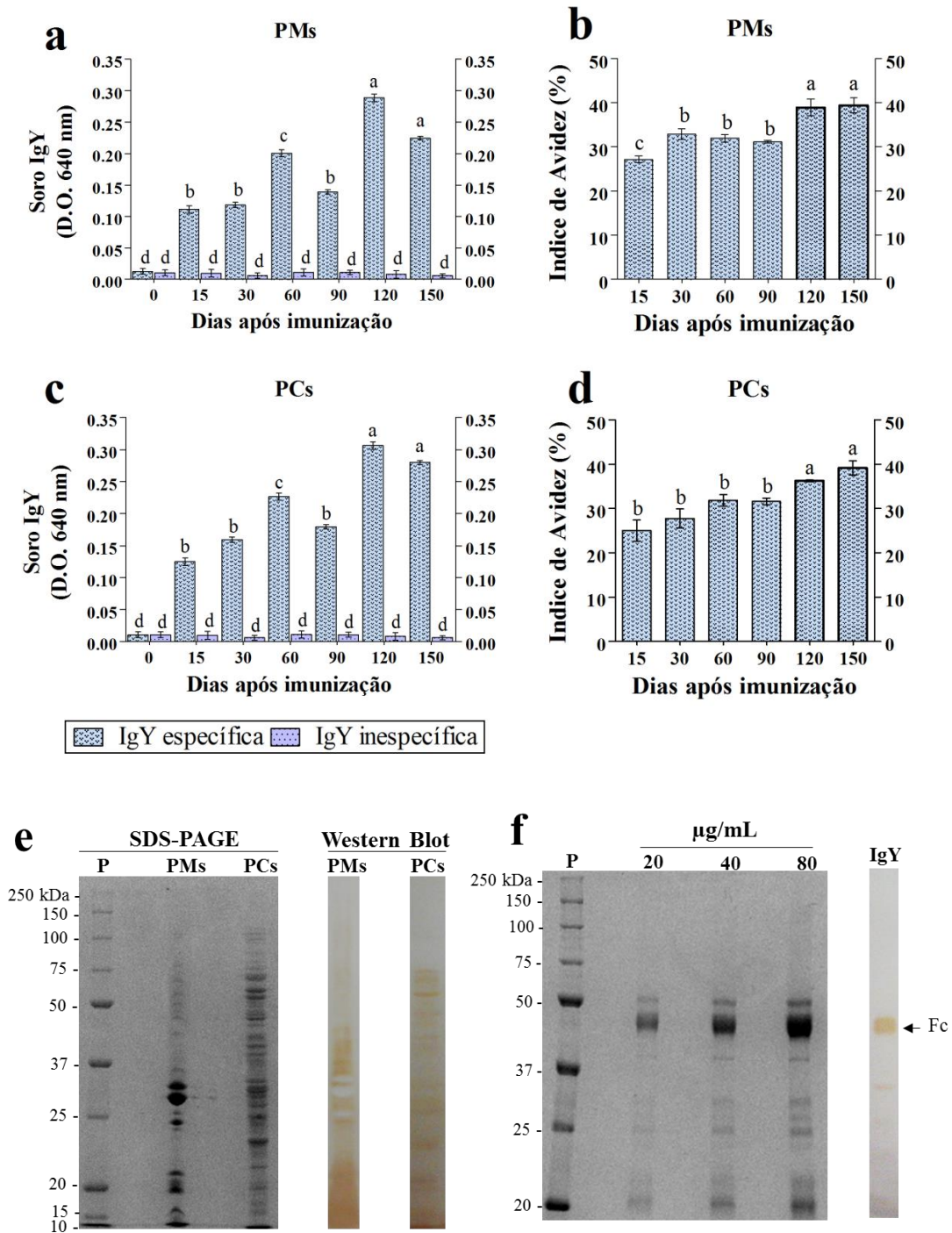
Os resultados foram analisados pelo ANOVA e teste de Tukey a um nível de significância de 5% (SNEDECOR; COCHRAN, 1974).

3 RESULTADOS

3.1 Produção e caracterização da IgY

A IgY específica para PMs e PCs de *A. hydrophila* foi detectada no soro das aves imunizadas no 15º dia após o primeiro inóculo, e os títulos séricos tiveram aumentos significativos no 60º dia após o segundo estímulo e com 120-150º dias posteriores ao terceiro estímulo, observados para as duas frações protéicas (Figuras 1a-c). O índice de avidéz da IgY anti- *A. hydrophila* foi progressivo e teve aumento entre os 120-150º dias para as PMs e PCs (Figuras 1b-d). A eficácia do método de purificação das proteínas bacterianas, assim como o potencial multiespecífico da IgY estão mostrados na Figura 1e, no gel de SDS-PAGE a separação das PMs-PCs de *A. hydrophila* e no western blot a IgY específica foi reativa para 30 massas moleculares presentes nas PMs e 28 para as PCs. A IgY no extrato purificado foi identificada através do peso das massas referentes a cadeia pesada (76,8 kDa) e leve (22., kDa), expressas no SDS-PAGE e confirmada através da imunomarcção positiva para a Fc no western blot (Figura 1f).

Figura 1 - Caracterização da IgY anti-*A. hydrophila* produzida nas aves. (a-c) Produção sistêmica de anticorpos e em (b-d) índice de avides para proteínas de membrana (PMs) e citoplasmáticas (PCs). (e) SDS-PAGE das PMs e PCs e western blot da especificidade da IgY anti- *A. hydrophila*. (f) Extrato purificado da gema, pool de ovos 150 dias após a 3ª imunização, seta aponta para imunomarcação positiva para a fração constante (Fc) da IgY. Médias com respectivo desvio padrão, letras diferentes os valores se diferem pelo método de Tukey ($p < 0,05$). P: padrão bio-rad.

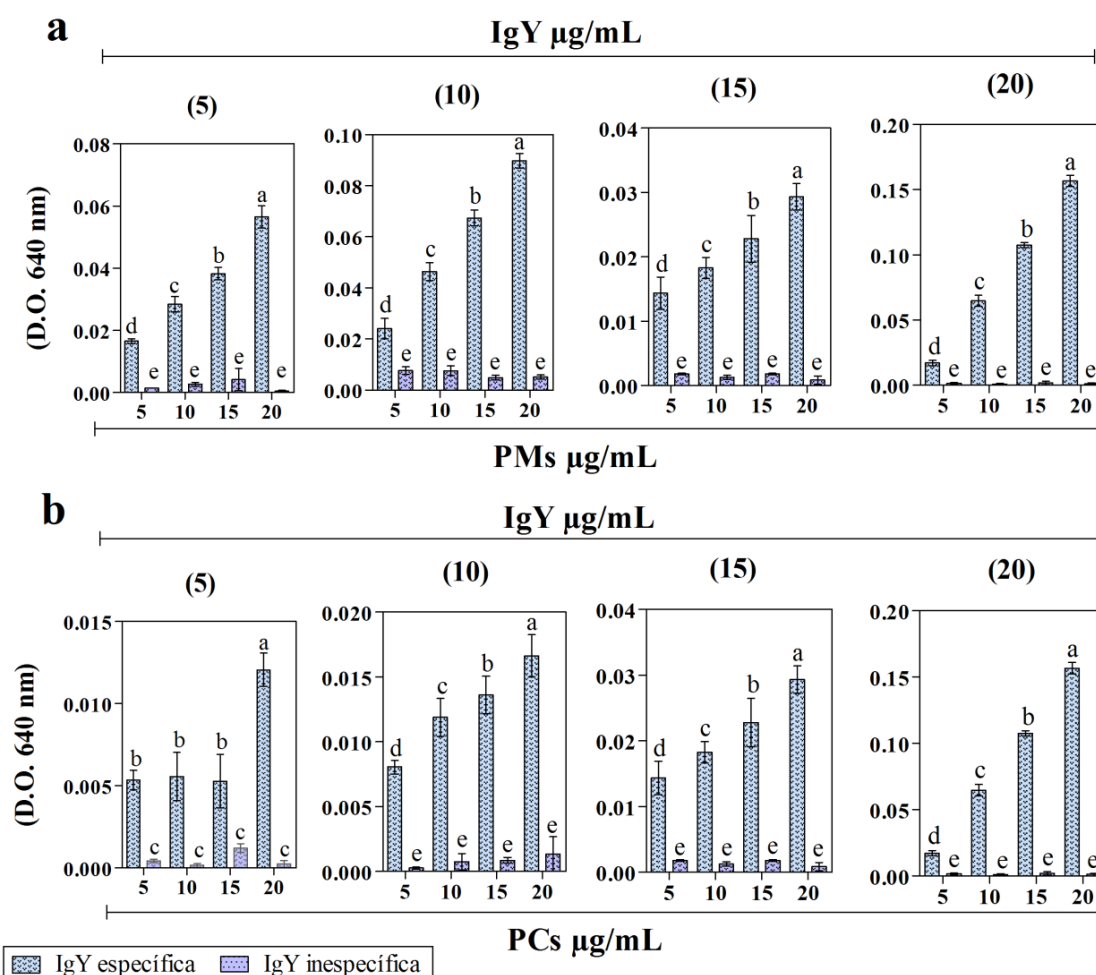


Fonte: Elaborado pela autora

3.2 Concentração detectora da IgY

As concentrações entre 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ da IgY específica testadas foram eficazes em detectar as concentrações equivalentes das PMs e PCs. A concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ da IgY anti-*A. hydrophila* teve maior amplitude na detecção destas proteínas *in vitro* em relação às demais concentrações, enquanto que a IgY inespecífica não apresentou reatividade ou valores significativos (Figura 2).

Figura 2 - Teste de sensibilidade *in vitro* da IgY anti-*A. hydrophila*. (a) Proteínas de membrana (PMs) e (b) citoplasmática (PCs) de *A. hydrophila*. Eixo superior, diferentes concentrações da IgY e no eixo inferior concentrações homólogas de proteínas bacterianas. Médias com respectivo desvio padrão, letras diferentes os valores se diferem pelo método de Tukey ($p < 0,05$).

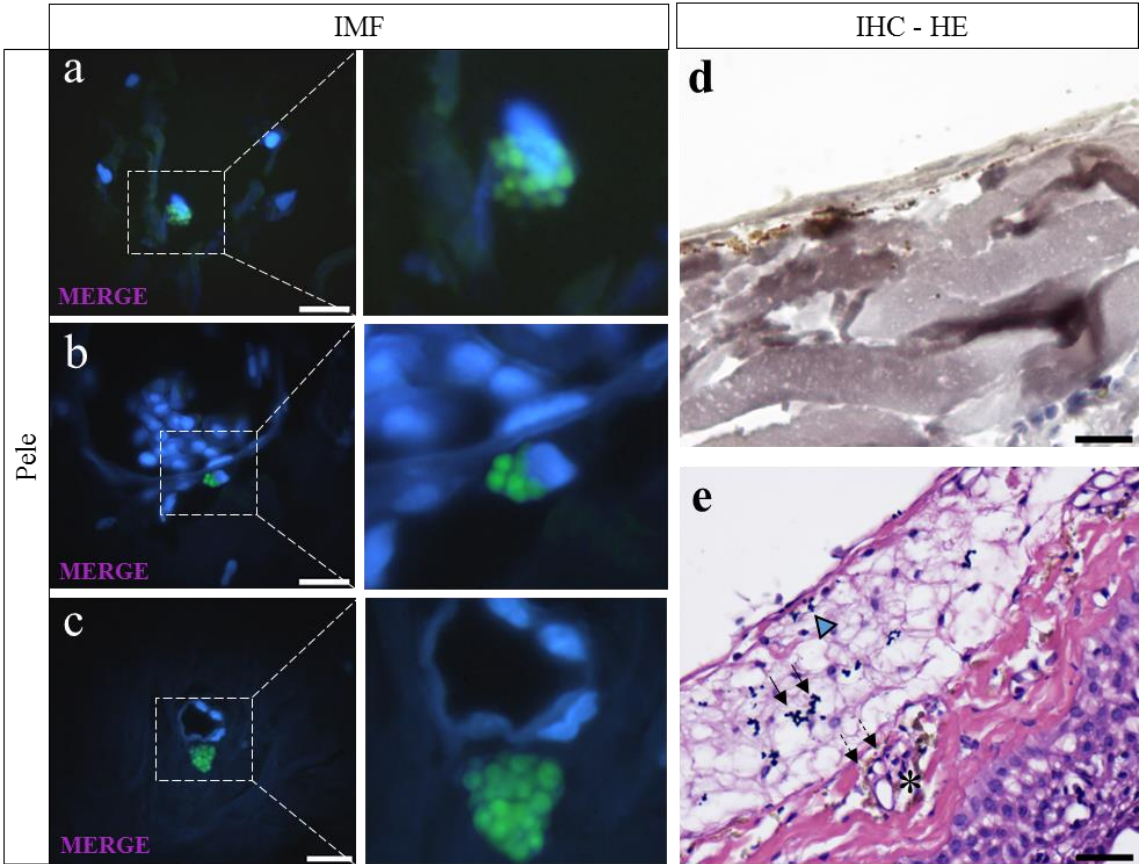


Fonte: Elaborado pela autora

3.3 Pele

Após 48 horas do inóculo da *A. hydrophila* na bexiga natatória das tilápias-do-nilo, a IgY anti- *A. hydrophila* aplicada no ensaio de IMF direta no tecido histológico parafinizado, permitiu observar colônias aderidas às fibras colágenas da derme (Figura 3a), assim como sua possível disseminação para os órgãos vitais, por via hematogênica através da microcirculação (Figuras 3b-c), permitindo a visualização do patógeno na forma livre e engolfado por fagócitos. A IHC acentuou a localização das colônias na derme (Figura 3d) e o H&E mostrou a associação do patógeno com as lesões hemorrágicas e ulcerativas na pele (Figura 3e). As imagens controle utilizando a IgY inespecífica foram negativas e não foram mostradas nestas e nas figuras subsequentes.

Figura 3 - Pele de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. (a) Colônia imunorreativa para IgY anti- *A. hydrophila* na derme internalizada por fagócito, (b) próximo ao perímetro do endotélio da vênula e (c) colônias aderidas na periferia da arteríola. (d) Bastonetes difusos na derme. (e) Colônias na derme (ponta da seta) e na hipoderme (setas), associadas à lesão ulcerativa com infiltrado leucocitário na mesoderme (asterisco) e melanóforos em marrom (setas pontilhadas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

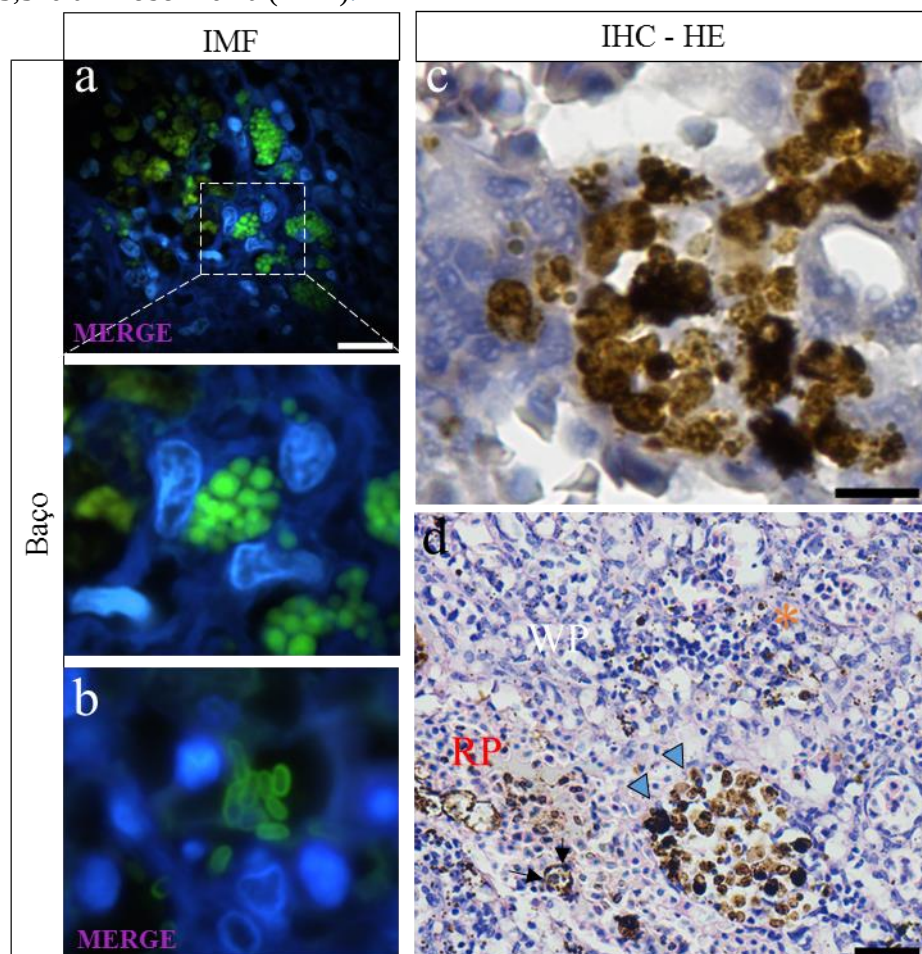


Fonte: Elaborado pela autora

3.4 Baço

No tecido esplênico as colônias de *A. hydrophila* estão difusas e parecem ter adentrado no parênquima do órgão, via veias centrais (Figura 4a) e na forma de bastonetes livres, entre os sinusóides esplênicos (Figura 4b). A IHC mostrou a associação dos bastonetes com os melanomacrófagos, próximos a uma arteríola central (Figura 4c), e a imagem histopatológica mostrou a lesão necrótica aguda, associada aos bastonetes, assim como a presença do centro de melanomacrófagos (Figura 4d).

