



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

LETÍCIA COELHO DA CRUZ

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO USO DE ANTICORPOS IgY COMO MOLÉCULAS
PARA PROTEÇÃO E TRATAMENTO CONTRA DOENÇAS DIARREICAS**

MANAUS – AMAZONAS

2026

LETÍCIA COELHO DA CRUZ

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO USO DE ANTICORPOS IgY COMO MOLÉCULAS
PARA PROTEÇÃO E TRATAMENTO CONTRA DOENÇAS DIARREICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em saúde.

Orientador: Dr. Luis André Morais Mariúba
Coorientadora: Dra. Juliane Corrêa Glória

**MANAUS-AMAZONAS
2026**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- C957a Cruz, Letícia Coelho da
Avaliação in vivo do uso de anticorpos IgY como moléculas para
proteção e tratamento contra doenças diarreicas / Letícia Coelho da Cruz. -
2026.
118 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Luis André Morais Mariúba.
Coorientador(a): Juliane Corrêa Glória.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus-AM, 2026.
1. Shigella (bactéria). 2. Escherichia coli (bactéria). 3. diarreio gênica. 4.
Imunoglobulina Y. I. Mariúba, Luis André Morais. II. Glória, Juliane
Corrêa. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. IV. Título
-

LETÍCIA COELHO DA CRUZ

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO USO DE ANTICORPOS IgY COMO MOLÉCULAS
PARA PROTEÇÃO E TRATAMENTO CONTRA DOENÇAS DIARREICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em saúde.

APROVADA EM: 23/07/2026

Orientador: Dr. Luis André Moraes Mariúba

Coorientadora: Dra. Juliane Corrêa Glória

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís André Moraes Mariúba, Presidente
Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ ILMD

Prof. Dr. Edson do Carmo Junior, Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dra. Elisangela Farias da Silva, Membro
Centro do Estudos Superiores de Tabatinga-CESTB/UEA

RESUMO

As infecções entéricas constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente em países em desenvolvimento, afetando principalmente crianças menores de cinco anos, idosos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos. Além disso, o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos tem impulsionado a busca por estratégias alternativas para a prevenção e o tratamento dessas infecções. Nesse contexto, as imunoglobulinas Y (IgY) destacam-se como uma alternativa promissora para a imunoterapia passiva, devido à sua elevada especificidade, facilidade de obtenção, menor custo de produção e vantagens éticas em relação aos anticorpos produzidos em mamíferos. Esta dissertação teve como objetivo reunir evidências sobre as aplicações da tecnologia IgY e avaliar o potencial de anticorpos IgY previamente produzidos contra peptídeos sintéticos derivados de enteropatógenos. No capítulo I desta dissertação é apresentada uma revisão da literatura sobre as principais aplicações diagnósticas e terapêuticas desses anticorpos. No capítulo II, foram avaliadas a capacidade de reconhecimento dos anticorpos frente às bactérias *Shigella flexneri*, *Salmonella* spp. e subtipos de *Escherichia coli* diarreiogênicas por citometria de fluxo, bem como sua atividade *in vitro* por meio dos ensaios de difusão em ágar, concentração inibitória mínima e acompanhamento do crescimento bacteriano. Posteriormente, foi investigado o potencial protetor dos anticorpos em modelo murino de infecção por *Shigella flexneri*. Os resultados demonstraram elevada capacidade de reconhecimento dos enteropatógenos pelos anticorpos anti-P1 e anti-P8, embora não tenha sido observada atividade bacteriostática ou bactericida nas condições experimentais avaliadas. No modelo *in vivo*, o tratamento com o anticorpo anti-P1 apresentou uma tendência de proteção clínica frente à infecção. Esses achados reforçam o potencial da tecnologia IgY como estratégia complementar para o controle de enteropatógenos e incentivam o desenvolvimento de novas abordagens de imunoterapia passiva contra doenças diarreicas.

PALAVRAS-CHAVE: *Shigella*; *Escherichia coli*; diarreiogênica; Imunoglobulina Y.

ABSTRACT

Enteric infections are a major cause of morbidity and mortality, especially in developing countries, primarily affecting children under five years of age, the elderly, pregnant women, and immunocompromised individuals. Furthermore, the increasing bacterial resistance to antimicrobials has driven the search for alternative strategies for the prevention and treatment of these infections. In this context, immunoglobulin Y (IgY) stands out as a promising alternative for passive immunotherapy due to its high specificity, ease of acquisition, lower production cost, and ethical advantages compared to antibodies produced in mammals. This dissertation aimed to gather evidence on the applications of IgY technology and evaluate the potential of previously produced IgY antibodies against synthetic peptides derived from enteropathogens. Chapter I of this dissertation presents a literature review on the main diagnostic and therapeutic applications of these antibodies. Chapter II, the recognition capacity of the antibodies against the bacteria *Shigella flexneri* and *Salmonella* spp. was evaluated. This study investigated the identification of diarrheagenic *Escherichia coli* subtypes by flow cytometry, as well as their *in vitro* activity through agar diffusion assays, minimum inhibitory concentration, and bacterial growth monitoring. Subsequently, the protective potential of antibodies was investigated in a murine model of *Shigella flexneri* infection. The results demonstrated a high capacity for recognition of enteropathogens by anti-P1 and anti-P8 antibodies, although no bacteriostatic or bactericidal activity was observed under the experimental conditions evaluated. In the *in vivo* model, treatment with the anti-P1 antibody showed a trend towards clinical protection against infection. These findings reinforce the potential of IgY technology as a complementary strategy for the control of enteropathogens and encourage the development of new passive immunotherapy approaches against diarrheal diseases.

KEYWORDS: *Shigella*; *Escherichia coli*; diarrheagenic; Immunoglobulin Y.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidade por diarreia em 2016. Taxa de mortalidade em indivíduos de todas as idades (A), crianças menores de cinco anos (B) e adultos maiores de 70 anos (C).

Figura 2. Taxa de mortalidade por diarreia por *Shigella* (A) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (B) por 100.000 pessoas em 2016 para todas as idades.

Figura 3. Padrões de colonização e adesão da *E. coli*. Mecanismos de patogenicidade dos principais patótipos de *Escherichia coli* diarreiogênica. A figura demonstra as estratégias de colonização e interação com o epitélio intestinal empregadas por ETEC, STEC, EPEC, EAEC, EIEC e DAEC, incluindo adesão, produção de toxinas, invasão celular e formação de biofilme.

Figura 4. Desenho esquemático dos fatores de adesão de STEC e do MFGM bovino. CM: membrana citoplasmática; PGN: peptidoglicano; OM: membrana externa; LPS: lipopolissacarídeo; LP: lipoproteína; Tir: Receptor de intimina translocado; T3SS: sistema de secreção tipo 3; CMH: Membrana citoplasmática do hospedeiro; CPS: Polissacarídeo capsular; EPS: Polissacarídeo extracelular; LpfA: subunidade A da fímbria polar longa; CsgA: subunidade curlin principal; EcpA: subunidade A do pilus comum de *E. coli*; FmlA: subunidade A da fímbria tipo 1; ElfA: subunidade A da fímbria de ligação à laminina; SfpA: subunidade A da fímbria fermentadora de sorbitol; FimH: adesina específica de fímbria D-manose tipo 1; HcpA: subunidade A da coli pilus hemorrágica; SfaA: subunidade A da fímbria S; AggB: Fímbria de adesão agregativa I subunidade B; YbgD: suposta subunidade A da fímbria Ybg; YehA: Fímbria suposta subunidade Yeh A; Cah: homólogo do antígeno 43 de ligação ao cálcio; AIDA-I: adesina envolvida na adesão difusa; Eha: autotransportador enterohemorrágico de *E. coli*; Ag43: antígeno 43; EspP: plasmídeo de serina protease extracelular codificado; EspC: proteína C secretada por EPEC; PssA: protease secretada por STEC; EibG: proteína G de ligação à imunoglobulina de *E. coli*; Saa: autotransportador de adesão autoaglutinante de STEC; Sab: autotransportador de STEC que contribui para a formação de biofilme; Paa: proteína associada a A/E suína; Efa1: fator EHEC para adesão; Iha: adesina homóloga de IrgA; OmpA: proteína A da membrana externa; ToxB: toxina B; Slp: lipoproteína induzível por falta de carbono; FdeC: fator de adesão de *E. coli*; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. MUC1/MUC15: Mucina 1/15; LDH: Lactaderina; ADPH: Adipofilina; BTN: Butirofilina; XDH/XO: Xantina desidrogenase/oxidase; CD36: Cluster de diferenciação 36; PP3: Proteose peptona 3; TAG: triacilgliceróis.