Figura 4 - Baço de tilápia-do-nylo infectada com *A. hydrophila*. (a) Bastonetes engolfados por fagócitos no interstício do órgão marcados com IgY anti- *A. hydrophila* e (b) formas livres e difusas entre os sinusóides esplênicos. (c) Bastonetes associados ao centro de melanomacrófagos. (d) Bastonetes difusos (asterisco) na polpa branca (WP) e polpa vermelha (RP) com acúmulo de hemossiderina (setas) e centro de melanomacrófagos (pontas das setas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

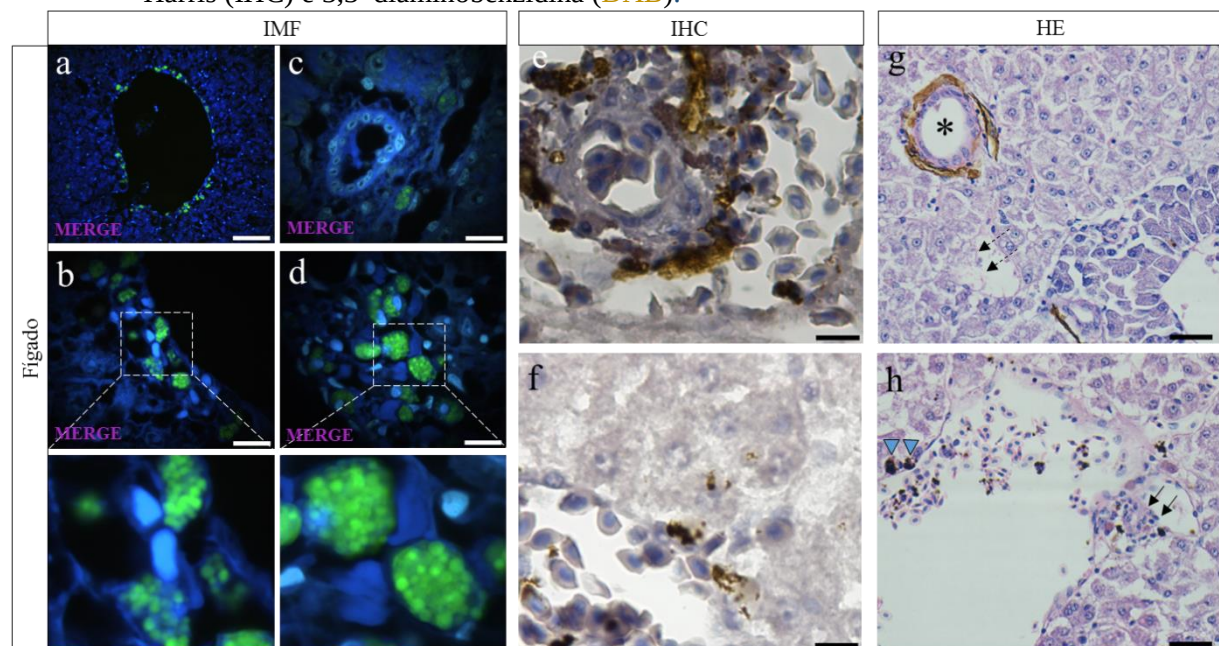


Fonte: Elaborado pela autora

3.5 Fígado

No sistema hepático, foram observadas colônias de *A. hydrophila* aderidas ao endotélio vascular da veia centrolobular (Figura 5a) e na Figura 5b-f mostrou o momento da infiltração das colônias através do endotélio vascular e a passagem da luz do vaso para o interstício do órgão. Outro evento importante foi à evasão das colônias para os ductos biliares (Figura 5c) e o acúmulo de melanomacrófagos e bastonetes envolto da mesma estrutura (Figura 5e). No H&E as lesões hepáticas agudas foram associadas ao patógeno e no interstício do órgão foi possível observar áreas de degeneração celular (Figura 5g) e alterações vasculares (Figura 5h).

Figura 5 - Cinética da infecção por *A. hydrophila* no sistema hepático. (a-b) Colônias aderidas na periferia de uma veia centro lobular (VCL) e (f) no endotélio vascular. Em (c) colônias próximas ao ducto biliar (DB) e (d) bastonetes engolfados por melanomacrófagos, mostrados também em (e). Em (g) o H&E mostra o DB (asterisco), circundada por melanomacrófagos e áreas degeneradas (setas pontilhadas) e em (h) alterações vasculares com infiltrado leucocitário na periferia da VCL (setas) e melanomacrófagos na periferia do vaso (pontas das setas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

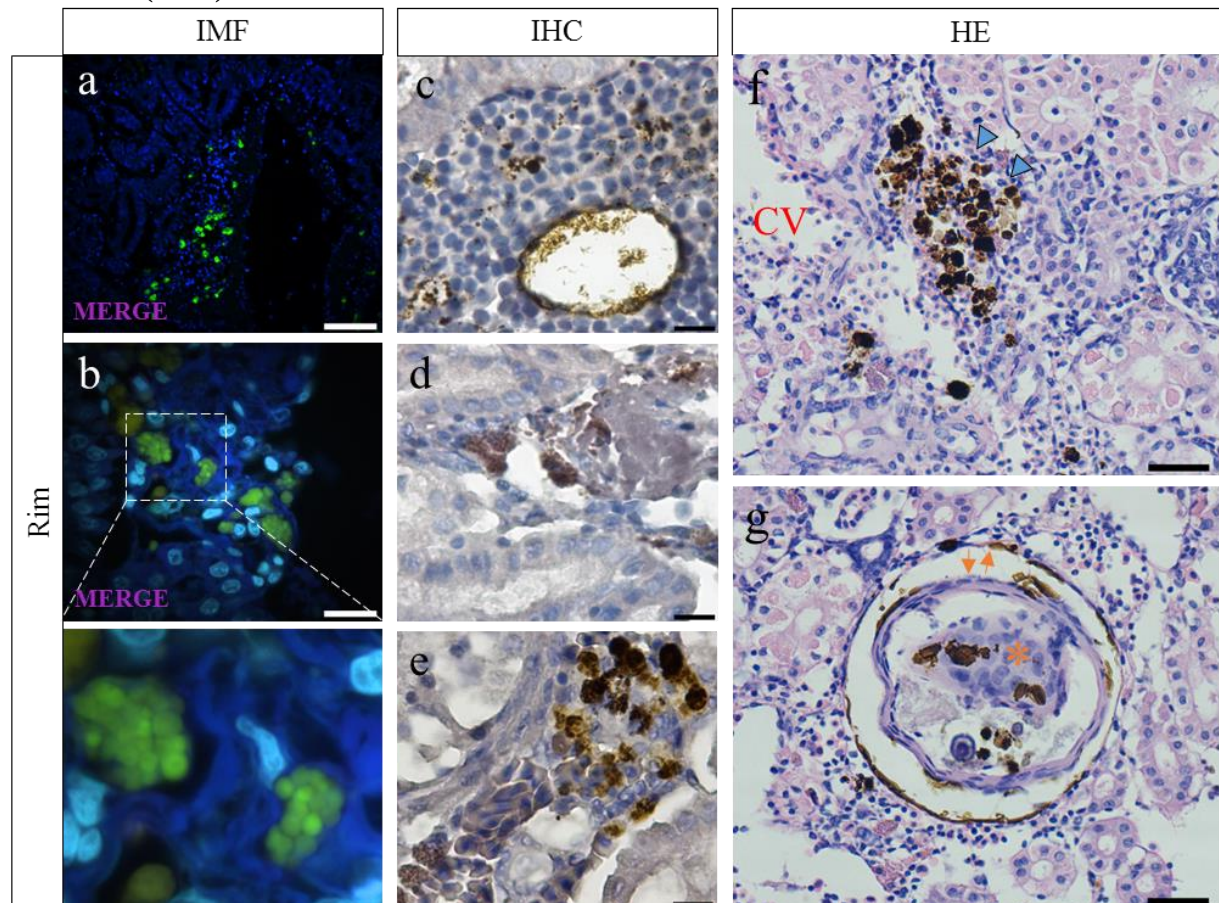


Fonte: Elaborado pela autora

3.6 Rim

No rim a *A. hydrophila* foi vista entrando para o interior do órgão, por via hematogênica através de uma veia renal (Figuras 6a-c). Além disso, observamos as colônias difundidas e internalizadas por fagócitos, próximos os túbulos renais (Figuras 6b-d) e glomérulo renal (Figura 6e). As alterações histopatológicas são características da nefrite aguda, como degeneração tubular e glomerular mostrada nas Figuras 6f-g.

Figura 6 - Sistema renal de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. Em (a-c) difusão das colônias de *A. hydrophila* da luz da veia renal para o interstício do órgão. Imagem (b-d) colônias associadas aos túbulos renais e (e) nos glomérulos. (f) Acúmulo de melanomacrófagos e infiltrados leucocitários (ponta das setas) na periferia de uma veia central (CV) e (g) degeneração glomerular (asterisco) e aumento do espaço intra-capsular (setas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

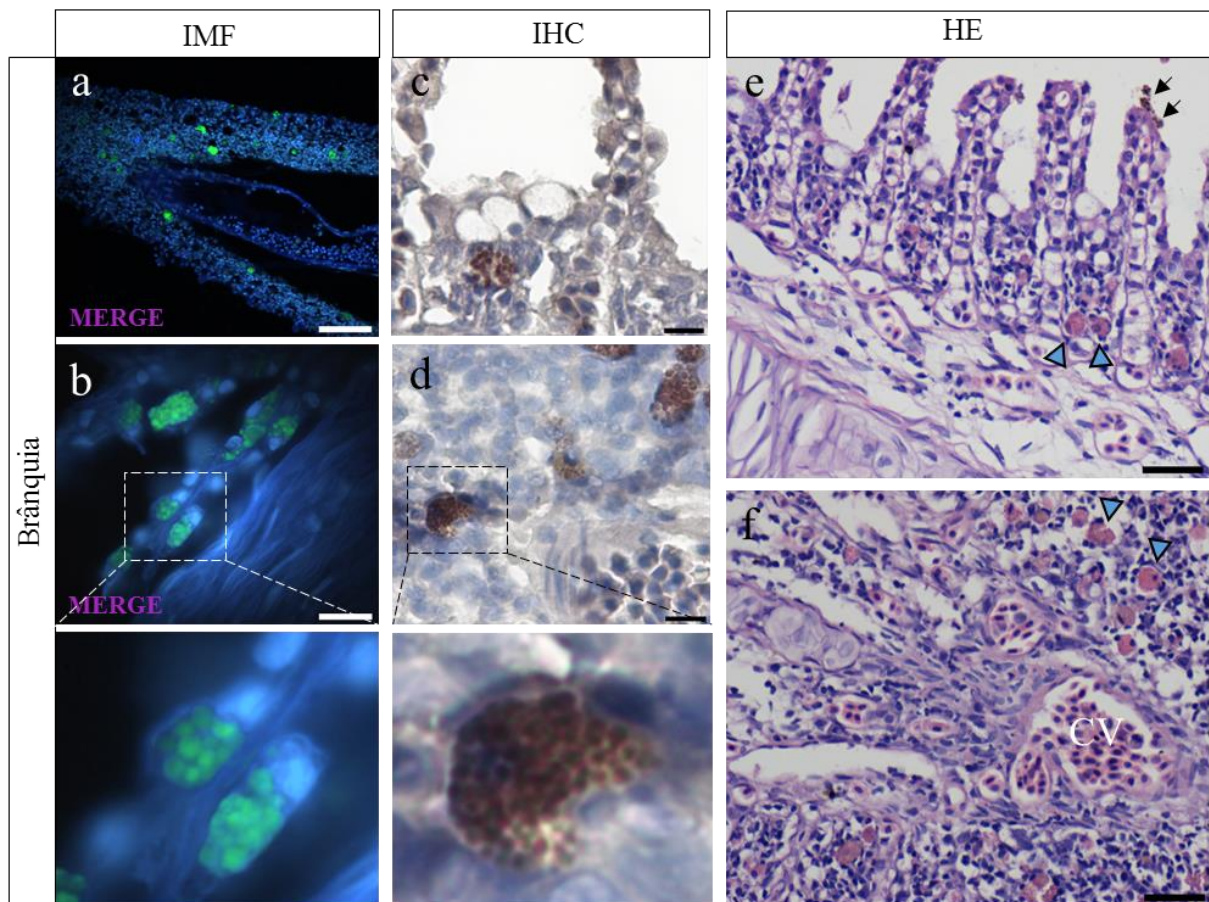


Fonte: Elaborado pela autora

3.7 Brânquia

A infecção do tecido branquial teve início via sistêmica através da microcirculação (Figuras 7a-c). As colônias livres e internalizadas por fagócitos foram vistas adentrando o interstício através do endotélio do seio venoso central (Figuras 7b-d). No histopatológico, foi observada necrose do epitélio lamelar e infiltração leucocitária (Figuras 7e-f).

Figura 7 - Brânquia de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. Colônias difusas no interstício da lamela (a-c) e em (b-d) aderidos ao endotélio do seio venoso central. (e-f) Colônias aderidas no epitélio lamelar (setas) e infiltrado leucocitário (pontas das setas) próximos a veia central (CV). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

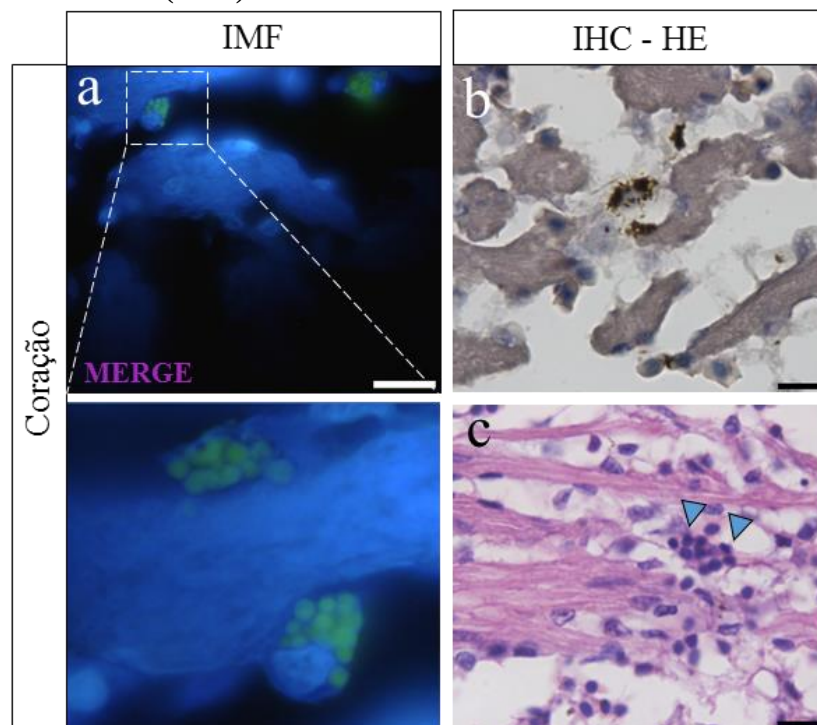


Fonte: Elaborado pela autora

3.8 Coração

No tecido cardíaco as colônias de *A. hydrophila*, estão aderidas nas fibras cardíacas e internalizadas por fagócitos (Figuras 8a-b). Este evento está associado com a endocardite bacteriana, com necrose e infiltração leucocitária nas fibras do endocárdio (Figura 8c).

Figura 8 - Sistema cardiovascular de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. (a-b) Colônias de *A. hydrophila* aderidas nas fibras cardíacas e em (c) infiltrado leucocitário (pontas das setas). Barra 20 µm; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

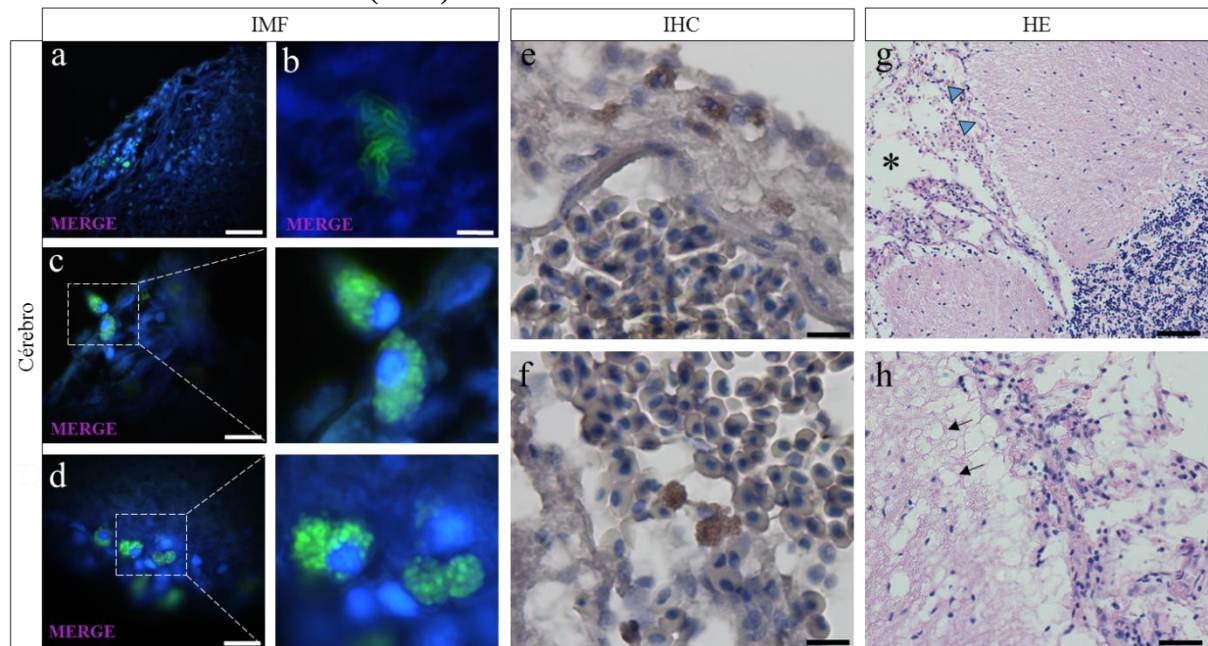


Fonte: Elaborado pela autora

3.9 Cérebro

No tecido nervoso a *A. hydrophila* aparece engolfada por fagócitos e na forma livre (Figuras 9 a-b). Na meninge foi possível visualizar os fagócitos infectados, aderidos na superfície do epitélio e migrando para o interior da meninge (Figura 9c) e para a região cerebelar (Figura 9d). A IHC confirmou as duas vias de entrada da *A. hydrophila* no tecido cerebral, via intracelular no fagócito e colônias livres através da circulação sanguínea cerebral (Figuras 9e-f). No H&E a meningite supurativa foi caracterizada por lesões hemorrágicas e infiltrado leucocitário, assim como a presença de vacúolos na região cerebelar (Figuras 9g-h).

Figura 9 - Tecido nervoso central de tilápia-do-nilo infectada com *A. hydrophila*. (a) Imunomarcacão positiva para *A. hydrophila*, (b) colônias livres e em (c) fagócitos engolfados com *A. hydrophila* infiltrando as camadas mais internas da meninge e (d) na região cerebelar. A IHC mostra a entrada da *A. hydrophila* por via epitélio da meninge (e) e por via circulatória (f). E no H&E áreas com lesões hemorrágicas com infiltrado leucocitário (asterisco) e necrose (pontas das setas) em (g) e vacúolos na região cerebelar (setas) (h). Barra 20 μ m; coloração de hematoxilina e eosina (H&E); isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); hematoxilina de Harris (IHC) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB).



Fonte: Elaborado pela autora

4 DISCUSSÃO

A princípio o método de desativação da bactéria por ultrassom sem o uso de agentes químicos ou físicos, como o formaldeído ou calor (GULSEREN *et al.*, 2007) e a separação das frações protéicas bacterianas por ultracentrifugação (MUTHUKUMARAN *et al.*, 2017), preservaram a estrutura estereoquímica das proteínas bacterianas, e este fato contribuiu para a produção de uma IgY com potencial multiespecífico e de afinidade progressiva para as proteínas da *A. hydrophila*, resultando na detecção da bactéria e de suas proteínas no tecido do hospedeiro. A obtenção da IgY específica a partir do 15º dia da primeira dose do antígeno e durante os 150 dias do protocolo experimental, posto ainda que a concentração detectora inicial para as duas frações protéicas foi de 5 μ g/mL da IgY específica, e o fato de que um ovo contém em média 100 mg de IgY e que galinhas botam aproximadamente 20-28 ovos por mês, podemos então calcular um valor entre 2-8 g de anticorpos por aves (CHACANA *et al.*,

2004), no qual após o processo de purificação estima-se que 2-10% da IgY total são específicas para o antígeno inoculado, podendo ser produzida em grandes quantidades (GREUNKE *et al.*, 2008) e sem afligir o bem estar animal.

A IgY específica quando aplicada para a IMF direta e IHC indireta detectou a *A. hydrophila* em duas formas infectantes, seja intracelular engolfada no fagócito ou extracelular na forma de colônias difusas no tecido do hospedeiro. Entretanto, a IMF direta mostrou as formas infectantes com maior clareza, ao contrário da IHC em que a pigmentação marrom natural dos melanomacrófagos no baço, fígado e rim sobrepuseram a imunomarcacão positiva da bactéria pelo substrato DAB, dificultando a leitura dos resultados. Ao contrário disso, a IHC mostra a imunomarcacão e a localização do patógeno no tecido e sua associação com as lesões histopatológicas, sendo imprescindível a associação destas técnicas para o estudo fisiopatológico mais amplo. Apesar da aplicação da IgY na IMF indireta, como anticorpo primário na detecção do *Toxoplasma gondii* em tecido parafinizado ter sido relatada (FERREIRA JUNIOR *et al.*, 2012), neste estudo usamos apenas a IgY conjugada ao FITC para a IMF direta, e os resultados foram similares, assim como a especificidade e o potencial de detecção, quando comparada a IHC indireta que utiliza um segundo anticorpo conjugado com a enzima, isso possibilitou reduzir o tempo da reação.

As lesões histopatológicas observadas neste estudo foram semelhantes às descritas para a infecção por *A. hydrophila* em peixes, como a ulceração na pele (LAITH; NAJIAH, 2013), degeneração lamelar nas brânquias (ALYAHYA *et al.*, 2018), esplenite (ABDELHAMED *et al.*, 2017), hepatite (EL-BARBARY, 2017), nefrite aguda em rim caudal, endocardite (YARDIMCI; AYDIM, 2011) e meningite supurativa no tecido nervoso (BAUMGARTNER *et al.*, 2017).

Desta forma na IMF e IHC, considerando apenas a localização da bactéria, após 48 horas da infecção, a *A. hydrophila* migrou da bexiga natatória para tecido tegumentar e através da microcirculação local para a circulação sistêmica infiltrando o interstício do baço pela arteríola central, dando início ao processo infeccioso a nível sistêmico. O tecido hepático e renal são os principais locais de tropismo desta bactéria em tilápias (YARDIMCI; AYDIM, 2011), prova disso foi que a *A. hydrophila* no mesmo período de tempo, adentrou o rim pela veia renal e o fígado através da veia porta. Nas brânquias a infecção pode ter iniciado por via sistêmica, mais precisamente pela veia central ou por reinfecção ambiental, e no tecido cardíaco a *A. hydrophila* foi vista engolfada por MΦs e aderidas nas fibras cardíacas, sendo

possível presumir que os MΦs infectados possam ser responsáveis pela transposição da *A. hydrophila* pela barreira hematoencefálica para o tecido nervoso, como foi visto neste estudo. Além da migração e invasão dos tecidos foi possível associar a bactéria com os mecanismos de defesa em partes representadas por MΦs, melanomacrófagos e por micróglias cerebrais.

Por fim, os resultados provam a eficácia da IgY no diagnóstico e como ferramenta para o estudo fisiopatológico da infecção por *A. hydrophila* em tilápias-do-nilo. Posto ainda a dificuldade para a obtenção de anticorpos específicos para patógenos que infectam organismos aquáticos, o presente estudo traz uma nova perspectiva para a produção e uso da IgY da ave como molécula biomarcadora.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMED, H.; IBRAHIM, I.; BAUMGARTNER, W.; LAWRENCE, M. L.; KARSI, A. Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-15, 2017.
- ALYAHYA, S. A.; AMEEN, F.; AL-NIAEEM, K. S.; AL-SA'ADI, B. A.; HADI, S.; MOSTAFA, A. A. Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 182-185, 2018.
- ANDRADE, F. G.; ETO, S. F.; NAVARRO, A. C. N. S.; MARIOTO, D. T. G.; VIEIRA, N. J.; CHEIRUBIM, A. P.; RAMOS, S. P.; VENÂNCIO, E. J. The production and characterization of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: a long term experimete. **Toxicon**, v. 66, p. 18-24, 2013.
- BAUMGARTNER, W. A.; FORD, L.; HANSON, L. Lesions caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in farmed catfish (*Ictalurus punctatus* and *I. punctatus* × *I. furcatus*) in Mississippi. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, p. 747-751, 2017.
- BENTES, G. A.; LANZARINI, N. M.; LIMA, L. R. P.; MANSO, P. P. A.; SILVA, A. S.; MOUTA JUNIOR, S. S.; GUIMARÃES, J. R.; MORAES, M. T. B.; PELAJO-MACHADO, M.; PINTO, M. A. Using immunoglobulin Y as an alternative antibody for the detection of hepatitis A virus in frozen liver sections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 577-579, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 248-254, 1976.

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

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

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 173-180, 2010.

EL-BARBARY, M. I. Serum biochemical and histopathological changes associated with *Aeromonas hydrophila* isolated from *Oreochromis niloticus* and *Sparus aurata* with multiple antibiotic resistance index. **Journal of Biological Sciences**, v.17, p. 222-234, 2017.

ETO, S. F.; ANDRADE, F. G.; PINHEIRO, J. W.; BALARIN, M. R.; RAMOS, S. P.; VENANCIO, E. J. Effect of inoculation route on the production of antibodies and histological characteristics of the spleen in laying hens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 14, p. 63-66, 2012.

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; BALDASSI, A. C.; MANRIQUE, W. G.; SILVA, I. C.; MEDEIROS, A. S. R.; BELO, M. A. A.; BALBUENA, T. S.; SAMARA, S. I.; PIZAULO, J. M. Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 76, 153-160, 2018.

FERREIRA JÚNIOR, A.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACÊDO JÚNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA FILHO, H. H.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO T. W. P. Production, Characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

GAO, X.; ZHANG, X.; SUN, J.; DU, X.; LI, X.; ZHANG, Y.; LIN, L. Passive protection effect of anti-*Vibrio anguillarum* IgY-encapsulated feed on half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) against *V. anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 483-488, 2016.

GREUNKE, K.; BRAREN, I.; ALPERS, I.; BLANK, S.; SODENKAMP, J.; BREDEHORST, R.; SPILLNER, E. Recombinant IgY for improvement of immunoglobulin-based analytical applications. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1237-1244, 2008.

GULSEREN, I.; GUZEY, D.; BRUCE, B. D.; WEISS, J. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 14, p. 173-183, 2007.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23 p. 35-73, 2010.

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

LAITH, A. R.; NAJIAH, M. *Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 5, p. 1-7, 2013.

LU, Y.; LIU, J.; JIN, L.; LI, X.; ZHEN, Y.; XUE, H.; YOU, J.; XU, Y. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 604-610, 2008.

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

MUTHUKUMARAN, S.; KENTISH, S.; STEVENS, G.; SANDRA, E.; ASHOKKUMAR, M.; GEOFFREY, S. W. Application of ultrasound in membrane separation processes: a review. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 22, p. 155-194, 2017.

PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease, **Journal of Infection**, v. 62 p. 109-118, 2011.

PAULY, D.; CHACANA, P. A.; CALZADO, E. G.; BREMBS, B.; SCHADE, R. IgY technology: extraction of chickens antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. **The Journal of Visualized Experiments**, v. 51, p. 3084, 2011.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. W. Distribution of oxytetracycline resistente plasmids between *Aeromonas* in hospital and aquaculture environments: implication of Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3883-3890, 2000.

ROBERTSON, D.; SAVAGE, K.; REIS-FILHOS, J. S.; ISACKE, C. M. Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. **BMC Cell Biology**, v. 9, p. 1-10, 2008.

SATO, V. S.; GALDIANO, R. F.; RODRIGUES, G. R.; LEMOS, E. G.; PIZAURO, J. M. Kinetic characterization of a novel acid ectophosphatase from *Enterobacter asburiae*. **Journal of Microbiology**, v. 54, p. 106-113, 2016.

SHI, H.; ZHU, J.; ZOU, B.; SHI, L.; DU, L.; LONG, Y.; WANG, H.; XU, H.; ZHEN, Y.; SUN, L. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1734-1742, 2017.

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

STRATEV, D.; STOEV, S.; VASHIN, I.; DASKALOV, H. Some varieties of pathological changes in experimental infection of carps (*Cyprinus carpio*) with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research**, v. 1, p. 191-202, 2015.

TESAR, D. B.; CHEUNG, E. J.; BJORKMAN, P. J. The Chicken Yolk Sac IgY Receptor, a Mammalian Mannose Receptor Family Member, Transcytoses IgY across Polarized Epithelial Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, p. 1587-1593, 2008.

TOMAS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN Microbiology**, 256261, 2012.

XIAO, Y.; GAO, X.; GANNOT, G.; EMMERT-BUCK, M. R.; SRIVASTAVA, S.; WAGNER, P.D.; AMOS, M.D.; BARKER, P. E. Quantitation of HER2 and telomerase biomarkers in solid tumors with IgY antibodies and nanocrystal detection. **International Journal of Cancer**, v. 122, p. 2178-2186, 2008.

XU, L.; XU, Y.; HE, L.; ZHANG, M.; WANG, L.; LI, Z.; LI, X. Immunomodulatory effects of chicken egg yolk antibodies (IgY) against experimental *Shewanella marisflavi* AP629 infections in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). **Fish Shellfish & Immunology**, v. 84, p. 108-119, 2019.

ZHANG, D.; MOREIRA, G. S.; SHOEMAKER, C.; NEWTON, J. C.; XU, D. H. Detection and quantification of virulent *Aeromonas hydrophila* in channel catfish tissues following waterborne challenge. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, p. 1-5, 2016.

ZHANG, Y. L.; LAU, Y. L.; ARAKAWA, E.; LEUNG, K. Y. Detection and genetic analysis of group II capsules in *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology**, v. 149, p. 1051-1060, 2003.

YARDIMCI, B.; AYDIN, Y. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 58, p. 47-54, 2011.

CAPÍTULO III – Atividade fagolisossômica de macrófagos de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) infectados *in vitro* por *Aeromonas hydrophila*: Infecção e imunoterapia

Artigo publicado na revista Fish & Shellfish Immunology, intitulado como “Phagolysosomal activity of macrophages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected *in vitro* by *Aeromonas hydrophila*: Infection and immunotherapy”, volume 87, páginas 51-61, 2019.

RESUMO

Os mecanismos bioquímicos envolvidos na fagocitose e a sobrevivência intracelular da *A. hydrophila* no macrófago (MΦ) do hospedeiro são complexos, e influem para o sucesso ou fracasso da infecção. Assim, no presente estudo descrevemos a infecção de MΦs de tilápias-do-nilo *in vitro* pela bactéria homóloga, e testamos os efeitos da imunoglobulina Y (IgY) anti-*A. hydrophila* na atividade fagolisossômica e na sobrevivência intracelular do patógeno. A IgY anti-*A. hydrophila* teve efeito modulador sobre a atividade da fosfatase ácida lisossomal (FAL), na produção dos reativos intermediários do oxigênio (ROIs) e do óxido nítrico (ON), potencializando a fagocitose e eliminação da *A. hydrophila*. Desta forma, presumimos que a IgY específica teve efeito benéfico no controle da infecção, postulando ainda, o uso dos MΦs da tilápia-do-nilo como um importante modelo experimental *in vitro* para o estudo funcional e terapêutico da infecção por *A. hydrophila*.

Palavras-chave: Imunoglobulina Y, fagocitose, inflamação crônica e teleósteo.

ABSTRACT

The biochemical mechanisms involved in phagocytosis and the intracellular survival of *A. hydrophila* in host macrophages (MΦs) are complex processes that affect infection success or failure. Thus, in the present study, we described the *in vitro* infection of Nile tilapia MΦs by a homologous bacterium and tested the effects of anti-*A. hydrophila* immunoglobulin Y (IgY) on the phagolysosomal activity and intracellular survival of the pathogen. The anti-*A. hydrophila* IgY modulated lysosomal acid phosphatase (LAP) activity as well as the production of reactive oxygen intermediates (ROIs) and nitric oxide (NO), thereby

potentiating phagocytosis and the elimination of *A. hydrophila*. Thus, we assume that the specific IgY had a beneficial effect on infection control and postulated the use of the Nile tilapia MΦs as an important *in vitro* experimental model for the functional and therapeutic study of *A. hydrophila* infection.

Keywords: Immunoglobulin Y, phagocytosis, chronic inflammation and teleost.

1 INTRODUÇÃO

O principal mecanismo celular de defesa, efetivo contra microrganismos patogênicos tais como as bactérias, está sob a regência das células fagocíticas efectoras da resposta imune inata do hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; URIBE-QUEROL; ROSALES, 2017). Nos peixes teleósteos, devido à ausência da evolução da resposta imune adaptativa neste grupo de vertebrados, a fagocitose é o mecanismo primordial para a eliminação de patógenos, sendo mediada por neutrófilos, trombócitos e macrófagos (MΦs) (NIKOSKELAINEN *et al.*, 2005; URIBE *et al.*, 2011). A atividade fagocítica dos MΦs está a princípio relacionada à produção da fosfatase ácida lisossomal (FAL), que contribui para a acidificação do fagolisossoma e a ativação subsequente das enzimas responsáveis pela produção dos reativos intermediários do oxigênio (ROIs) e do óxido nítrico (ON) (SLAUCH, 2011).