Figura 5. Estrutura cristalina do domínio da lectina FimH ligado ao éster meta-metílico do bifenil manosídeo. A adesão celular mediada por FimH a proteínas manosiladas é crítica na capacidade da *E. coli* uropatogênica (UPEC) de colonizar e invadir o epitélio da bexiga durante a infecção do trato urinário.

Figura 6: Estrutura da solução de alta resolução do domínio transmembrana da proteína A da membrana externa.

Figura 7: Osmoporina OmpC de *E. coli* K12.

Figura 8. Representação esquemática de IgY de galinha e IgG de mamífero: moléculas de anticorpos contendo duas cadeias pesadas e duas leves conectadas por ligações dissulfato. O domínio de anticorpos de fragmento (Fab) se liga a epítomos antigênicos. O domínio cristalizável de fragmento (Fc) interage com a superfície das células e tem funções efectoras biológicas.

Figura 9: Dot-Blot da resposta humoral da ave sem imunização e das sete imunizações. Na linha A está presente o “pool 1” e linha B o “pool 2”.

Figura 10: Dotblot dos peptídeos na galinha 1. Na linha A está presente o soro do animal após a 4ª imunização; na linha B está o soro negativo; na linha C está sem a presença do primário.

Figura 11: Dotblot dos peptídeos na galinha 2. Na linha A está presente o soro do animal após a 6ª imunização; na linha B está o soro negativo; na linha C está sem a presença do primário.

Figura 12: Gráfico da citometria de fluxo do anticorpo P1 e P8. **(A)** Porcentagem de células fluorescentes na amostra P1. **(B)** Porcentagem de células fluorescentes na amostra P8. **(C)** Intensidade média de fluorescência (*Mean Fluorescence Intensity* – MFI) na amostra P1. **(D)** Intensidade média de fluorescência (MFI) na amostra P8. Os grupos experimentais incluem os controles (CN, EBF, anti-chicken e EBF + anti-chicken) e os diferentes isolados bacterianos representativos dos patótipos de *Escherichia coli* diarreio gênica e *Shigella*. Os valores estão expressos como porcentagem de células fluorescentes ou intensidade média de fluorescência.

Figura 13: Placa do experimento de concentração inibitória mínima.

Figura 14: Gráfico de crescimento bacteriano. (A) crescimento bacteriano contendo o anticorpo IgY P1. (B) crescimento bacteriano contendo o anticorpo IgY P8. (C) crescimento bacteriano sem IgY (controle).

Figura 15: Variação percentual média ($\pm$ desvio padrão) do peso corporal de camundongos em relação ao Dia 0, durante 5 dias de experimento, para os Grupos 1 (Controle -), 2 (Infectado + PBS), 3 (Infectado + IgY P1) e 4 (Infectado + IgY P8). A linha pontilhada horizontal em 0% indica o peso corporal basal (Dia 0).

Figura 16: Evolução Temporal do Score Médio de Sintomas por Grupo Experimental. O gráfico apresenta quatro heatmaps que ilustram a evolução do score médio de seis sintomas (Fezes, Pelo, Olhos, Postura, Atv. Locomotora e Desidratação) ao longo de cinco dias (Dia 0 a Dia 4) para diferentes grupos experimentais. Os scores variam de 0 a 2, com cores mais intensas (vermelho/laranja) indicando scores médios mais elevados e cores mais claras (amarelo) indicando scores mais baixos. Os grupos experimentais são: Grupo 1 (Controle -), animais não infectados; Grupo 2 (Infectado + PBS), animais infectados tratados com PBS (controle); Grupo 3 (Infectado + IgY P1), animais infectados tratados com imunoglobulina Y do pool 1; e Grupo 4 (Infectado + IgY P8), animais infectados tratados com imunoglobulina Y do pool 8. Animais que foram a óbito ou eutanasiados são representados nos dias subsequentes e não são considerados no cálculo da média para aquele dia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações dos peptídeos.

Tabela 2: Delineamento experimental para avaliação *in vivo*.

Tabela 3 - Critério de avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.

Tabela 4 - Atividade antibacteriana pelo método de difusão ágar.

LISTA DE ABREVIACÕES

E. coli – *Escherichia coli*

DEC – *Escherichia coli* diarreogênica

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EHEC - *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

DAEC - *Escherichia coli* aderente difusa

S. dysenteriae – *Shigella dysenteriae*

S. boydii – *Shigella boydii*

S. flexneri – *Shigella flexneri*

S. sonnei – *Shigella sonnei*

RAM – Resistência Antimicrobiana

IgY – imunoglobulina Y

IgG – imunoglobulina G

NHS - N-hidroxissuccinimida

EDC - Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil

NTC – nanotubo de carbono

LB – Meio de cultura Luria bertani

PBS - phosphate buffered saline

PEG - Polietileno Glicol

BSA – Albumina sérica bovina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1 Epidemiologia da síndrome diarreioagênica	15
1.2 Epidemiologia no Brasil	17
1.3 Aspectos gerais e epidemiologia de <i>Shigella</i> sp	18
1.4 Aspectos gerais e epidemiologia de <i>Escherichia coli</i>	20
1.5 Fatores de virulência bacteriana	26
1.6 Tratamento de doenças diarreioagênicas	31
1.7 Tecnologia IgY	34
1.8 Estudos anteriores do grupo de Diagnóstico e controle de doenças infecciosas na Amazônia (DCDIA-FIOCRUZ)	36
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
CAPÍTULO I	39
CAPÍTULO II	73
5. CONCLUSÃO GERAL	103
6. PERSPECTIVAS	106
7. REFERÊNCIAS	108
8. ANEXOS	116

BIBLIOGRÁFICAS..... 108

INTRODUÇÃO

As infecções entéricas representam uma parcela importante das doenças que causam morte e incapacidade, principalmente nas regiões menos desenvolvidas do mundo. Os mais afetados são crianças menores de cinco anos e grupos especiais, como por exemplo, imunocomprometidos, idosos e mulheres grávidas (Tennant *et al.*, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a UNICEF, a cada ano são registrados dois bilhões de casos de doença diarreica mundialmente, e 1,9 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade morrem em decorrência desta enfermidade (Farthing *et al.*, 2012).