A bactéria *A. hydrophila* é comensal e cosmopolita com o potencial de infectar uma ampla variedade de espécies dentre as quais os peixes, mamíferos e humanos (PLUMB; HANSON, 2011; STRATEV *et al.*, 2015). A bactéria é de vida aquática e está associada às doenças em peixes (JOSEPH; CARNAHAN, 1994; KUMAR *et al.*, 2016) e seres humanos como patógenos veiculados pela água e alimentos contaminados (DASKALOV, 2006). Causa gastroenterite, celulite, peritonite, meningite e pneumonia em animais (JANDA; ABBOTT, 2010) e em humanos imunocomprometidos (VON GRAEVENITZ, 2007; IGBINOSA *et al.*, 2012). Nos países subdesenvolvidos *A. hydrophila* é um dos principais agentes causadores da diarreia em crianças e recém-nascidos (DALLAL *et al.*, 2016). Na tilápia-do-nilo a infecção por *A. hydrophila* apresenta quadro de ulceração na pele (STRATEV *et al.*, 2015), gastroenterite (ABDELHAMED *et al.*, 2017), disseminação para os órgãos vitais e a instalação da síndrome inflamatória sistêmica, resultando na morte do hospedeiro

(CIPRIANO; BULLOCK; PYLE, 1984; BHARADWAJ; ABRAHAM; JOARDAR, 2013). Assim, a importância deste patógeno para a saúde pública e animal é evidente (GUZ; KOZINSKA, 2004; TAVARES; CERESER; TIMM, 2015).

O tratamento com o uso de antibiótico para organismos aquáticos, apesar de eficaz, gera resíduos de antibiótico na água (STACHOWIAK *et al.*, 2010; FAO, 2011), representando um risco para o desenvolvimento de resistência microbiana, afetando organismos aquáticos, mamíferos, aves e humanos (MARTI; JOFRE; BALCAZAR, 2013). Este fato comprova a resistência a diversos antibióticos por diferentes cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de pisciculturas, mesmo sem o histórico do uso de tais substâncias para a prevenção ou terapêutica da doença no local (HIRSCH *et al.*, 2006). Por consequência, a resistência microbiana gerada por resíduos de antibióticos na água, tem efeito negativo na saúde pública (LANDERS *et al.*, 2012). Nesse sentido, o uso de anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas poedeiras previamente imunizadas representa uma alternativa promissora no tratamento de bacterioses em organismos aquáticos (LI *et al.*, 2014).

A produção e extração da IgY a partir da gema de ovos de galinhas poedeiras é economicamente viável e está em concordância com as diretrizes do bem estar-animal, apresenta baixo custo de produção, pode ser produzida em grandes quantidades e torna desnecessário eutanasiar ou submeter a ave a métodos cruéis para a sua obtenção (CHACANA *et al.*, 2004; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010). Um ovo gera em média 100 mg de IgY na gema, como galinhas poedeiras produzem mais de 20 ovos por mês, a produção de IgY em 30 dias pode chegar a valores maiores do que 2 g por animal (MUNHOZ *et al.*, 2014). O uso da IgY neutraliza a aderência da bactéria às células e tecidos alvos como mostrado na profilaxia de doenças infecciosas como na diarreia de leitões por *Escherichia coli* (RIBEIRO *et al.*, 2005), na úlcera gástrica causada por *Helicobacter pylori* (YANG, *et al.*, 2012), em micoses causadas por *Candida albicans* (IBRAHIM *et al.*, 2008), na parvovirose canina (Nguyen *et al.*, 2006) e na intoxicação por aflatoxinas (QIU *et al.*, 2018). O tratamento com anticorpos da classe IgY específicos para antígenos de *Vibrio anguillarum* via oral, conferiu proteção em peixes linguado infectados experimentalmente (GAO *et al.*, 2016). Em camarão a imunização passiva da IgY contra o vírus da síndrome da mancha branca resultou na proteção contra a infecção (LU *et al.*, 2008).

Desta forma, a utilização da IgY na imunoterapia de doenças infectocontagiosas, representa uma alternativa promissora no tratamento e profilaxia de enfermidades bacterianas

em organismos aquáticos, devido à sua especificidade e ausência de efeito residual na água, no predador ou no consumidor humano. Por isso o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito *in vitro* da IgY anti-*A. hydrophila* na atividade fagolisossômica e sobrevivência intracelular da *A. hydrophila* nos MΦs de tilápia-do-nylo, assim como o uso destas células como modelo de estudo para infecções bacterianas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Comitê de ética

O experimento foi realizado de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ FCAV/ UNESP protocolo número 017204/15).

2.2 Produção e caracterização da IgY anti- *A. hydrophila*

A IgY específica para a cepa de *Aeromonas hydrophila* (número de acesso GenBank: MH305534.1) e inespecífica foram produzidas, purificadas e previamente validadas por Fernandes *et al.* (2019).

2.3 Ensaio de opsonização da *A. hydrophila*

O ensaio foi determinado pelo método imunoenzimático indireto (ELISA) segundo Shi *et al.* (2017). Foi utilizada microplaca de 96 poços, fundo chato (Corning Costar Corporation, Cambridge, USA) pré-sensibilizada com a bactéria viva na concentração de 1.5×10^7 UFC/mL em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) 0,05 M pH 9,6 adsorvidas no volume de 200 µL/poço e incubada a 4 °C durante 18 h. A IgY foi testada no volume de 100 µL e nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL por poço e a placa incubada por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada com PBS-Tween 20 a 0.05% e adicionado 100 µL/poço de IgG de coelho anti-IgY ligado à peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (diluição 1:500 v/v), seguido de incubação por uma hora em temperatura ambiente. A reação foi revelada com substrato/cromógeno (H₂O₂/ABST). A reação foi mensurada a 640 nm em leitor de microplaca (Molecular Devices SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.4 Atividade neutralizante *in vitro* da IgY anti- *A. hydrophila*

A *A. hydrophila* foi cultivada em caldo triptona de soja (TSB) (Difco, Detroid, MI, USA) e incubada por 24 h a 28 °C, a cultura foi centrifugada por 10 min a 10.000 xg e o pellet foi lavado e suspenso em tampão fosfato salino (PBS) 0,15 M pH 7,4 e ajustada na concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. A atividade bactericida da IgY foi determinada por incubação de 100 µL desta suspensão diluída de *A. hydrophila* com 100 µL de IgY anti- *A. hydrophila* nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µg/mL e IgY inespecífica a 300 µg/mL em microtubo durante uma hora a 28 °C. No grupo controle bacteriano, o PBS substituiu a IgY. Após a incubação, o número de bactérias viáveis foi determinado pela contagem das colônias cultivadas em placa de Petri contendo ágar triptona de soja (TSA) (Difco, Detroid, MI, USA) durante 24 h a 28 °C.

2.5 Isolamento e cultivo celular

Tilápias-do-nilo ($304,5 \pm 7$ g) ($n = 12$) foram anestesiadas por imersão em solução de benzocaína (Laboratório Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (1: 20.000 v/v) diluída em etanol a 98% (0,1 g/mL) e receberam na bexiga natatória a injeção de 50 µg/mL de proteínas de membrana (PMs) purificadas de *A. hydrophila* de acordo com Fernandes *et al.* (2019). Após 72 h os peixes foram eutanasiados por imersão em benzocaína (1: 500 v/v), e as células leucocitárias foram coletadas. Para isso, os peixes foram injetados com 0.5 mL de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) com heparina a 1% na bexiga natatória e o conteúdo coletado assepticamente, centrifugado a 400 xg por 10 min e o pellet lavado duas vezes. As células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 contendo 100 UI de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), em placa de cultura de tecido sobre tensão de 5% de CO₂ a 28 °C. Após 24 h, o sobrenadante foi retirado e as células não-aderentes desprezadas, permanecendo os MΦs e adicionado meio RPMI-1640 livre de antibiótico e SFB para os testes.

2.6 Fenotipagem celular

A fenotipagem dos MΦs foi feita por imunocitoquímica. A cultura de células foi reajustada para $3,0 \times 10^7$ células/poço e distribuída em triplicata em placa de 12 poços, contendo lamínulas redondas (13 mm) para a adesão celular e incubada a 28 °C, em atmosfera controlada a 5% de CO₂. Após, as lamínulas foram coletadas e fixadas por 15 min em

formaldeído a 4%, lavadas três vezes com PBS-Tween 0,05%, permeabilizada com Triton X-100 0,25% e os sítios inespecíficos bloqueados. Os anticorpos primários produzidos em coelho anti-MHC de classe II (diluição de 1:1.000, Abmart/ X1-H9B8H2), anti-CD68 (diluição de 1:1.000, Abmart/ X-I3KF76-N), anti-iNOS (diluição de 1:1.000, Neomarkers/ RB-1605-P) e anti-TNF- α (diluição de 1:1.000, Anaspec/ AS-55383), contendo 1% de albumina do soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), foram incubados por 18 h a 4 °C, e a amostra lavada duas vezes em PBS-Tween 0.05%. O anticorpo secundário IgG anti coelho (Dako/ K4061) diluído de acordo com o fabricante, foi incubado por uma hora a 4 °C e a reação revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e a contra-coloração feita com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas com *Erv-mount* (Erviegas EasyPath, DuraEdge, EUA) e analisadas em microscopia de luz e as imagens capturadas em Olympus Stream Software (Olympus Life Science, Center Valley, PA, EUA).

2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV foi realizada de acordo como descrito por Ibrahim-Granet *et al.* (2003). Resumidamente, os MΦs foram reajustados a $3,0 \times 10^7$ células/poço e distribuídos em triplicatas em placa de 12 poços e infectados com *A. hydrophila* viva na concentração de $1,5 \times 10^9$ sobre lamínulas redondas (13 mm). As lamínulas foram fixadas em glutaraldeído a 2.5% e lavadas com tampão fosfato 0,2 M. Na sequência as lamínulas foram desidratadas com acetona e dessecadas em equipamento Ponto crítico (Critical Point Dryer da BAL-ZERS CPD030). As montagens das lamínulas foram feitas em suporte e a metalização do material com ouro em equipamento modelo Sputter Coater (Bal-Zers SCD050). As imagens capturadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, Jeol).

2.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O processamento e análise ultraestrutural foram executados de acordo com Esteban *et al.* (1998). A distribuição e concentração dos MΦs e da *A. hydrophila* foram às mesmas da MEV. As células foram desadidas e centrifugadas a 400 xg e o pellet formado, ressuspenso e fixado em solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído; 2% de formaldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4) por 2 h a 4 °C. Em seguida, o pellet foi lavado três vezes em tampão fosfato 0,1 M e fixado com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato por uma hora e as imagens capturadas em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol-100CXII).

2.9 Eletroforese e western blot

Para o ensaio de western blot, as proteínas presentes no sobrenadante do exsudato inflamatório da bexiga natatória foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), separadas em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12% de acordo com Laemmli (1970) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A seguir a membrana foi bloqueada com PBS-leite (Molico, Nestlé Brazil, São Paulo, Brazil) a 10% 0,25 M pH 7,2, em temperatura ambiente por duas horas, lavada com PBS-Tween 20 0,1% e incubada com anti-TNF- α (Anaspec/ AS-55383) na diluição 1:1.000, sob agitação por duas horas e lavada com PBS-Tween 20 0,1%. O conjugado (Dako/ K4061) foi diluído de acordo com a recomendação do fabricante, adicionado à membrana e incubado por uma hora em temperatura ambiente. A reação revelada com substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e bloqueada com adição de água destilada deionizada e a membrana escaneada e analisada com Image Lab software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.10 Delineamento experimental

Para a avaliação da infecção celular *in vitro* e da imunoterapia com IgY, os MΦs foram ajustados na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/poço distribuídos em triplicatas e a cultura incubada à 28 °C em atmosfera a 5% de CO₂. Os tratamentos controle negativo (células e PBS), controle positivo (células + bactéria), IgY específica (células + bactéria + IgY específica) e inespecífica (células + bactéria + IgY inespecífica) na concentração de 300 µg/mL foram distribuídos em placa de cultura de tecido de 96 poços. Os parâmetros da atividade celular foram mensurados nos tempos pré-estabelecidos 6, 24 e 48 h após a infecção com $1,5 \times 10^7$ de *A. hydrophila* viva/poço. O delineamento experimental foi mantido para os ensaios subscritos.

2.11 Atividade da fosfatase ácida (FA)

O método de mensuração da atividade da FA foi realizado de acordo Yang, Sinai e Kain (1996). Para isso, os MΦs foram reajustadas e os tratamentos distribuídos. Na sequência os poços foram lavados e 100 µL/poço da solução contendo acetato de sódio 0,1 M pH 7,2, 0,1% de Triton X-100 e *p*-nitrofenilfosfato 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) adicionados, a reação mantida por duas horas e bloqueada com 10 µL/poço da solução de NaOH 1 M e a absorbância mensurada a 405 nm em leitor de microplaca.

2.12 Atividade do burst respiratório

O ensaio com azul de nitrotetrazólio (NBT, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi realizado de acordo com Grayfer, Hodgkinson e Belosevic (2008). Os tratamentos pré-determinados foram infectados com *A. hydrophila* viva e adicionado um tratamento com PMA (Forbol-12-Miristato-13-Acetato) a 100 ng/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após o período de incubação, 100 µL/poço de NBT a 2 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi adicionado e incubado duas horas. Por fim a placa foi centrifugada a 400 xg por 10 min, o sobrenadante aspirado e 140 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 120 µL de KOH 2M foram adicionados e a leitura feita a 630 nm em leitor de microplaca.

2.13 Produção de óxido nítrico (ON)

A produção de ON foi determinada usando a reação de Griess descrita por Stafford *et al.* (2002). Para isso, 75 µL/poço do sobrenadante da cultura de MΦs foram transferidos para uma nova placa de cultura de tecido de 96 poços e o volume do sobrenadante foi conjugado em volume igual do reagente de Griess (1% de sulfanilamida; 0,1% de N-naftil-etilenodiamina e 2% de ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)) e a reação incubada por 10 min e quantificada por absorbância no comprimento de 540 nm em leitor de microplaca.

2.14 Imunofluorescência direta (IMF)

Para a análise de IMF os MΦs foram cultivados na concentração de $3,0 \times 10^7$ células/poço no volume final de 1 mL/poço, distribuídas em triplicatas na placa de 12 poços contendo lamínula redonda (13 mm) por poço para a adesão celular e incubada a 28 °C, em atmosfera controlada a 5% de CO₂. Para cada tratamento e período experimental após infecção com $1,5 \times 10^9$ de *A. hydrophila* viva, uma lamínula foi coletada, fixada, e a membrana plasmática permeabilizada e os sítios inespecíficos bloqueados como descrito para a imunocitoquímica no item 2.6. Em seguida, os MΦs foram incubados durante 30 min à temperatura ambiente com a IgY anti- *A. hydrophila* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (IgY anti-*A. hydrophila* FITC) segundo Fernandes *et al.* (2018). Para a evidenciação dos núcleos foi utilizado o 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 10 mg/mL durante 10 min à temperatura

ambiente. As lâminulas foram montadas com *Fluoromount* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e analisadas no microscópio de fluorescência (série Olympus BX56; Olympus Life Ciência, Center Valley, PA, EUA).

2.15 Citometria de fluxo

Os MΦs e os tratamentos foram ajustados, distribuídos e incubados de acordo com o item 4.10. O sobrenadante da cultura de MΦs foi retirado, e os poços lavados uma vez com PBS pH 7,4 e a placa centrifugada a 400 xg por 4 min a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e adicionado lisozima a 0,2%, incubada a 28 °C durante 20 min, os poços foram lavados e a placa centrifugada, seguido da adição de Triton X-100 a 0,1%, incubado por uma hora. Em seguida a placa foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensão e transferido para uma nova placa de 96 poços adicionando o iodeto de propídio (PI) na concentração de 5 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e as amostras injetadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II). Os dados foram processados no software FCS Express 6 Plus.

2.16 Viabilidade bacteriana intracelular nos macrófagos

Paralelamente ao item 2.15, alíquotas do pellet de cada tratamento foram transferidas para a placa de 96 poços e semeadas pela técnica de *pour plate* em placas de Petri contendo TSA, incubadas a 28 °C, durante 24 h e o número de colônias quantificado em contador de colônias (Phoenix CP608, BR).

2.17 Atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial dos MΦs foi realizada pelo método descrito por Mosmann (1983). Após o período de incubação de cada tempo e tratamento experimental o volume de 20 µL/poço da solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi adicionado e a reação incubada durante 4 h e o sobrenadante foi retirado e 200 µL/poço de DMSO foi adicionado para a solubilização dos cristais de formazana e a absorbância mensurada a 595 nm.