As doenças diarreicas apresentam ampla disseminação em todo o mundo, estando associadas principalmente à transmissão pela via fecal-oral, por meio do consumo de água e alimentos contaminados, contato direto entre indivíduos e condições inadequadas de saneamento básico e higiene (World Health Organization, 2024). A elevada capacidade de disseminação de agentes etiológicos, como *Escherichia coli* diarreiogênica e *Shigella*, favorece a ocorrência de surtos, especialmente em regiões com infraestrutura sanitária deficiente, alta densidade populacional e acesso limitado à água potável (Kotloff *et al.*, 2018; GBD 2021 Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2025). Além disso, a globalização, a intensa circulação de pessoas e alimentos e o aumento da resistência aos antimicrobianos contribuem para a manutenção dessas infecções como um importante problema de saúde pública (World Health Organization, 2024; GBD 2021 Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2025).

Diversos enteropatógenos como protozoários, helmintos, vírus e bactérias podem causar infecções entéricas (Taniuchiet *al.*, 2012; Walker *et al.*, 2010), porém, os mais conhecidos e frequentes são as bactérias *Shigella* e *Escherichia coli*, (Burisk *et al.*, 2022). Pertencentes à família Enterobacteriaceae, ambas as bactérias infectam trato gastrointestinal humano, estabelecendo sua colonização intestinal em poucas horas. Geralmente, ao romperem as barreiras gastrointestinais do hospedeiro, principalmente pessoas debilitadas ou imunocomprometidos, essas bactérias provocam a síndrome diarreica, podendo levar o hospedeiro a óbito rapidamente, decorrente de complicações como desidratação grave ou sepse (Nguyen *et al.*, 2005; Nataro e Kaper, 1998; Parsot *et al.*, 2005).

A *Escherichia coli* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, tendo como principal habitat o trato intestinal humano e animal. A *E. coli* comensal, que faz parte da microbiota intestinal, não é patogênica e apresenta um importante papel fisiológico para o funcionamento do organismo. Existem seis categorias patogênicas de *E. coli* que causam infecção intestinal em homens e animais e são mais conhecidas, sendo denominadas de *E. coli* diarreiogênicas as quais se diferenciam pela presença de fatores

de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (Souza *et al.*, 2016). Porém, recentemente já se conta com mais duas cepas, totalizando oito, incluindo *E. coli* aderente invasiva (AIEC) e a *E. coli* extraintestinal (ExPEC).

Os microrganismos do gênero *Shigella*, são responsáveis pela disenteria bacilar que leva a um alto número de infecções e pode acometer mortes em todo o mundo a cada ano, e é um patovar de *E. coli* por apresentar grande semelhança com esta. O gênero inclui quatro espécies, diferenciadas com base em características bioquímico-fisiológicas e antigênicas: *S. dysenteriae* (sorogrupo A), *S. flexneri* (sorogrupo B), *S. boydii* (sorogrupo C) e *S. sonnei* (sorogrupo D) (Noriega *et al.*, 1995; Bopp *et al.*, 2003; Foccacia, 2005). As *Shigella* spp. são introduzidas no organismo por via oral e atravessam a barreira gástrica com relativa facilidade, sendo então conduzidas para os intestinos delgado e grosso. Entre as bactérias enteropatogênicas, a *Shigella* é a que mais tolera a acidez gástrica, pois ao detectarem a presença do ácido, é ativado um complexo sistema de regulação que lhes permite sobreviver no ambiente estomacal, e é por isso que elas atravessam a barreira gástrica com facilidade (Foccacia, 2005).

O aumento da resistência dos patógenos aos antibióticos agrava ainda mais os esforços para gestão de tratamento. A crescente preocupação global da Organização Mundial da Saúde destaca a necessidade de medidas de controle, como controle ambiental, higiene adequada e vacinas para reduzir a prevalência da doença (Odunto *et al.*, 2022). Considerando a situação crítica apresentada, cientistas têm se empenhado em estudos alternativos que possam contribuir para uma solução de casos de donças diarreicas.

Estudos recentes, evidenciaram que a produção de anticorpos aviários, Imunoglobulinas Y (IgY), tem sido utilizada como alternativa aos anticorpos de mamíferos visto que: é um método de baixo custo produtivo; de obtenção menos invasiva; possui atividade biológica funcional semelhante à de anticorpos de mamíferos. Possui também a capacidade de atender a necessidade de reduzir, substituir e melhorar o uso de animais, uma vez que os IgY podem ser obtidos através de galinhas poedeiras, levando a uma menor exposição ao sofrimento e redução significativa no número de animais utilizados em experimentos (Khan *et al.*, 2017; Pacheco *et al.*, 2023).

1. REFERENCIAL TEÓRICO

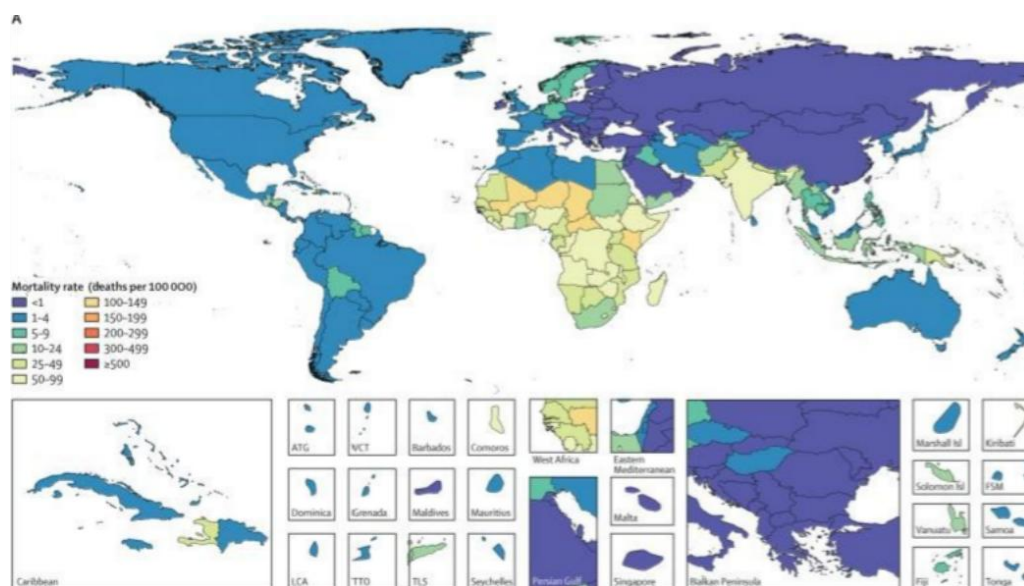
1.1 Epidemiologia da síndrome diarreioagênica

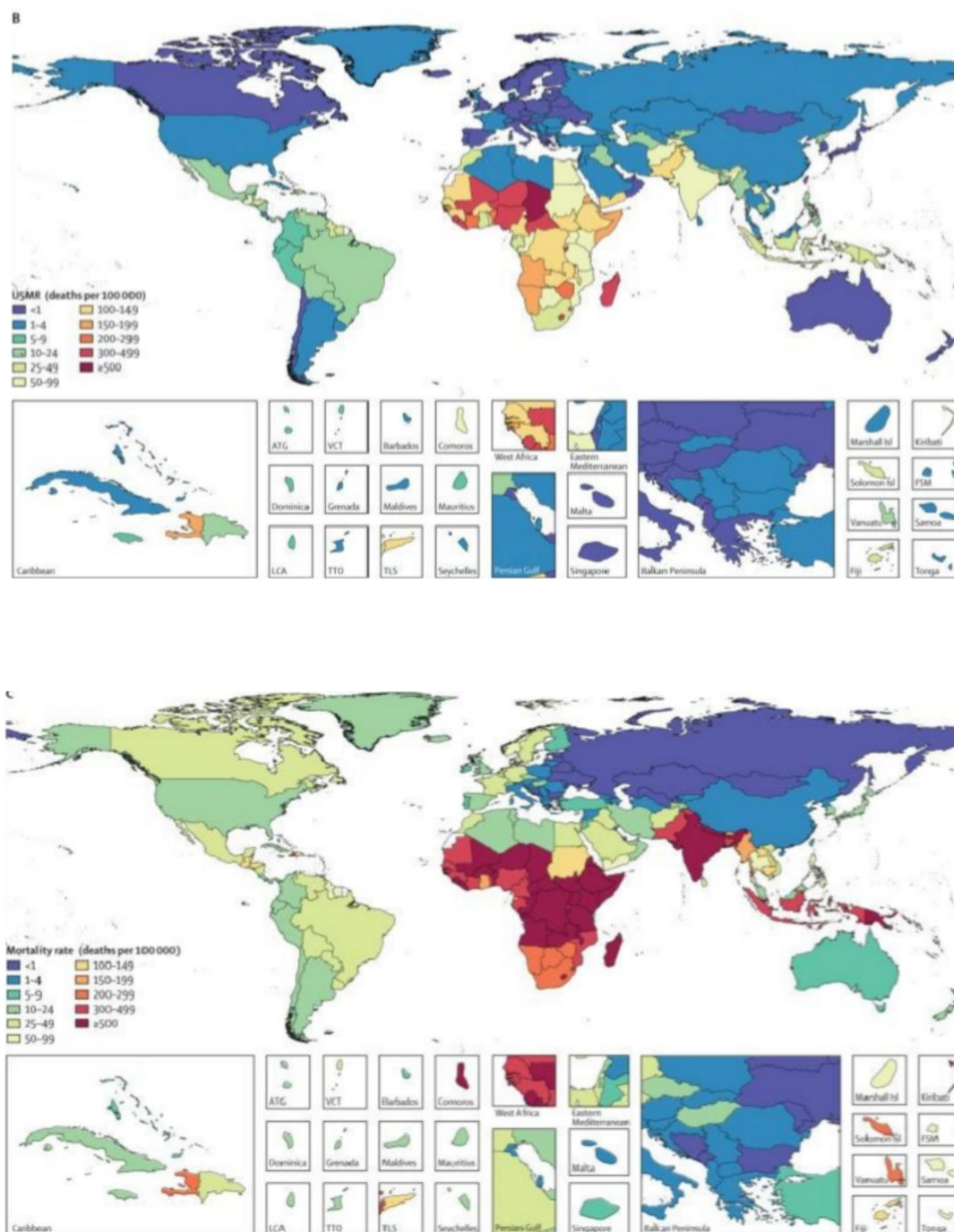
A diarreia é geralmente um sintoma de infecção no trato intestinal causada por diferentes agentes biológicos, incluindo bactérias, vírus, protozoários e helmintos entéricos. É a principal causa de mortalidade e morbidade infantil, podendo afetar também gestantes, idosos e pessoas imunocomprometidas. Entre os agentes etiológicos da diarreia, os patógenos bacterianos transmitidos tanto por alimentos quanto através da água contaminada, têm sido foco grande preocupação de saúde pública em países de baixa e média renda (Belina *et al.*, 2023).

As doenças diarreicas que são disseminadas pela água incluem cólera, campilobacteriose, febre tifoide, salmonelose, shigelose/disenteria bacilar, criptosporidiose, amebíase (disenteria amebiana) e outras doenças gastroenterites causadas por adenovírus, astrovírus, calcivírus, enterovírus, reovírus e rotavírus (Meki *et al.*, 2022).

Em 2016, a diarreia foi a oitava principal causa de mortalidade responsável por mais de 1,6 milhões de mortes (figura 1). Mais de um quarto das mortes ocorreram entre crianças menores de 5 anos, e cerca de 90% das mortes por diarreia ocorreram no sul da Ásia e na África Subsaariana, isso porque evidências mostram que as doenças diarreicas afetam desproporcionalmente locais com acesso precário a cuidados de saúde, água potável e saneamento básico, afetando principalmente populações de baixa renda (Abdoli; Maspi, 2018).

Figura 1: Mortalidade por diarreia em 2016. Taxa de mortalidade em indivíduos de todas as idades (A), crianças menores de cinco anos (B) e adultos maiores de 70 anos (C).





Fonte: Abdoli e Maspi, 2018.

A diarreia pode induzir a desidratação grave devido à perda de fluidos e resultar em certos distúrbios eletrolíticos, falta de vitaminas e desnutrição. Em decorrência disso, a diarreia aumenta o risco de doenças fatais e apresenta impactos de longo prazo em atrasos no desenvolvimento físico e cognitivo de crianças menores de cinco anos de idade (Bao *et al.*, 2023).

No estudo conduzido por Bao *et al.* (2023) o rotavírus, membro da família Reoviridae, foi reconhecido como um patógeno líder global de diarreia. Este

enteropatógeno é predominantemente transmitido pela via fecal-oral e infecta enterócitos no intestino delgado, causa má absorção, estimula a secreção intestinal e ativa o sistema nervoso entérico, levando a diarreia. É a terceira principal etiologia associada à mortalidade entre crianças menores de cinco anos, atrás da malária e da pneumonia por *Streptococcus* sp.

Dessa maneira, as infecções entéricas continuam sendo uma das principais preocupações globais de saúde, respondendo por aproximadamente 1,6 milhões de mortes por ano, das quais mais de 25% são crianças menores de cinco anos (Taebnia; Romling; Lauschke, 2022). Embora minimizar a desnutrição, a água potável contaminada e o saneamento inseguro constituam os principais meios e para a prevenção de doenças, adquirir uma compreensão mais aprofundada da homeostase intestinal e da patogênese é de grande importância para o desenvolvimento de novas terapias.

1.2 Epidemiologia no Brasil

Nos países em desenvolvimento, a maioria dos quadros de diarreia aguda e das mortes causadas por diarreia ocorre em crianças menores de cinco anos. Estima-se que 55,3% das crianças do Brasil apresentam infecção por enteroparasitas, o que assume grande relevância não apenas por conta da morbidade, mas também pela associação com a diarreia crônica e desnutrição (Pedraza *et al.*, 2014). Dados mais recentes da OMS mostram que em 2024 o Brasil registrou mais de 8 milhões de casos de doenças diarreicas agudas (DDA) e em 2023 foram registrados mais de 5.500 óbitos pela doença no país.

O Brasil apresenta grande diversidade demográfica, econômica, social, cultural e de saúde em suas diferentes regiões. A região norte, por exemplo, compreende a maior parte da Amazônia brasileira. Nessa ampla região de clima tropical úmido, anualmente as oscilações climáticas são intensificadas pelas enchentes, formando condições favoráveis para a propagação das doenças diarreicas infecciosas (Duarte *et al.*, 2019).

Na região norte, em Manaus, foi realizado um estudo no qual 1.339 crianças apresentaram diarreia durante o período de agosto de 2007 a julho de 2008. As espécies de *Shigella* foram a quinta causa mais comum de diarreia (2,2%), seguida por *Escherichia coli* enteropatogênica em 837 casos (62,1%), seguidos por 207 crianças com rotavírus (15,4%) e 192 com espécies de *Salmonella* (14,3%). A infecção por protozoários foi observada em 46 casos: *Entamoeba histolytica* foi encontrada em 16 casos, 14 para *Giardia lamblia*, 13 para *Entamoeba coli* e 3 para *Balantidium coli*. Vinte e quatro crianças tiveram diarreia associada a vermes, 9 por *Enterobius vermiculares*, 9 por *Ascaris lumbricoides*, 4 por espécies de *Ancylostoma* e 2 por *Trichiura trichuris*. E

ainda assim, a etiologia da diarreia em 199 crianças era desconhecida (da Cruz *et al.*, 2014).