2.18 Análise estatística

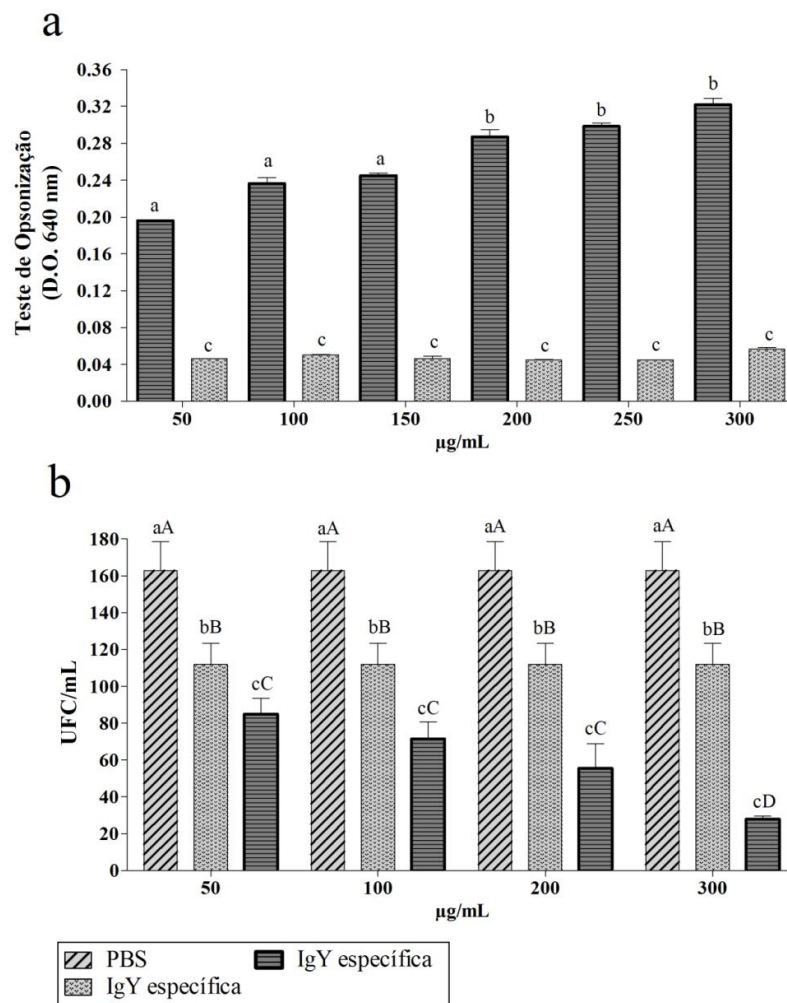
Os dados foram analisados por ANOVA e pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5% (SNEDECOR; COCHRAN, 1974).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação funcional da IgY *in vitro*

A concentração da IgY específica necessária para neutralizar o patógeno, foi entre 200-300 µg/mL em relação a dose infectante de *A. hydrophila* na concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. A IgY inespecífica não teve reatividade significativa, quando comparada à específica (Figura 1a). No momento em que o potencial da IgY na inibição do crescimento bacteriano foi avaliado, todas as concentrações tiveram efeito inibitório *in vitro*, quando comparado ao controle positivo (PBS) e IgY inespecífica (efeito placebo) na concentração constante de 300 µg/mL (Figura 1b). Entretanto, a concentração de 300 µg/mL da IgY específica obteve maior eficácia na neutralização do crescimento bacteriano, reduzindo em aproximadamente 28 UFC/mL em relação aos controles IgY inespecífica 112 UFC/mL e PBS 163 UFC/mL.

Figura 1 - Caracterização funcional da IgY anti-*Aeromonas hydrophila* *in vitro*. (a) Ensaio de opsonização *in vitro* da IgY e (b) atividade neutralizante do crescimento bacteriano. *Aeromonas hydrophila* na concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, controle positivo tampão fosfato salino (PBS) e placebo (IgY inespecífica) testado na concentração constante de 300 µg/mL. Médias em triplicatas e respectivo desvio padrão, letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos na mesma concentração e maiúsculas entre as concentrações, letras diferentes se diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



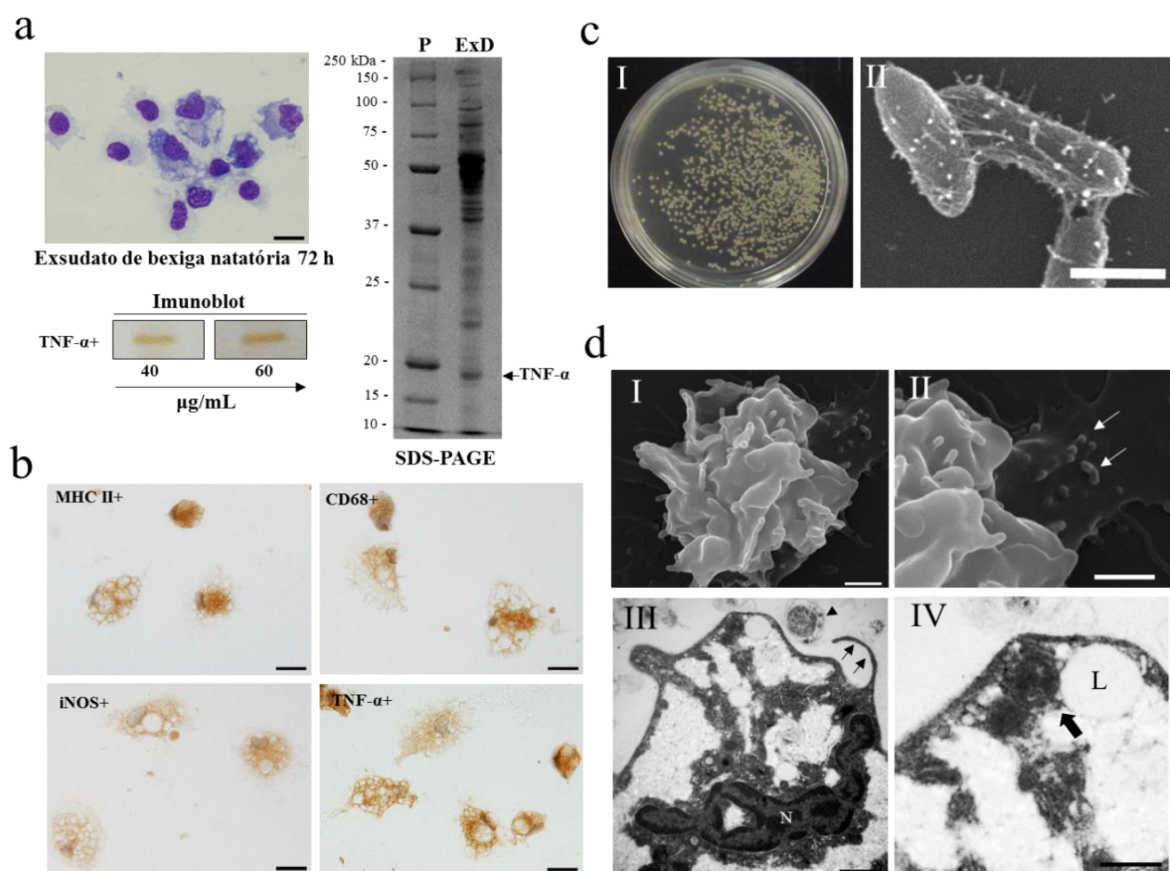
Fonte: Elaborado pela autora

3.2 Cultura de macrófagos

Após 72 h da aerocistite induzida com proteínas de membrana (PMs) de *A. hydrophila*, as células aderentes apresentaram características citomorfológicas de MΦs, com núcleos grandes e irregulares, citoplasma abundante com vacúolos citoplasmáticos. No mesmo período de tempo o proteinograma do sobrenadante do exsudato, indicou o padrão das proteínas inflamatórias e o imunoblot confirma a produção do TNF- α (massa molecular de 18,6 kDa) (Figura 2a). A imunocitoquímica mostrou células positivas para MHC de classe II e

CD68, caracterizando o fenótipo e a cultura de MΦs, assim como a produção de TNF- α provando o envolvimento dessas células no processo inflamatório e do iNOS na atividade fagolisossômica (Figura 2b). Após o isolamento e cultivo da *A. hydrophila* e dos MΦs, as características ultraestruturais por MEV de células providas da cultura de *A. hydrophila* evidenciaram a forma de bastonetes com presença do pili (Figura 2c), e na cultura de MΦs infectados por *A. hydrophila* foi observada uma célula em formato amebóide e estruturas em forma de bastonetes engolfados (Figura 2d). A MET prova o processo fagocítico pelos MΦs, com a ancoragem dos pseudópodes, engolfamento da célula bacteriana e fusão do lisossomo ao fagossomo, formando o fagolisossomo (Figura 2d).

Figura 2 - Caracterização celular e inflamatória de MΦs isolados da bexiga natatória de tilápias-do-nilo. (a) Citologia e perfil proteico do exsudado inflamatório (ExD); (b) imunocitoquímica (IC) da cultura de MΦs; (c) (I) cultura bacteriológica e (II) microscopia eletrônica de varredura (MEV) da *A. hydrophila* e (d) (I-II) MΦ em atividade fagocítica, setas apontam para o bastonetes engolfados e (III) na microscopia eletrônica de transmissão (MET) ponta da seta mostra a *A. hydrophila*, setas mostram a formação do pseudópode do MΦ e (N) núcleo; (IV) seta aponta o fagossomo e (L) lisossomo. Barras Wright e Giemsa (citologia): 10 μ m; IC: 10 μ m, hematoxilina de Harris e 3,3'-diaminobenzidina; MEV e MET: 0,5-1 μ m.

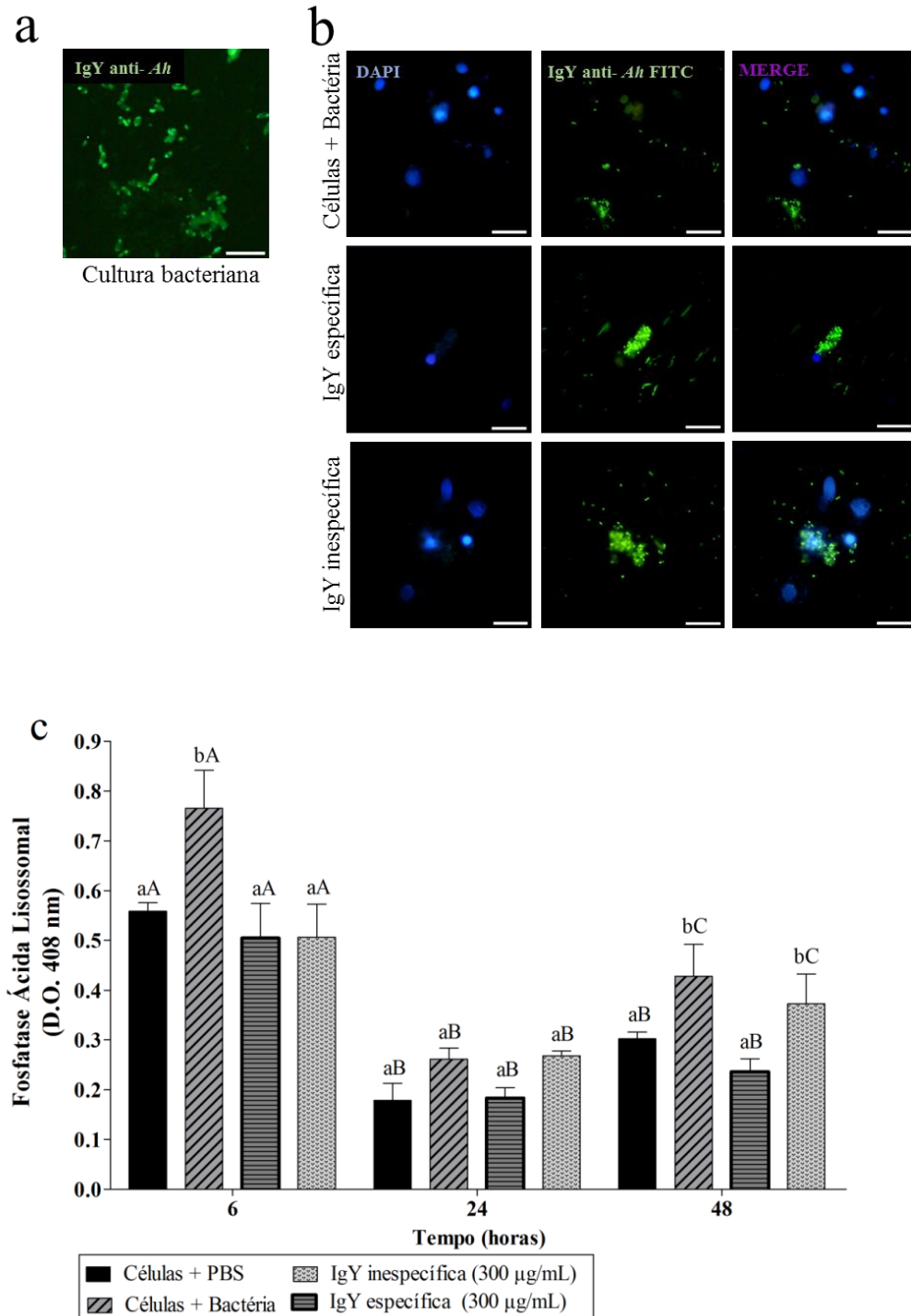


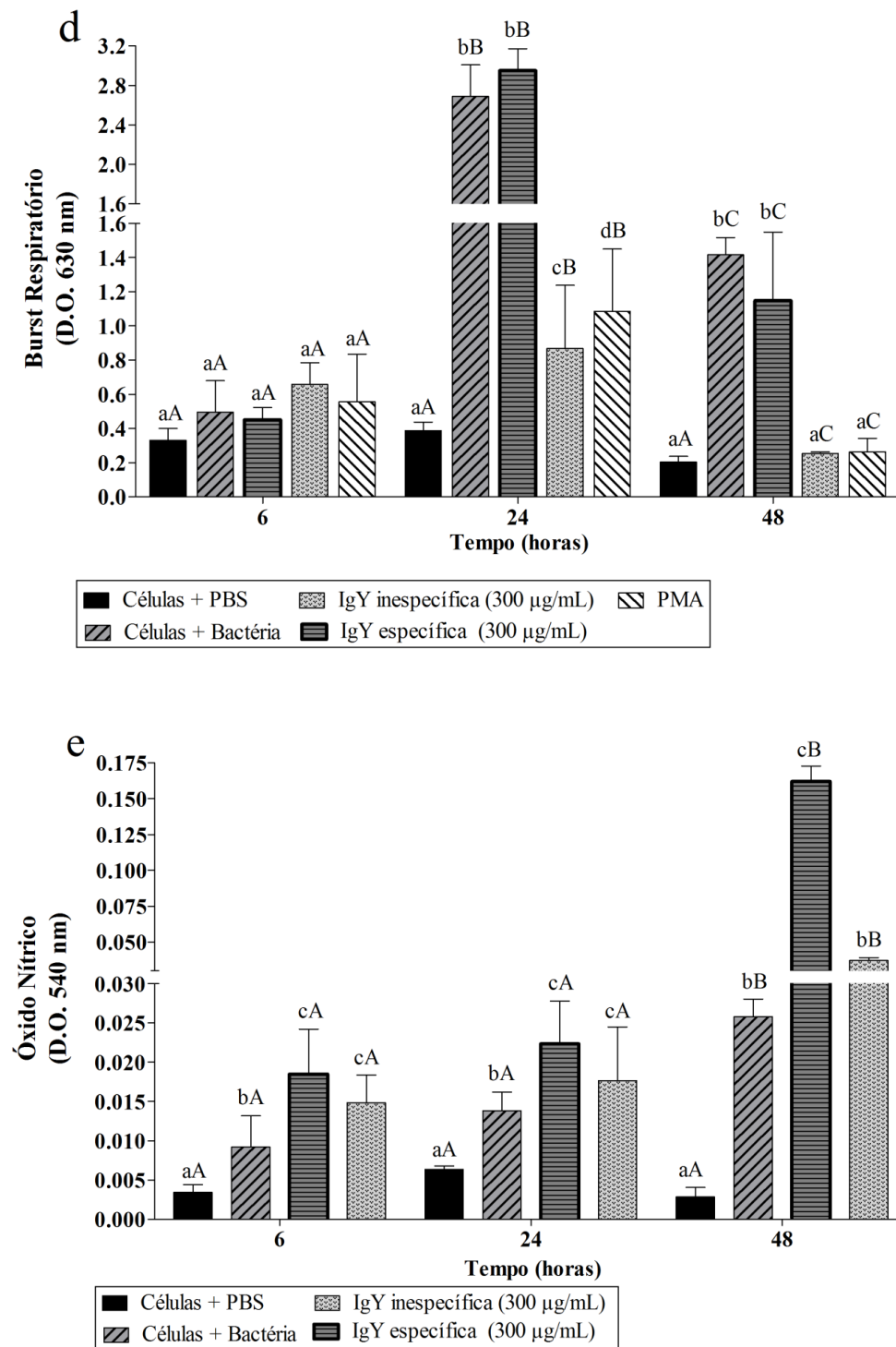
Fonte: Elaborado pela autora

3.3 Efeito da IgY na atividade fagolisossômica dos macrófagos infectados com *A. hydrophila*

A IgY anti- *A. hydrophila* FITC foi capaz de identificar as células bacterianas de *A. hydrophila* pela imunofluorescência direta e confirma a neutralização da célula bacteriana pelo anticorpo (Figura 3a). Nas imagens representativas no período de 48 h a capacidade de internalizar a *A. hydrophila* pelos MΦs foi evidenciada em todos os tratamentos, porém o tratamento com a IgY específica parece ter facilitado o processo fagocítico das células bacterianas, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 3b). Além disso, quando o processo fagolisossômico foi avaliado, a IgY específica teve efeito modulador na atividade da fosfatase ácida lisossômica reduzindo a atividade desta enzima no tempo experimental de 24 e 48 h após a infecção em relação aos demais tratamentos (Figura 3c), inclusive o controle negativo (células e PBS) apresentou níveis de atividade basais justificáveis, uma vez que os fagócitos foram previamente ativados na bexiga natatória com PMs de *A. hydrophila*, no controle positivo (célula + bactéria), houve um aumento no período entre 6 e 48 h pós infecção em relação aos demais tratamentos e a IgY inespecífica teve aumento com 6 e 48 h. Nas sequências dos eventos, a produção de ROIs teve início 6 h após a infecção e o maior nível de produção foi observado no tempo de 24 e 48 h para o tratamento IgY específica e controle positivo (células + bactéria) (Figura 3d). A produção de ON, aumentou em todos os tempos experimentais para os tratamentos infectados com *A. hydrophila*, entretanto, no tempo de 48 h apesar do controle positivo (célula + bactéria), IgY específica e inespecífica terem aumentado, somente a IgY específica apresentou diferença estatística comparada aos demais períodos e tratamentos (Figura 3e).