No Brasil, as infecções causadas por *Shigella sonnei* estão atreladas a regiões socioeconomicamente desenvolvidas como o Sudeste, enquanto as infecções causadas pelo sorogrupo *Shigella flexneri* ocorreram com maior frequência em regiões como o Norte e Nordeste (Sousa *et al.*, 2010). Em Minas gerais, cerca de 90% das infecções foram causadas por *S. sonnei* e 80% foram causadas por *S. flexneri* no Piauí, na maior parte em crianças com idade inferior a 2 anos (Nunes *et al.*, 2012).

Spano *et al.* (2017) avaliaram a alta prevalência de *Escherichia coli* diarreiogênica portadora de genes codificadores de toxinas isoladas de crianças e adultos no sudoeste do Brasil. Nesse estudo, um total de 327 amostras de fezes foram coletadas de crianças e adultos com diarreia, onde diferentes subtipos de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) foram identificados. Os resultados mostraram que a DEC foi detectada em 56 (40%) crianças e 74 (39%) em adultos. A mais dominante foi a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), seguida pela *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Além disso, os resultados mostraram que a alta proporção de EAEC e DAEC portadores de genes codificadores de toxinas está presente entre adultos com diarreia.

1.3 Aspectos gerais e epidemiologia da *Shigella* sp.

Shigella é um bastonete Gram-negativa, facultativamente anaeróbica, não formadora de esporos e não móvel, gênero bacteriano pertencente à família Enterobacteriaceae e composto por quatro espécies principais: *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. flexneri* e *S. sonnei* (Shad; Shad, 2020).

O gênero *Shigella* spp. é um dos patógenos diarreicos mais prevalentes na Ásia, particularmente no sul da Ásia, e é responsável pela shigelose, uma infecção intestinal também conhecida como disenteria bacilar. Entre as quatro espécies de *Shigella*, mais de 90% dos casos globais de shigelose são causados por *S. flexneri* e *S. sonnei* (Salleh *et al.*, 2022). A *S. sonnei* é a principal espécie de *Shigella* em países de alta renda, e foi documentada uma tendência emergente na qual a *S. sonnei* está gradualmente substituindo a *S. flexneri* como a principal causa de shigelose em países que passam por desenvolvimento econômico e melhorias no saneamento e na qualidade da água (Asato *et al.*, 2024).

A incidência global anual estimada de shigelose é de 188 milhões de casos, e aproximadamente 164.000 casos resultam em morte. Surtos de shigelose ocorrem

sempre que guerras ou desastres naturais resultam em condições de vida anti-higiênicas, superlotação e saneamento precário. O aumento das temperaturas também aumenta consideravelmente o risco de doenças diarreicas, como a shigelose (Aslam *et al.*, 2024).

A mortalidade global por diarreia em indivíduos com mais de 5 anos foi dominada pela *Shigella*, tendo em vista que das 438 mortes atribuídas à *Shigella* em 2016, quase 70% ocorreram em indivíduos maiores de 5 anos (Abdoli; Maspi, 2018).

Em um estudo mais recente, Liu *et al.* (2023) aborda sobre a importância de discriminar a *E. coli* de *Shigella* spp. de forma rápida e precisa, a fim de facilitar o diagnóstico clínico, a prevenção e controle de infecções por esses organismos. Além disso, cita que da perspectiva clínica, a *Shigella* spp., são responsáveis pela disenteria com risco de vida, denominada de shigelose, infecção que leva a alta morbidade e mortalidade infantil globalmente, enquanto as *E. coli* são normalmente comensais encontrados na microbiota intestinal humana. No entanto, entre os muitos subtipos de *E. coli*, a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) se comporta de forma similar à *Shigella* spp., causando invasão e destruição inflamatória do epitélio do cólon humano, o que também leva ao desenvolvimento da shigelose.

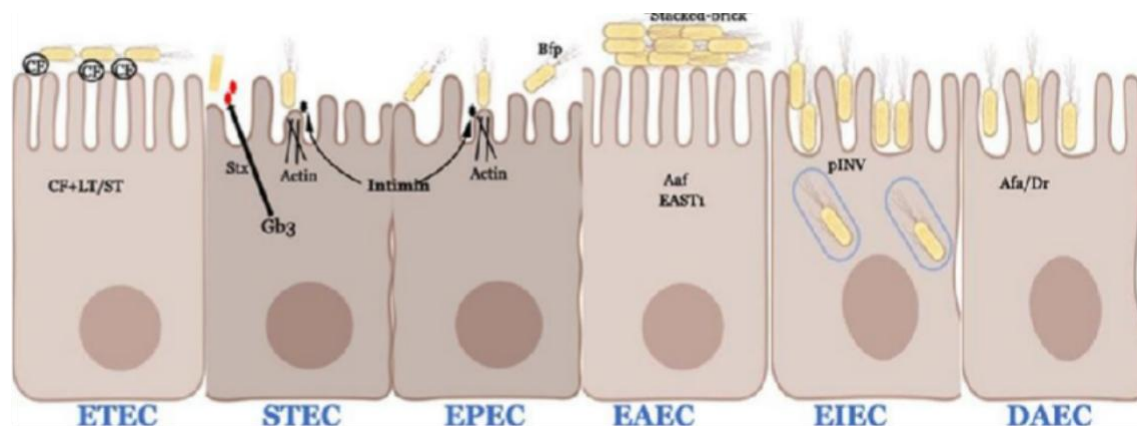
No Brasil, entre os patógenos causadores de gastroenterites, a *Shigella* spp. têm sido relatada entre as quatro bactérias mais isoladas de fezes diarreicas, com prevalência variando de 8 a 10% em crianças menores de 1 ano de idade e de 15 a 18% em crianças maiores de 2 anos. Especificamente, as maiores taxas de isolamento foram relatadas nas regiões Sudeste (40%) e nordeste (34%), enquanto nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sul, as taxas são menores com um percentual de 13%, 10% e 3%, respectivamente. A espécie mais frequentemente descritas nesses casos tem sido *S. flexneri* (53%), com maior incidência no Nordeste do Brasil (Gonzales *et al.*, 2020).

No estudo de Afrad *et al.* (2024), que teve como objetivo avaliar a prevalência, resistência microbiana e os fatores de riscos associados às infecções por *Shigella*, de maio de 2014 a maio de 2022, um total de 31.517 pacientes foram inscritos para vigilância das infecções por *Shigella*, com 55,7% sendo homens. Mais de 50% dos pacientes com diarreia inscritos tinham menos de 5 anos, 30,3% tinham entre 18 e 45 anos e 7% tinham entre 46 e 60 anos. Do total de inscritos citado anteriormente, 24.357 amostras de fezes estavam disponíveis para cultura microbiológica, e 1,8% (445/24.357) delas testaram positivo para *Shigella* spp. A maioria dos casos positivos tinha menos de 5 anos e 27% tinham entre 18 e 45 anos, 58% eram do sexo masculino.

1.4 Aspectos gerais e epidemiologia da *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um dos agentes etiológicos de diarreia mais importantes e amplamente estudados em todo o mundo. Embora seja um membro benigno da microbiota intestinal, algumas cepas de *E. coli* adquiriram horizontalmente características de virulência que lhes permitem causar doenças diarreioagênicas e extraintestinais em humanos e outros animais. Os patógenos de *E. coli* diarreioagênica humana (DEC) incluem *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (figura 2) (Jesser; Levy, 2020).