Figura 3 - Efeito da imunoglobulina Y na atividade fagolisossômica de MΦs de tilápias-do-nilo. (a) Detecção da *A. hydrophila* com a IgY específica conjugada com isotiocianato de fluoresceína (IgY anti- *A. hydrophila* FITC); (b) Imunofluorescência direta mostrando a fagocitose de *A. hydrophila* por MΦs no tempo de 48 h com respectivos tratamentos da IgY e marcada com IgY anti- *A. hydrophila* FITC; (c) Fosfatase ácida lisossomal, (d) atividade do burst respiratório e em (e) a produção de óxido nítrico. Barras: 10 µm. Médias em triplicatas e respectivo desvio padrão, letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos no mesmo tempo e maiúsculas entre os tempos, letras diferentes se diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).





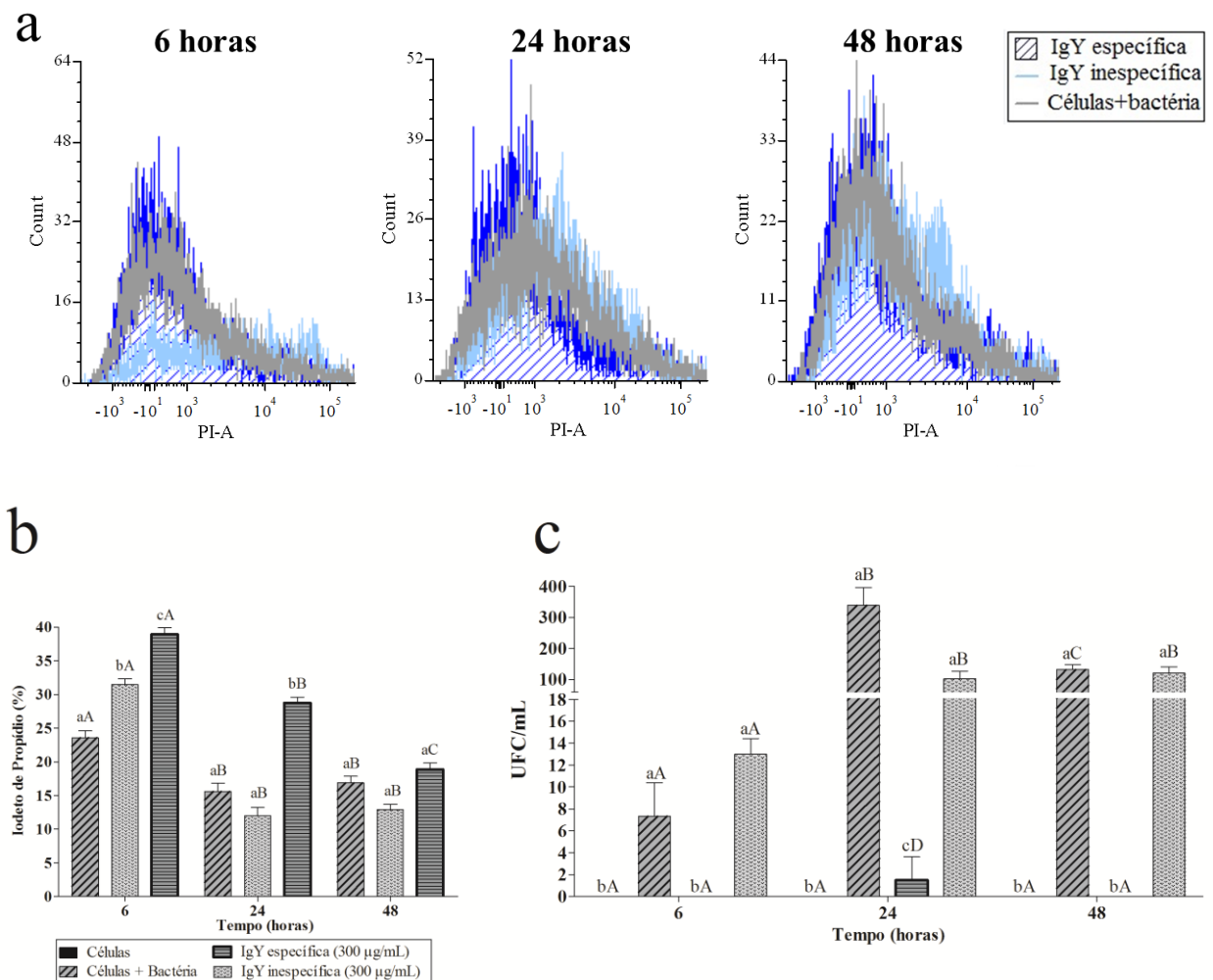
Fonte: Elaborado pela autora

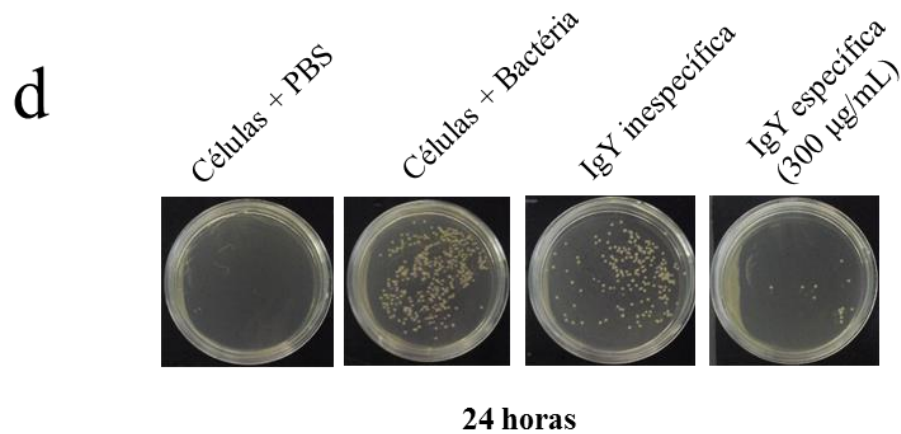
3.4 IgY na neutralização e sobrevivência da *A. hydrophila* em macrófagos

A IgY específica reduziu a sobrevivência intracelular da *A. hydrophila* nos MΦs, a citometria de fluxo através do histograma mostra o aumento da marcação do DNA bacteriano pelo PI nos tempos entre 6, 24 e 48 h após infecção em relação aos demais tratamentos

(Figura 4a) e a análise estatística confirma os achados (Figura 4b). Quando o conteúdo intracelular dos MΦs foi semeado em placa de cultura, o número de colônias bacterianas viáveis para o tratamento com IgY específica foi zero nos tempos entre 6 e 48 h pós infecção, e um crescimento mínimo foi observado no período de 24 h (Figura 4c). Na Figura 4d, imagens representativas do plaqueamento do conteúdo citoplasmático.

Figura 4 - Efeito da imunoglobulina Y na viabilidade intracelular da *A. hydrophila* em MΦs de tilápias-do-nilo. (a) Análise das fragmentações de DNA da *A. hydrophila* em cultivo de MΦs e marcadas com iodeto de propídio (PI). (b) porcentagem de células bacterianas inviáveis, (c) plaqueamento do conteúdo citoplasmático de MΦs infectados com *A. hydrophila* e (d) imagem representativa dos respectivos plaqueamentos após 24 h da infecção. Médias em triplicatas e respectivo desvio padrão, letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos no mesmo tempo e maiúsculas entre os tempos, letras diferentes se diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



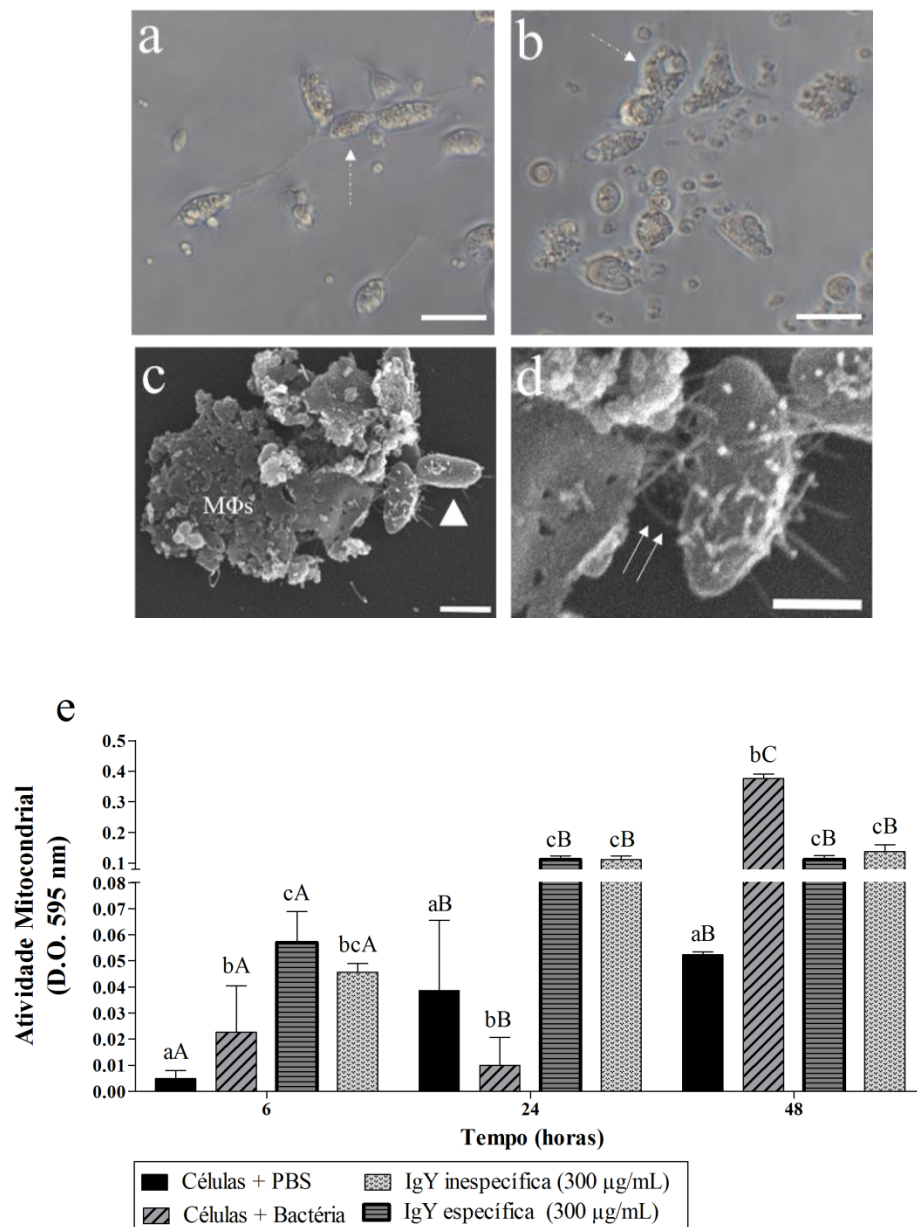


Fonte: Elaborado pela autora

3.5 Efeito da IgY na sobrevivência e proliferação de macrófagos infectados com *A. hydrophila*

O processo infeccioso da *A. hydrophila* na cultura de MΦs está ilustrado no vídeo complementar, sendo possível observar o movimento bacteriano, extra/intracelular no fagossomo do fagócito. A ativação dos MΦs é mostrada nas Figuras 5a-b e a adesão da *A. hydrophila* na célula, assim como seu efeito citolítico nas Figuras 5c-d. Quando a atividade mitocondrial foi avaliada, a IgY específica e inespecífica tiveram efeitos semelhantes com aumento da atividade mitocondrial pelos MΦs nos tempos entre 6 e 24 h, sofrendo uma redução destes índices no tempo de 48 h em relação ao controle positivo (célula + bactéria) (Figura 5e).

Figura 5 - Atividade mitocondrial dos MΦs infectados com *A. hydrophila*. (a-b) Cultura de MΦs, setas pontilhadas apontam para células em atividade; (c) mostra a adesão da *A. hydrophila* ao corpo necrótico de um MΦ (ponta da seta); em (d) a aderência do pili à célula (setas) e (e) mensuração da atividade mitocondrial dos MΦs infectados com *A. hydrophila*. Barras microscopia invertida: 10 μm; MEV: 0,5-1 μm. Médias em triplicatas e respectivo desvio padrão, letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos no mesmo tempo e maiúsculas entre os tempos, letras diferentes se diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora

4 DISCUSSÃO

A princípio, a IgY anti- *A. hydrophila* foi previamente caracterizada, avaliando sua especificidade para proteínas de membrana e citoplasmática de *A. hydrophila* e a capacidade de detectar e estudar a cinética da infecção pela bactéria homóloga nos tecidos infectados de tilápia-do-nilo (FERNANDES *et al.*, 2019). No presente estudo, o potencial da IgY na neutralização da *A. hydrophila in vitro* foi pré-determinado e a relação entre a quantidade ideal da IgY específica, necessária para a saturação dos sítios de ligação das proteínas de parede e membrana celular das bactérias foi 200-300 µg/mL em relação a dose infectante a 1.5×10^7 UFC/mL da *A. hydrophila*. Além disso, a mesma concentração da IgY foi eficaz na neutralização e consequente inibição do crescimento bacteriano *in vitro* provando os achados anteriores. Este efeito neutralizante *in vitro* da IgY é postulado na literatura científica, de forma que resultados semelhantes foram observados para *Vibrio anguillarum* (Li *et al.*, 2014), *Staphylococcus aureus* (GUIMARÃES *et al.*, 2009; TOBIAS *et al.*, 2012) e *Clostridium difficile* (PIZARRO-GUAJARDO *et al.*, 2017). A IgY inespecífica testada teve efeito neutralizante a níveis basais possivelmente advindos de ligações inespecíficas e reações cruzadas.

A obtenção de MΦs peritoneais em mamíferos pela pré-estimulação via cavidade peritoneal e a aspiração posterior destas células, apesar de ser um método postulado em mamíferos (HOOVER; NACY, 1984; ZHANG; GONCALVES; MOSSER, 2008; MARINKOVIC *et al.*, 2017) e peixes (WATANABE *et al.*, 1997; ISHIBE *et al.*, 2008; AWASTHI *et al.*, 2015), a obtenção de leucócitos via bexiga natatória, por se tratar de um órgão oco, tem vantagens pois propicia um microambiente estéril (MATUSHIMA; MARIANO, 1996; ZHANG *et al.*, 2016) e sem a presença de outros tecidos contaminantes como os intestinos, no caso da via peritoneal, evitando assim falhas no cultivo celular de MΦs, permitindo através da cronologia e cinética celular do processo inflamatório a obtenção de tipos celulares distintos, como neutrófilos no início do processo com 24 h (MATSUYAMA; IIDA; ENDO, 1999; GRATACAP *et al.*, 2017) e MΦs após 72 h como observado neste estudo. Somado a este fato, a aerocistite induzida com as PMs da *A. hydrophila* propiciou a pré-sensibilização e migração dos leucócitos e posterior obtenção dos MΦs, mimetizando a infecção em seu percurso natural. Visto que, parte destas proteínas tem potencial quimiotático tais como os ligantes microbianos para receptores fagocíticos

incluindo proteínas, glicoconjugados e lipídios complexos, como lipopolissacarídeos, lipoteicóicos e lipídeos micobacterianos (WILSON *et al.*, 2015). A obtenção dos MΦs pré-ativados na bexiga natatória e o uso da bioenergética celular para a migração para o foco inflamatório estabelece um parâmetro importante, permitindo avaliar esta célula em seu estado patofisiológico, acrescido de todos os mecanismos inflamatórios anteriores ao processo fagocítico do microrganismo propriamente dito. Apesar do uso de MΦs obtidos do rim cefálico (BRAUN-NESJE; KAPLAN; SELJELID, 1982; LI *et al.*, 2013) e monócitos sanguíneos (PIERRARD *et al.*, 2012; SHA *et al.*, 2017) serem bem difundidos, e a ativação *in vitro* dos monócitos com PMA (DAIGNEAULT *et al.*, 2010) e LPS (PLEVIN *et al.*, 2016) serem possíveis, o custo energético destas células utilizado para a migração não pode ser contabilizado. Além disso, estes ativadores não têm as mesmas propriedades que as proteínas bacterianas em sua totalidade. Em nosso estudo, a produção do TNF- α no sobrenadante do exsudato da bexiga natatória e sua expressão pelos MΦs na cultura, provam o fato da instalação do processo inflamatório (VERDEGUER; AOUADI, 2017), migração e a participação destas células na inflamação. Da mesma forma, a citomorfologia e a expressão do MHC de classe II e CD68 caracterizaram o fenótipo celular compatível com MΦs e a produção de iNOS a atividade fagolisossômica destas células.