Figura 2: Padrões de colonização e adesão da *E. coli*. Mecanismos de patogenicidade dos principais patótipos de *Escherichia coli* diarreioagênica. A figura demonstra as estratégias de colonização e interação com o epitélio intestinal empregadas por ETEC, STEC, EPEC, EAEC, EIEC e DAEC, incluindo adesão, produção de toxinas, invasão celular e formação de biofilme.



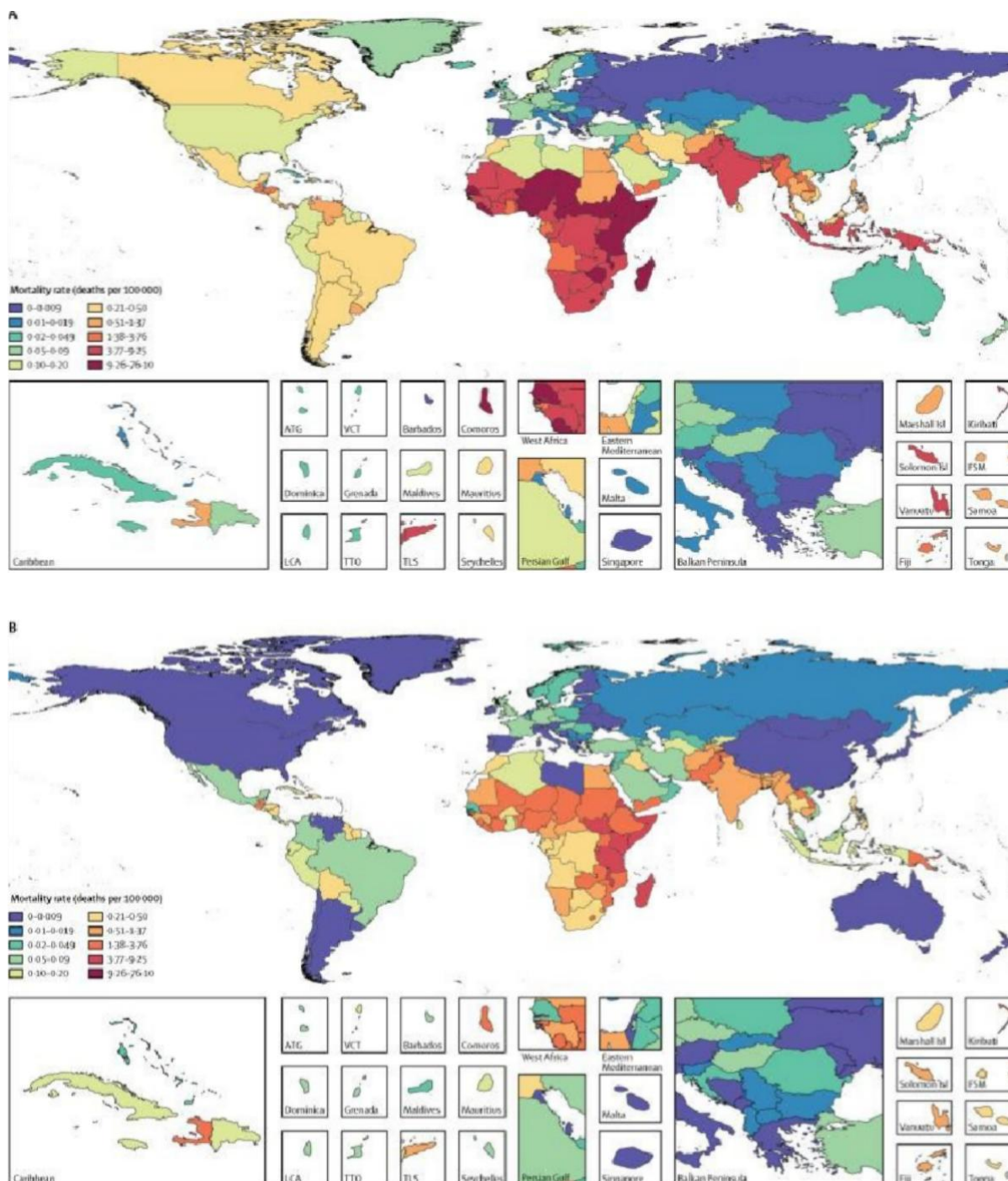
Fonte: Opeyemi et al., 2021.

Os fatores de risco atrelados à colonização intestinal e à disseminação da infecção por DEC em humanos incluem práticas precárias de saneamentos e higiene, como defecação a céu aberto, falta de água limpa e instalações inadequadas para lavagem das mãos. A desnutrição e as infecções por HIV/AIDS também são fatores de risco significativos para infecção por DEC, pois enfraquecem o sistema imunológico e tornam os indivíduos mais suscetíveis a infecções (Okumu *et al.*, 2023).

Escherichia coli Enterotoxigênica (ETEC) e a *Shigella* spp. são as duas das principais causas de mortalidade por diarreia, e juntas foram responsáveis por mais de 250.000 mortes em 2016 e cerca de 20% das mortes por diarreia no mundo todo (Khalil *et al.*, 2018).

O estudo de Khalil *et al.* (2018) estimou 63.713 mortes por *Shigella* spp. e 18.669 mortes por ETEC entre crianças menores de 5 anos, e 74.402 mortes por *Shigella* spp. e 18.152 mortes por ETEC em adultos maiores de 70 anos (figura 3).

Figura 3: Taxa de mortalidade por diarreia por *Shigella* (A) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (B) por 100.000 pessoas em 2016 para todas as idades.



Fonte: Khalil et al., 2018.

O estudo de Lozer *et al.* (2013) determinou a prevalência de diferentes categorias de *E. coli* em crianças sintomáticas e assintomáticas de comunidades rurais de baixo nível socioeconômico no sudoeste do Brasil. No total, foram utilizadas 560 amostras de fezes, sendo 141 de crianças com diarreia e 419 controles aparentemente saudáveis que residiam em 23 comunidades quilombolas, e os resultados mostraram que as cepas de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) foram isoladas de 253 (45,2%) crianças e foram associadas à diarreia em crianças com idade menor do que 5 anos. EAEC (20,9%), DAEC (11,6%), EPEC (9,3%) foram os patótipos mais frequentes, seguidos por ETEC (2,7%), EIEC (0,5%) e STEC (0,2%). Dessa forma, concluíram que a *E. coli* enteroaderente (coletivo de isolados de EPEC, EAEC e DAEC) é uma causa importante de diarreia em crianças que vivem em comunidades de baixo nível socioeconômico nessa região.

Em Mulu *et al.* (2024) amostras de 107 crianças diarreiogênicas foram coletadas e processadas para *Escherichia coli* e usaram PCR simplex para detectar genes de virulência alvo, bem como caracterizar e categorizar os patótipos de DEC. A partir disso, os resultados revelaram seis patótipos de virulência: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (53,8%), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (12,8%), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (10,3%), heteropatótipos (7,8%), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (7,7% cada), destacando dessa forma, o potencial papel da *E. coli* patogênica na diarreia infantil em ambientes tropicais de poucos recursos e ressaltam a necessidade de pesquisas contínuas sobre as características dessas cepas.

1.4.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é a principal causa de doenças diarreicas e surtos, caracterizada pela primeira vez no Reino Unido em 1945, com alta taxa de morbidade e mortalidade em crianças menores de seis meses de idade. A taxa de EPEC em países desenvolvidos diminuiu nas últimas décadas. No entanto, é uma das principais preocupações de saúde pública para adultos em países em desenvolvimento (Pakbin; Bruck; Rossen, 2021).

A EPEC pertence a uma família de organismos, conhecidos como patógenos de fixação e apagamento (A/E) que se fixam intimamente às células epiteliais intestinais e apagam as microvilosidades da borda em escova (Roxas *et al.*, 2022).

No estudo de Eybpoosh *et al.* (2021) foram utilizadas amostras de fezes coletadas de 1.306 casos de diarreia aguda de 15 províncias do Irã entre janeiro de 2013 a janeiro de

2014. Foi observado que 979 (75%) amostras de diarreia foram positivas para cultura de *E. coli* e 659 (50,5%) foram de *E. coli* patogênica. A EPEC foi o terceiro patótipo mais frequente, com 13,1% de prevalência.

1.4.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

De acordo com os relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS), a ETEC causa anualmente mais de 157.000 casos de diarreia humana que levam à morte. O patótipo ETEC de *E. coli* que libera enterotoxinas no intestino delgado humano é a principal causa de diarreia de viajantes e crianças em países em desenvolvimento. As maiores taxas de infecção e mortalidade de ETEC são encontradas em crianças menores de dois anos (Pakbin; Bruck; Rossen, 2021).

A *E. coli* enterotoxigênica primeiro adere às células epiteliais do intestino delgado por meio de estruturas de superfície e então secreta enterotoxinas. A ETEC se liga com células epiteliais do intestino delgado por conta de vários genes de fator de colonização codificados por plasmídeo que codificam estruturas fimbriais, não fimbriais e fibrilares (Pakbin; Bruck; Rossen, 2021). Essa ligação ao epitélio intestinal impede que estas bactérias sejam eliminadas completamente e permite a colonização do intestino.

A infecção por ETEC é causada pela ingestão de alimentos e água contaminados em países em desenvolvimento, onde falta infraestrutura para fornecer água potável limpa e descarte adequado de excrementos. Esse patótipo é caracterizado pela capacidade de produzir enterotoxinas termolábeis (LT) e/ou termoestáveis (ST). A enterotoxina LT possui alto peso molecular (84 kDa) e a ST é um peptídeo de baixo peso molecular que consiste em 18 a 19 resíduos de aminoácidos (Zhang *et al.*, 2022).

Em Pajuelo *et al.* (2024) foi feita uma análise da epidemiologia da ETEC e o impacto no crescimento de crianças nos primeiros dois anos de vida no Peru. Resultados mostraram que cerca de 70% das crianças sofreram de um ou mais episódios de diarreia por ETEC e que, no geral, a taxa de incidência foi de 73 por 100 crianças por ano. As infecções começavam logo após o nascimento, causando 10% da carga diarreica atribuível a ETEC no nível populacional em neonatos, e a maioria das infecções (58%) foi atribuída a ST-ETEC (toxina termoestável) e 29% a LT (toxina termolábil) + ST-ETEC, dos quais todos os episódios foram associados à diarreia. Além disso, as infecções por ETEC aumentaram com a idade, atingindo o pico de 17% entre 21 meses e 24 meses. A ST-ETEC foi o tipo mais prevalente com infecções seriadas frequentes em uma criança.

1.4.3 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Diarreia grave com sangue e muco, cólicas abdominais e febre são características clínicas típicas de disenteria bacilar ou shigelose causada por diferentes espécies de *Shigella* e EIEC como patógenos invasivos transmitidos por alimentos. A EIEC difere de outros patógenos de *E. coli* porque é um patógeno intracelular obrigatório sem fatores de adesão ou flagelo. As cepas de EIEC provocam principalmente diarreia aquosa e causam colite inflamatória invasiva (Pakbin; Bruck; Rossen, 2021).

A EIEC foi identificada como uma cepa invasiva causadora de disenteria. Foi relatada endemicamente em países em desenvolvimento, sendo responsável por uma frequência de 1-5% dos episódios de diarreia na população. Seu mecanismo de patogenicidade envolve a produção de enterotoxinas e citotoxinas aderentes à mucosa, seguidas pela colonização e invasão de células, levando posteriormente à sua destruição e desencadeando um processo inflamatório, o que resulta na diarreia aquosa acompanhada pela presença de muco e/ou sangue (Garber *et al.*, 2024).

Embora menos comum do que a diarreia por ETEC, surtos de diarreia causados por EIEC foram relatados em diferentes regiões do mundo. Exemplos recentes incluem aqueles associados à legumes mal higienizados (como alface, por exemplo), contaminação e ambientes como jardim de infância e cantinas (Riley, 2020).

1.4.4 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

EHEC causa diarreia, colite hemorrágica (HC) com diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítico-urêmica (SHU) em humanos e está associada em vários surtos de origem alimentar em países desenvolvidos. Estas são transmitidos principalmente aos humanos, por meio de alimentos e água contaminados. Foi isolado pela primeira vez de um paciente com diarreia sanguinolenta e distúrbio gastrointestinal em 1982 e levou a uma pandemia mundial (Pakbin; Bruck; Rossen, 2021).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimou que o patótipo, transmitido por alimentos, é responsável por mais de 63.000 doenças por ano, levando a mais de 2.100 hospitalizações e mortes nos Estados Unidos. Na Noruega, a SHU foi classificada como a segunda causa mais comum de infecção renal aguda (IRA) em crianças, com uma incidência média anual estimada de 0,5 casos por 100.000 crianças (Rawish; Muhammad, 2023).

A toxina semelhante a Shiga (SLT), também denominada verotoxina e codificada pelos genes *stx*, é o principal fator de virulência nos sorotipos de EHEC que pertence ao grupo de *E. coli* produtora de toxina Shiga e é responsável por manifestações patológicas que levam a sintomas específicos da doença causados durante infecções por EHEC, como SHU e insuficiência renal (Pakbin; Bruck; Rossen, 2021).

Heo *et al.* (2023) relataram o maior surto de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) em uma pré-escola na Coreia do Sul de 12 a 29 de junho de 2020. A investigação epidemiológica foi realizada em 184 crianças e 19 trabalhadores da pré-escola, usando um questionário para avaliar sintomas, ingestão alimentar, frequência e histórico de atividades especiais. Nesse estudo, 103 crianças foram afetadas, enquanto apenas uma infecção foi identificada em adultos. Dos 103 pacientes pediátricos, 85 apresentaram sintomas (82,5%), incluindo diarreia, dor abdominal, fezes com sangue, febre e vômitos. Dessa forma, trinta e dois pacientes (31,1%) foram hospitalizados, 15 (14,6%) foram diagnosticados com síndrome hemolítico-urêmica e 4 (3,9%) receberam tratamento de diálise.

1.4.5 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

A EAEC tem sido considerada um patógeno emergente transmitido por alimentos, principalmente associado à diarreia infantil persistente e aguda e retardo do crescimento em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Além disso, a EAEC é a segunda principal causa da diarreia aguda e persistente do viajante, depois da ETEC, e uma das principais causas de infecções entéricas em pacientes com HIV/AIDS (Pakbin; Bruck; Rossen, 2021).

A patogênese da EAEC envolve três estágios: adesão às células epiteliais da mucosa, produção de toxinas e indução de resposta inflamatória da mucosa intestinal. Essa bactéria adere às células epiteliais intestinais em um padrão semelhante a tijolos empilhados uns sobre os outros. Seu padrão de adesão depende de organelas chamadas de fimbrias de adesão agregativa (AAF) (Vega *et al.*, 2023).