Os principais fatores de virulência associados à *Aeromonas* spp. são cápsula, lipopolissacarídeo, glucana, camada S, exotoxinas e enzimas extracelulares, sistemas de secreção, fímbrias, motilidade e flagelos (TOMÁS, 2012). A presença do pili, e integridade das demais estruturas bacterianas observadas na análise ultraestrutural da *A. hydrophila* e a capacidade de infectar o hospedeiro vista no ensaio pré-estabelecida da dose letal 50 (DL50) (dados não mostrados), certificam a virulência desta cepa. A capacidade da *A. hydrophila* de infectar os MΦs e o processo fagolisossômico foram evidenciados na microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A IgY por ter múltipla especificidade para epítomos antigênicos distintos presentes nas proteínas de membrana e citoplasmática da *A. hydrophila* (FERNANDES *et al.*, 2019), parece ter neutralizado a célula bacteriana via proteínas de superfície e os fatores de virulência relacionados ao bloqueio do processo fagocítico, como a enzima superóxido dismutase (SOD) que dismuta o superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, neutralizando a via de produção de ROIs (ZHAO *et al.*, 2014). Interposto a este fato, a neutralização/opsonização da IgY anti- *A. hydrophila* foi comprovada no ensaio de imunofluorescência direta da cultura de *A. hydrophila*. Este achado conduz ao possível efeito

da IgY no bloqueio físico da motilidade bacteriana, facilitando a adesão e o englobamento por MΦs, como visto no mesmo ensaio com o aumento destes índices para o grupo tratado com IgY específica após 48 h. Além disso, a importância da motilidade bacteriana está na evasão do fagossomo (MITCHELL; CHEN; PORTNOY, 2016). A microscopia imunoelétrica revelou que a neutralização da IgY específica à superfície da bactéria resulta em alterações estruturais da parede celular, facilitando o processo fagocítico (SUNWOO *et al.*, 2010) e pode conferir mais hidrofobicidade superficial (THOMSEN *et al.*; 2015; QIN *et al.*, 2018).

Visto os efeitos neutralizantes, a IgY teve ação indireta a nível intracelular no fagolisossomo modulando a atividade da FA em todos os tempos experimentais reduzindo a atividade desta enzima. Os níveis basais da FA no grupo controle negativo eram esperados, uma vez que as células estavam pré-ativadas com PMs de *A. hydrophila*. Chung e Secombes (1987) observaram aumento na FA em MΦs pré-ativados com *Aeromonas salmonicida* inativada e emulsificada com adjuvante incompleto de Freund. Este achado justifica o aumento do controle positivo no período de 6 h pós-infecção. Dai *et al.* (2012) mostraram que a *Francisella* spp. tem pelo menos quatro fosfatases ácidas (FAs) Acp (-A, -B, -C e Hap) e suprime o burst oxidativo após a bactéria ser fagocitada por MΦs do hospedeiro (MOHAPATRA *et al.*, 2010). Os efeitos das FAs permitiram a sobrevivência da *Francisella* spp., evitando a morte intracelular no fagossomo dos MΦs (MOHAPATRA *et al.*, 2007). Efeitos semelhantes foram observados no início da infecção no tempo de 6 h com aumento da atividade da FA pelo tratamento controle positivo (células + bactéria), podendo estar relacionada com as FAs bacterianas, levantando em consideração a hipótese de que a *A. hydrophila* utiliza mecanismos semelhantes ao da *Francisella* spp., e a IgY específica parece ter bloqueado a atividade desta enzima bacteriana seletivamente, por ter reatividade para proteínas citoplasmáticas da *A. hydrophila* (FERNANDES *et al.*, 2019). Entretanto, este aumento pode estar associado à produção e atividade da FAL dos MΦs em resposta ao patógeno (XIA *et al.*, 2017). Posto isto, os níveis basais do tratamento IgY inespecífica foram parcialmente semelhantes ao do controle negativo (célula + PBS) provando a inatividade da IgY para a FA de MΦs da tilápia. Assim, a IgY específica teve efeito indireto e modulador sobre a atividade da FAL do fagócito do hospedeiro sendo postulado pela primeira vez, e devido a carência de informações sobre a atividade da FA fagolisossômica no processo fagocítico de MΦs de peixes, assim como a ação da IgY sobre esta enzima. Nossos achados

abrem novas perspectivas para compreender este mecanismo, em seu percurso infeccioso natural, visto no controle positivo e na intervenção da IgY aplicada à imunoterapia.

Na sequência dos eventos, o fato do aumento da FA no início do período de 6 h para todos os tratamentos era esperado, uma vez que a FA tem como finalidade alterar o pH fagolisossômico para a posterior ativação das demais enzimas associadas à produção do ânion superóxido (NEUMANN *et al.*, 2001) e a óxido nítrico sintase (DAVIES; CHATTINGS; EDWARD, 1991). Isto é fundamentado quando a produção do ânion superóxido tem início no tempo de 24 e 48 h, provando a influência da FA na produção destes reativos. Todavia, a produção de ON foi mais tardia aumentando os níveis em 48 h após a infecção para o tratamento com IgY específica, ocasionando a depuração intracelular da *A. hydrophila* como será discutido posteriormente. Qin *et al.* (2018) produziram IgY anti-*A. hydrophila* em galinhas imunizadas com *A. hydrophila* inativada e relataram a eficácia dos anticorpos na profilaxia e terapêutica da infecção por *A. hydrophila* em peixe *Megalobrama amblycephala*. Os resultados mostraram que a IgY anti-*A. hydrophila* em MΦs do rim cranial desafiado com *A. hydrophila* tiveram aumento na produção e liberação de ON e ânion superóxido, 60 min após infecção *in vitro*. Nossos resultados, apesar de distintos, são complementares aos dos autores, diferenciando o método de sensibilização e isolamento dos MΦs. Além do fato destas células terem utilizado energia metabólica na quimiotaxia, diapedese e migração para o foco inflamatório (SPRENGER *et al.*, 2018), além do percurso cronológico da infecção, evidenciando um estágio crônico do processo inflamatório e crítico da resposta fagocítica para *A. hydrophila*.

Quando a viabilidade intracelular da *A. hydrophila* foi avaliada, os efeitos da atividade fagolisossômica discutidos anteriormente pareceram confluir e a IgY específica reduziu a sobrevivência intracelular do patógeno no tempo de 6 h, porém com 24 h um crescimento da *A. hydrophila* foi observado, sugerindo uma possível tentativa de adaptação, através do bloqueio dos mecanismos fagocíticos pela *A. hydrophila*. Até certo ponto, esse resultado sustenta a hipótese de que a sobrevivência intracelular é uma estratégia para subverter mecanismos de defesa imunológicos e evitar concentrações bactericidas extracelulares como os antibióticos que podem levar a infecções crônicas ou recidivas (GARZONI; KELLEY, 2009). No tempo de 48 h, a IgY específica neutralizou a infecção, mostrado na citometria de fluxo pela marcação do DNA bacteriano e confirmado pelo plaqueamento e crescimento negativo do conteúdo citoplasmático dos MΦs. Assim, a IgY é

uma ferramenta potente contra a aeromonose, consequentemente substituindo o uso de antibióticos para o tratamento, pois não provoca efeito colateral, doença, resistência microbiana, ou resíduos tóxicos (COLEMAN, 1999; LI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2017).

A atividade mitocondrial foi mensurada para avaliar a atividade celular frente à infecção por *A. hydrophila*, e os resultados mostraram uma atividade dos MΦs nos tempos 6 e 24 h, reduzindo com 48 h, nos tratamentos IgY específica e inespecífica comparado com o aumento desta atividade com 48 h observado no controle positivo (células + bactéria), que apesar de ser uma resposta a infecção, traz a produção excessiva de radicais livres causando danos teciduais e gasto energético celular (ESCOLL *et al.*, 2017). Ao contrário, os tratamentos com IgY específica e inespecífica utilizaram menos dessa energia celular neste período de tempo e no caso da IgY específica, a infecção foi controlada, pela capacidade de neutralizar e bloquear os fatores de virulência da *A. hydrophila*, apesar de tais tratamentos terem apresentando atividade próxima, sugerimos no caso da IgY inespecífica a reação cruzada e uma pré-sensibilização por se tratar de uma proteína endógena promovendo tal efeito. O fato é que utilizar níveis maiores de energia mitocondrial, sugere que a *A. hydrophila* foi parcialmente depurada e os fatores de sobrevivência estavam ativos, incapacitando os MΦs de combater a infecção forçando a célula adaptar através do aumento da atividade mitocondrial. Qin *et al.* (2014) descreveram a importância do flagelo da *A. hydrophila* na infecção, mostrando que cepas mutantes desprovidas de flagelo denominadas B11, apesar de invadir os MΦs de *Anguilla japonica in vitro*, as bactérias sobreviveram nos MΦs por apenas 24 h, deduzindo que a motilidade flagelar contribui para a invasão e sobrevivência da *A. hydrophila* nos MΦs do hospedeiro. A camada S desempenha diversas funções biológicas como aderência, proteção contra o ataque pelo sistema complemento e fagócitos (BEVERIDGE *et al.*, 1997; RASMUSSEN-IVEY *et al.*, 2016). A enterotoxina citotóxica ativa da *A. hydrophila* se liga a uma glicoproteína da superfície da célula alvo formando poros na membrana da célula do hospedeiro, causando sinalização celular precoce em células eucarióticas, com ação importante nas infecções e, produção de mediadores da inflamação nos MΦ e células epiteliais (FERGUSON *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1998; TOMÁS, 2012). Além disso, é contribuinte importante para apoptose (GALINDO; GUTIERREZ; CHOPRA, 2006). Em concordância com os autores, a presença de pili e integridade da cápsula relatadas e a motilidade extra/intracelular nos MΦs da tilápia (vídeo complementar), além da adesão da *A. hydrophila* a um corpo celular necrótico, provam a capacidade de

infecção e a ação citolítica da bactéria. Visto isto, podemos sugerir que a IgY específica teve um efeito modulador indireto na atividade mitocondrial dos MΦs, reduzindo o gasto energético da resposta celular durante o percurso da inflamação e as PMs de *A. hydrophila* tiveram efeito basal na ativação mitocondrial observado no controle negativo.

O reconhecimento e adesão dos MΦs na bactéria opsonizada e não-opsonizada são mediados por receptores, para a fração Fc e para moléculas padrão de microrganismos respectivamente e as alterações nas condições físico-químicas da bactéria, potencializam a atividade fagocítica (THOMSEN *et al.*, 2016). Devido a distância filogenética entre aves e peixes (ETO *et al.*, 2018) e a diferença estrutural entre a molécula da IgY e da IgM do peixe, sendo o isotipo predominante no soro desta espécie, devido a não evolução da resposta imune humoral (FILLATREAU *et al.*, 2013), abrem questões importantes sobre qual receptor a fração Fc da IgY da ave interage nos MΦs do peixe ou de outros hospedeiros filogeneticamente distantes, necessitando este tema de estudos posteriores. Gray *et al.* (2016) sugerem que apesar da ativação dos receptores Fc serem importantes para o aumento da capacidade lisossômica, através da degradação da forma dependente do Fator de Transcrição EB (TFEB), gene responsável pela indução e ativação do lisossomo, células bacterianas de *E. coli* não opsonizadas também tem esta capacidade mostrando a independência deste receptor para a ativação desta via, provando ainda que os MΦs pré-infectados com a *E. coli* tem aumento na capacidade fagocítica. Isto prova que ação acentuada da IgY específica e moderada da inespecífica, podem estar associadas a ativação de outros receptores que não sejam ligantes para Fc dos MΦs do peixe, proporcionando a neutralização da *A. hydrophila*, no caso da específica e a sensibilização de outros receptores para a inespecífica.

Estudos promissores sobre o potencial bactericida da IgY para bactérias Gram negativas na imunoterapia e profilaxia contra doenças infecciosas foram elucidados, na infecção por *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística (THOMSEN *et al.*, 2016), *Acinetobacter baumannii* na sepse hospitalar adquirida e pneumonia (SHI *et al.*, 2017), *Porphyromonas gingivalis* na periodontite (XU; SELERIO-POELY; YE, 2018), *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* associados a gastroenterites em humanos (NEEMA *et al.*, 2012) e *Shewanella marisflavi* na síndrome ulcerativa da pele em pepinos do mar (*Apostichopus japonicus*) (XU *et al.*, 2019). Segundo Li *et al.* (2014) apesar dos MΦs terem sido isolados de rim cranial de peixe ayu eles foram tratados com IgY específica e infectados com *V. anguillarum* marcado com FITC e analisados 30 min após a infecção e os resultados

mostraram que a porcentagem fagocítica de MΦs do grupo tratado com a IgY específica foi maior do que o tratado com a IgY inespecífica. Estudos anteriores relataram que a IgY específica exibe atividades bactericidas e bacteriostáticas por opsonização da bactéria para fagocitose de MΦs, ou para inibir o crescimento bacteriano (ZHEN *et al.*, 2008; MAHDAVI *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2013).

Por fim, foi possível concluir em primeira instância que o método de sensibilização e isolamento dos MΦs via bexiga natatória foi eficaz e proporcionou a obtenção de culturas seletivas e um modelo funcional para estudo inflamatório e infeccioso. Interposto a isto, a IgY produzida, teve ação neutralizante sobre proteínas de superfície bacteriana e proteínas pré formadas no citoplasma bloqueando a adesão, facilitando a opsonização e fagocitose, assim como os mecanismos de sobrevivência intracelular da *A. hydrophila*. Foi observada ação moduladora no processo fagocítico na produção da FA e consequentemente dos ROIs controlando a infecção sem a produção excessiva destes radicais livres, evitando assim o dano tecidual para o hospedeiro. Além disso, foi mostrada a importância do ON na ação bactericida da *A. hydrophila*, assim como o percurso natural da infecção em um estágio crônico. A junção destes efeitos na neutralização da *A. hydrophila* proporcionou a redução no gasto energético dos MΦs, permitindo afirmar a ação terapêutica da IgY na infecção por *A. hydrophila*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, P. **Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System**. 15 ed. Elsevier. Sta Louis, Missouri, 2015.

ABDELHAMED, H.; IBRAHIM, I.; BAUMGARTNER, W.; LAWRENCE¹, M.L.; KARSI, A. Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1519, p. 1-15, 2017.

AWASTHI, A.; RATHORE, G.; SOOD, N.; KHAN, M. Y.; LAKRA, W. S. Establishment of a leukocyte cell line derived from peritoneal macrophages of fish, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). **Cytotechnology**, v. 67, p. 85-96, 2015.

BEVERIDGE T. J.; POUWELS, P. H.; SARA, M.; KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; KARI, K.; KEROSUO E.; HAAPASALO, M.; EGELSEER, E. M.; SCHOCHER, I.; SLEYTR, U. B.; MORELLI, L.; CALLEGARI, M. L.; NOMEILLINI, J. F.; BINGLE, W. H.; SMIT, J.; LEIBOVITZ, E.; LEMAIRE, M.; MIRAS, I.; SALAMITOU, S.; BÉGUIN, P.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; MATUSCHEK, M.; KOVAL, S. F. Functions of S-layers. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p. 99-149, 1997.

BHARADWAJ, A.; ABRAHAM, T. J.; JOARDAR, S. N. Immune effector activities in challenged rohu, *Labeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas* bacterin. **Aquaculture**, v. 392-395, p. 16-22, 2013.

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

BRAUN-NESJE, R.; KAPLAN, G.; SELJELID, R. Rainbow trout macrophages in vitro: morphology and phagocytic activity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 6, n. 2, p. 281-291, 1982.

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

CHUNG S.; SECOMBES C. J. Activation of rainbow trout macrophages. **The Journal of Fish Biology**, v. 31, p. 51-56, 1987.

CIPRIANO, R. C.; BULLOCK, G. L.; PYLE, S. ***Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish**. Washington, DC: United States Fish and Wildlife Service, 1984.

COLEMAN, M.A. **Oral administration of chicken yolk immunoglobulins to lower somatic cell count in the milk of lactating ruminants**, US Patent (1996) 5585098.

DAI, S.; MOHAPATRA, N. P.; SCHLESINGER, L. S.; GUNN, J. S. The acid phosphatase AcpA is secreted *in vitro* and in macrophages by *Francisella* spp. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 1088-1097, 2012.

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WHYTE, M. K. B.; DOCKRELL, D. H. The Identification of markers of macrophage differentiation in PMA-Stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PLoS One**, v. 5, p. 1-10, 2010.

DALLAL, M. M. S.; FARD, R. M. N.; TALKHABI, M. K.; AGHAIYAN, L.; SALEHIPOUR, Z. Prevalence, virulence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea. **GERMS**, v. 6, n. 3, p. 91-96, 2016.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 474-483, 2006.

DAVIES, B.; CHATTINGS, L. S.; EDWARD, S. W. Superoxide generation during phagocytosis by *Acanthamoeba Castellanii*: similarities to the respiratory burst of immune phagocytes. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 705-710, 1991.

ESCOLL, P.; SONG, O. R.; VIANA, F.; STEINER, B.; LAGACHE, T.; OLIVO-MARIN, J. C.; IMPENS, F.; BRODIN, P.; HILBI, H.; BUCHRIESER, C. *Legionella pneumophila* modulates mitochondrial dynamics to trigger metabolic repurposing of infected macrophages. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 3, p. 302-316, 2017.

ESTEBAN, M. A.; MULERO, V.; MUÑOZ, J.; MESEGUER, J. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. **Cell and Tissue Research**, v. 293, p. 133-141, 1998.

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; BALDASSI, A. C.; MANRIQUE, W. G.; SILVA, I. C.; MEDEIROS, A. S. R.; BELO, M. A. A.; BALBUENA, T. S.; SAMARA, S. I.; PIZAURIO J. M. Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 76, p. 153-160, 2018.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. edited by FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, Italy, 2011.

FERGUSON, M. R.; XU, X. J.; HOUSTON, C. W.; PETERSON, J. W.; COPPENHAVER, D. H.; POPOV, V. L.; CHOPRA, A. K. Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4299-4308, 1997.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; FUNNICELLI, M. I. G.; FERNANDES, C. C.; CHARLIE-SILVA, I.; BELO, M. A. A.; PIZAURIO, J. M. Immunoglobulin Y in the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 500, p. 576-585, 2018.

FILLATREAU, S.; SIX, A.; MAGADAN, S.; CASTRO, R.; SUNYER, J. O.; BOUDINOT, P. The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 28, p. 1-14, 2013.