Haugan *et al.* (2024) identificaram EAEC em 440 de 9.487 (4,6%) pacientes com diarreia e 8 de 375 (2,2%) controles saudáveis. A prevalência de EAEC foi de 19,1% entre aqueles com diarreia e viagens recentes ao exterior e 2,2% naqueles sem histórico de viagens independente de diarreia. Dessa forma, foi concluído que a EAEC foi uma detecção comum, particularmente em pacientes com diarreia e viagens internacionais recentes, e foi encontrada junto com outros patógenos intestinais, na maioria dos casos.

1.4.6 *Escherichia coli* aderente difusa (DAEC)

A DAEC está associada à diarreia em crianças entre 1,5 e 5 anos, infecção do trato urinário (ITU) em adultos, complicações na gravidez e parte da microflora comensal intestinal em adultos e crianças (Pabkin; Bruck; Rossen, 2021). As metodologias para detecção do DAEC não são bem definidas por conta de as cepas serem heterogêneas e as características moleculares específicas do DAEC não foram estabelecidas ainda. A DAEC foi definida pela primeira vez por seu padrão distinto de adesão difusa às células em cultura (Jesser; Levy, 2020).

Dois fatores de adesão putativos foram descritos para cepas de *E. coli* difusamente aderentes (DAEC) (Lopes *et al.*, 2005). Bilge *et al.* (1989) caracterizaram fímbrias de superfície (designadas F1845) que são responsáveis pelo fenótipo DA em uma cepa protótipo, C1845. O cluster de genes que codifica essas fímbrias pode ser encontrado no cromossomo bacteriano ou em um plasmídeo.

1.5 Fatores de virulência bacteriana

Fatores de virulência são moléculas específicas, principalmente proteínas produzidas e liberadas por bactérias, fungos, protozoários e vírus (figura 4). Esses fatores são codificados por genes específicos localizados no cromossomo ou elementos genéticos móveis em patógenos bacterianos. Cada patótipo de *E. coli*, por exemplo, tem seus mecanismos de patogenicidade característicos e um perfil específico de fatores de virulência codificados por grupos de genes específicos (Pabkin; Bruck; Rossen, 2021).

Genes associados à patogenicidade podem codificar atividades como adesão, invasão, fixação, aquisição de ferro, motilidade e atividade de toxinas, entre outras. É possível distinguir quatro classes principais de virulência de *E. coli*: colonização, aptidão, toxinas e efetores, onde cada uma consiste em vários fatores de virulência específicos com uma função e atividade definidas (Pabkin; Bruck; Rossen, 2021).

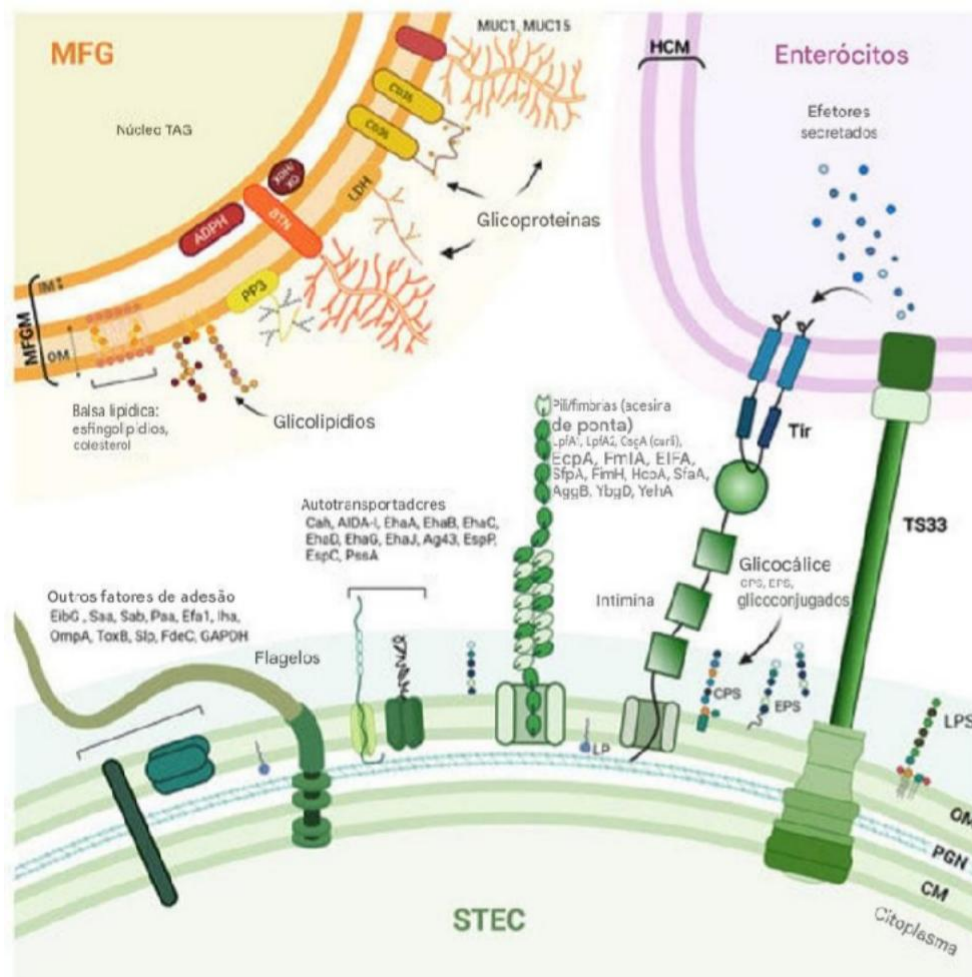
A adesão é uma característica importante dos patógenos bacterianos que permite que os micróbios colonizem hospedeiros, induzam respostas celulares e manipulem a sinalização do hospedeiro. Para aderir às células, as bactérias usam uma variedade de fatores, desde pili, fímbria, flagelos e outras adesinas (Stromberg *et al.*, 2023). O termo “pilus” deve ser reservado para a transferência de material genético e o termo fímbria para estruturas relacionadas com a adesão de bactérias a várias superfícies (HOBOT,

2015). Além disso, os pili conjugativos são mais longos que fímbrias e são compostos principalmente por uma proteína chamada pilina.

Vários patógenos bacterianos usam toxinas proteicas para interromper a sinalização, degradar bioquímicos e danificar o tecido do hospedeiro para estabelecer a infecção. As toxinas não são simplesmente ferramentas destrutivas, mas podem contribuir para a sobrevivência e fuga de eucariotos unicelulares ambientais (Stromberg *et al.*, 2023).

A importância das investigações sobre os fatores de virulência se dá pelo fato de que os genes codificadores associados fornecem informações sobre a interação patógeno-hospedeiro a nível molecular, com indicativos sobre como o patógeno leva o desenvolvimento da doença (Kaper; Nataro; Mobley, 2004). Sendo assim, dentre os vários fatores de virulência presentes na estrutura bacteriana distinta de *Shigella* e ETEC, encontram-se os antígenos Fim-H e OMPs, respectivamente.

Figura 4: Desenho esquemático dos fatores de adesão de STEC e do MFGM bovino. CM: membrana citoplasmática; PGN: peptidoglicano; OM: membrana externa; LPS: lipopolissacarídeo; LP: lipoproteína; Tir: Receptor de intimina translocado; T3SS: sistema de secreção tipo 3; CMH: Membrana citoplasmática do hospedeiro; CPS: Polissacarídeo capsular; EPS: Polissacarídeo extracelular; LpfA: subunidade A da fímbria polar longa; CsgA: subunidade curlin principal; EcpA: subunidade A do pilus comum de *E. coli*; FmlA: subunidade A da fímbria tipo 1; ElfA: subunidade A da fímbria de ligação à laminina; SfpA: subunidade A da fímbria fermentadora de sorbitol; FimH: adesina específica de fímbria D-manose