GALINDO, C. L.; GUTIERREZ J. R., C.; CHOPRA, A. K. Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis. **Microbial Pathogenesis**, v. 40, n. 2, p. 56-68, 2006.

GAO, X.; ZHANG, X.; SUN, J.; DU, X.; LI, X.; ZHANG, Y.; LIN, L. Passive protection effect of anti-*Vibrio anguillarum* IgY-encapsulated feed on half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) against *V. anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.56, p. 483-488, 2016.

GARZONI, C.; KELLEY, W. L. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 59-65, 2009.

GRAYFER, L.; HODGKINSON, J. W.; BELOSEVIC, M. Analysis of the antimicrobial responses of primary phagocytes of the goldfish (*Carassius auratus* L.) against *Mycobacterium marinum*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, p. 1146-1158, 2011.

GRATACAP, R. L.; SCHERER, A. K.; SEMAN, B. G.; WHEELER, R.T. Control of mucosal candidiasis in the zebrafish swim bladder depends on neutrophils that block filament invasion and drive extracellular-trap production. **Infection and Immunity**, v. 85, p. 1-15, 2017.

GRAY, M. A; CHOY, C. H.; DAYAM, R. M.; OSPINA-ESCOBAR, E.; SOMERVILLE, A.; XIAO, X.; FERGUSON, S. M.; BOTELHO, R. J. Phagocytosis enhances lysosomal and bactericidal properties by activating the transcription factor TFEB. **Current Biology**, v. 26, p. 1-10, 2016.

GUIMARÃES, M. C.; AMARAL, L. G.; RANGEL, L. B.; SILVA, I. V.; MATTA, C. G.; MATTA, M. F. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, p. 377-382, 2009.

GUZ, L.; KOZIŃSKA, A. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 48, p. 391-395, 2004.

HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; LOGATO, P. V. R.; PICOLLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

HOOVER, D. L.; NACY, C. A. Macrophage activation to kill *Leishmania tropica*: Defective intracellular killing of amastigotes by macrophages elicited with sterile inflammatory agents. **The Journal of Immunology**, v.132, p. 1487-1491, 1984.

IBRAHIM, E.S.M.; RAHMAN, A.K.M.S.; ISODA, R.; UMEDA, K.; SA, N.V.; KODAMA, Y. In vitro and in vivo effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). **Vaccine**, v. 26, p. 2073-2080, 2008.

IBRAHIM-GRANET, O.; PHILIPPE, B.; BOLETI, H.; BOISVIEUX-ULRICH, E.; GRENET, D.; STERN, M.; LATGE, J. P. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 891-903, 2003.

IGBINOSA, I. H.; IGUMBOR, E. U.; AGHDASI, F.; TOM, M.; OKOH, A. I. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

- ISHIBE, K.; OSATOMI, K.; HARA, K.; KANAI, K.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, p. 243-251, 2008.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.
- JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. **Annual Review Fish Diseases**, v. 4, p. 315-343, 1994.
- JIN, L.; LI, X.; ZOU, D.; LI, S.; SONG, W.; XU, Y. Protection of crucian carp (*Carassius auratus Gibelio*) against septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila* using specific egg yolk immunoglobulins. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 928-936, 2013.
- KIVELL, B. M.; McDONALD F. J.; MILLER, J. H. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. **Brain Research Protocols**, v. 6, p. 91-99, 2001.
- KUMAR, R.; PANDE, V.; SINGH, L.; SHARMA, L.; SAXENA, N.; THAKURIA, D.; SINGH, A. K.; SAHOO, P. K. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in golden mahseer (*Tor putitora*). **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 7, p. 1-6, 2016.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A Review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4-22, 2012.
- LI, C. H.; LU, X. J.; LI, D. F.; CHEN, J. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Vibrio anguillarum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 37, p. 108-114, 2014.
- LI, Q.; AI, Q.; MAI, K.; XU, W.; ZHENG, Y. A comparative study: In vitro effects of EPA and DHA on immune functions of head-kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, p. 933-940, 2013.
- LI, Y.; WANG, L. L.; ZHEN, Y.H.; LI, S. Y.; XU, Y. P. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 40, n. 6, p. 1-10, 2015.
- LU, Y.; LIU, J.; JIN, L.; LI, X.; ZHEN, Y.; XUE, H.; YOU, J.; XU, Y. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 604-610, 2008.

MAHDAVI, A. H.; RAHMANI, H. R.; NILI, N.; SAMIE, A. H.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Chicken egg yolk antibody (IgY) powder against *Escherichia coli* 078:K80. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, p. 366-373, 2010.

MARINKOVIC, E.; DJOKIC, R.; LUKIC, I.; FILIPOVIC, A.; INICKANADA, A.; KOSANOVIC, D.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M.; STOJANOVIC, M. Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. 1-21, 2017.

MARTI, E.; JOFRE, J.; BALCAZAR, J. L. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Composition in a River Influenced by a Wastewater Treatment Plant. **PLoS One**, v. 8, p. 1-8, 2013.

MATSUYAMA, T.; IIDA, T.; ENDO, M. Isolation of inflammatory macrophages from swim bladder of tilapia. **Fish Pathology**, v. 34, n. 2, p. 83-84, 1999.

MATUSHIMA, E. R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MITCHELL, G.; CHEN, C.; PORTNOY, D. A. Strategies used by bacteria to grow in macrophages. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, p. 1-38, 2016.

MOHAPATRA, N. P.; SONI, S.; RAJARAM, M. V. S.; DANG, P. M. C.; REILLY, T. J.; EL-BENNA, J.; CLAY, C. D.; SCHLESINGER, L. S.; GUNN, J. S. *Francisella* acid phosphatases inactivate the NADPH oxidase in human phagocytes. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 5141-5150, 2010a.

MOHAPATRA, N. P.; SONI, S.; BELL, B. L.; WARREN, R.; ERNST, R. K. MUSZYNSKI, A.; CARLSON, R. W. GUNN, J. S. Identification of an orphan response regulator required for the virulence of *Francisella* spp. and transcription of pathogenicity island genes. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p. 3305-3314, 2007b.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

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

NEEMA, K.; MTENGA, A. B.; SHIM, W. B.; CHUNG, D. H. The in vitro and in vivo efficacy of hen IgY against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1423-1431, 2012.

NEUMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A. J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 807-825, 2001.

NGUYEN, S.V.; UMEDA, K.; YOKOYAMA, H.; TOHYA, Y.; KODAMA, Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to *Canine parvovirus-2* by specific antibody from chicken egg yolk. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 62-64, 2006.

NIKOSKELAINEN, S.; VERHO, S.; AIRAS, K.; LILIUS, E. M. Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by bacterium *Aeromonas salmonicida* can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, p. 525-537, 2005.

PIERRARD, M.A.; ROLAND, K.; KESTEMONT, P.; DIEU, M.; RAES, M.; SILVESTRE, F. Fish peripheral blood mononuclear cells preparation for future monitoring applications. **Analytical Biochemistry**, v. 426, n. 2, p. 153-165, 2012.

PIZARRO-GUAJARDO, M.; DÍAZ-GONZÁLEZ, F.; ÁLVAREZ-LOBOS, M.; PAREDES-SABJA, D. Characterization of chicken IgY specific to *Clostridium difficile* R20291 spores and the effect of oral administration in mouse models of initiation and recurrent disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-16, 2017.

PLEVIN, R. E.; KNOLL, M.; MCKAY, M.; ARBABI, S.; CUSCHIERI, J. The Role of lipopolysaccharide structure in monocyte activation and cytokine secretion. **Shock**, v. 45, n. 1, p. 22-27, 2016.

PLUMB, J. A.; HANSON, L. A. **Health Maintenance and Principal Micro-bial Diseases of Cultured Fishes**, 3rd edn. Ames, IA: Wiley-Blackwell, p. 492, 2011.

QIN, Z.; BABU, V. S.; LI, N.; FU, T.; LI, J.; YI, L.; ZHAO, L.; LI, J.; ZHOU, Y.; LIN, L. Protective effects of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 78, p. 26-34, 2018.

QIN, Y.; LIN, G.; CHEN, W.; HUANG, B.; HUANG, W.; YAN, Q. Flagellar motility contributes to the invasion and survival of *Aeromonas hydrophila* in *Anguilla japonica* macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, p. 273-279, 2014.

QIU, T.; SHEN, X.; TIAN, Z.; HUANG, R.; LI, X.; WANG, J.; WANG, R.; SUN, Y.; JIANG, Y.; LEI, H.; ZHANG, H. IgY reduces AFB₁-induced cytotoxicity, cellular dysfunction, and genotoxicity in human L-02 hepatocytes and swan 71 trophoblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1543-1550, 2018.

RAO, P. S. S.; LIM, T. M.; LEUNG, K. Y. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5689-5697, 2001.

RASMUSSEN-IVEY, C. R.; FIGUERAS, M. J.; MCGAREY, D.; LILES, M. R. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1337, p. 1-10, 2016.

RIBEIRO, A. M. L.; RUDNIK, L.; CANAL, C. W.; KRATZ, L. R.; FARIAS, C. Uso de gemas de ovos de aves hiperimunizadas contra *Escherichia coli* suína no controle da diarreia neonatal de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1234-1239, 2005.

SHA, Z.; WANG, L.; SUN, L.; CHEN, Y.; ZHENG, Y.; XIN, M.; LI, C.; CHEN, S. Isolation and characterization of monocyte/macrophage from peripheral blood of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 65, p. 256-266, 2017.

SHI, H.; ZHU, J.; ZOU, B.; SHI, L.; DU, L.; LONG, Y.; WANG, H.; XU, H.; ZHEN, Y.; SUN, L. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1734-1742, 2017.

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.

SLAUCH, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular Microbiology*, v. 80, n. 3, 580-583, 2011.

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

SPRENGER, M.; KASPER, L.; HENSEL, M.; HUBE, B. Metabolic adaptation of intracellular bacteria and fungi to macrophages. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, p. 215-227, 2018.

STACHOWIAK, M.; CLARK, S.; TEMPLIN, R.; BAKER, K. Tetracycline-resistant *Escherichia coli* in a small stream receiving fish hatchery effluent. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 211, n. 1, p. 251-259, 2010.

STAFFORD, J. L.; GALVEZ, F.; GOSS, G. G.; BELOSEVIC, M. Induction of nitric oxide and respiratory burst response in activated goldfish macrophages requires potassium channel activity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, n. 5, p. 445-459, 2002.

STRATEV, D.; STOEV, S.; VASHIN, I.; DASKALOV, H. Some varieties of pathological changes in eximentalper infection of carps (*Cyprinus carpio*) with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research**, v. 1, n. 4, p. 191-202, 2015.

SUNWOO, H. H.; LEE, E. N.; GUJRAL, N.; SURESH., M. R. Growth inhibition of *Escherichia coli* 987P by neutralizing IgY antibodies. **The Open Immunology Journal**, v. 3, p. 1-8, 2010.

TAVARES, A. B.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-8, 2015.

THOMSEN, K.; CHRISTOPHERSEN, L.; BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P. O.; MOSER, C.; HOIBY, N. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies induce specific bacterial aggregation and internalization in human polymorphonuclear neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 7, p. 2686-2693, 2015.

THOMSEN, K.; CHRISTOPHERSEN, L.; JENSEN, P. O.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; HOIBY, N. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 7, p. 1690-1699, 2016.

TOBIAS, F. L.; GARCIA, L. N. N.; KANASHIRO, M. M.; MEDINA-ACOSTA, E.; BROM-DE-LUNA, J. G.; ALMEIDA, C. M. C.; AZEVEDO JUNIOR, R. R.; LEMOS, M.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by neutralizing igy antibodies from ostrich egg yolk. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 544-551, 2012.

TOMÁS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN Microbiology**, p. 1-22, 2012.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486-503, 2011.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-23, 2017.

VERDEGUER, F.; AOUADI, M. Macrophage heterogeneity and energy metabolism. **Experimental Cell Research**, v. 360, p. 35-40, 2017.

VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. **Infection**, v. 35, n. 2, p. 59-64, 2007.

XIA, H.; TANG, Y.; LU, F.; LUO, Y.; YANG, P.; WANG, W.; JIANG, J.; LI, N.; HAN, Q.; LIU, F.; LIU, L. The effect of *Aeromonas hydrophila* infection on the non-specific immunity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Central European Journal of Immunology**, v. 42, n. 3, 2017.

XU, X. J.; FERGUSON, M. R.; POPOV, V. L.; HOUSTON, C. W.; PETERSON, J. W.; CHOPRA, A. K. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3501-3509, 1998.

XU, Y.; SELERIO-POELY, T.; YE, X. Clinical and microbiological effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* as an adjunct in the treatment of moderate to severe chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 48, n. 1, p. 47-59, 2018.

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The Isolation and characterization of murine macrophages. **Current Protocols in Immunology**, v.83, p. 1-18, 2008.

ZHANG, Y.; LIU, H.; YAO, J.; HUANG, Y.; QIN, S.; SUN, Z.; XU, Y.; WAN, S.; CHENG, H.; LI, C.; ZHANG, X.; KE, Y. Manipulating the air-filled zebrafish swim bladder as a neutrophilic inflammation model for acute lung injury. **Cell Death and Disease**, v.7, e2470, 2016.

ZHAO, D. X.; CHEN, L. Q.; QIN, J. G.; QIN, C. J.; ZHANG, H.; WU, P.; LI, E. C. Molecular characterization of a cytosolic manganese superoxide dismutase from the chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9429-9442, 2014.

ZHEN, Y. H.; JIN, L. J.; GUO, J.; LI, X. Y.; LU, Y. N.; CHEN, J.; XU, Y. P. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 126-133, 2008.

WATANABE, T.; SHOHO, T.; OHTA, H.; KUBO, N.; KONO, M.; FURUKAWA, K. Long-term cell culture of resident peritoneal macrophages from red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v. 63, n. 6, p. 862-866, 1997.

WILSON, G. J.; MARAKALALA, M. J.; HOVING, J. C.; VAN LAARHOVEN, A.; DRUMMOND, R. A.; KERSCHER, B.; KEETON, R.; VAN DE VOSSE, E.; OTTENHOFF, T. H.; PLANTINGA, T. S.; ALISJAHNANA, B.; GOVENDER, D.; BESRA, G. S.; NETEA, M. G.; REID, D. M. WILLMENT, J. A.; JACOBS, M.; YAMASAKI, S.; VAN CREVEL, R.; BROWN, G. D. The C-type lectin receptor CLECSF8/CLEC4D is a key component of anti-mycobacterial immunity. **Cell Host Microbe**, v. 17, p. 252-259, 2015.

YANG, T. T.; SINAI, P.; KAIN, S. R. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. **Analytical Biochemistry**, v. 241, p. 103-108, 1996.

YANG, Y. H.; PARK, D.; YANG, G.; LEE, S. H.; BAE, D. K.; KYUNG, J.; KIM, D.; CHOI, E. K.; SON, J. C.; HWANG, S. Y.; KIM, Y. B. Anti-*Helicobacter pylori* effects of IgY from egg yolk of immunized hens. **Laboratory Animal Research**, v. 28, n. 1, 55-60, 2012.

CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES

No Capítulo II, a IgY anti-*A. hydrophila* foi capaz de detectar células de *A. hydrophila* em tecidos de tilápia-do-nilo infectados com a bactéria homóloga. Visto a deficiência e dificuldade para a obtenção de imunomarcadores específicos para moléculas de tilápias-do-nilo, assim como para os patógenos que infectam este organismo aquático. A validação da IgY no diagnóstico da *A. hydrophila* possibilitou sua aplicação para kits de imunodiagnóstico. Prova disso, é que em 2017 nosso grupo de pesquisa desenvolveu, um kit de diagnóstico rápido e de baixo custo, para a detecção de vários microrganismos que acometem a produção aquícola, tal tecnologia foi depositada pela Agência Unesp de Inovação (AUIN), no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) número de registro BR1020170087360.

Os resultados do Capítulo III, contribuíram para a o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa na terapêutica de enfermidades bacterianas em organismos aquáticos, bem como para a compreensão parcial do processo fagocítico na infecção natural e o mecanismo de ação da IgY anti-*A. hydrophila* neste processo. Além disso, esses resultados demonstraram que a IgY pode substituir o uso abusivo de antibióticos na água, e por consequência evitar a geração da seleção de bactérias resistentes, colaborando diretamente para o setor de saúde pública. Somado aos fatos, tais aplicações poderão fomentar duas cadeias produtivas, aves e peixes, agregando valores na produção de ovos e possibilitando a criação de organismos aquáticos livres de resíduos de antibióticos, podendo promover uma certificação positiva na produção pesqueira.

APÊNDICE A



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Produção e transferência passiva de anticorpos da classe IgY anti-A. *hydrophila* extraídos da gema do ovo de galinhas poedeiras na imunização de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**”, protocolo nº 017204/15, 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 julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de 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 06 de Julho de 2017.

Vigência do Projeto	01/10/2015 a 01/12/2019
Espécie / Linhagem	<i>Oreochromis niloticus</i> e <i>White leghorn</i>
Nº de animais	200 e 07, respectivamente
Peso / Idade	150g / 5 meses e ~2kg / 32 semanas, respectivamente
Sexo	Machos e fêmeas / fêmeas, respectivamente
Origem	<i>Oreochromis niloticus</i> – Piscicultura / Caunesp / UNESP <i>White leghorn</i> – Aviário / UNESP

Jaboticabal, 06 de julho de 2017.



Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA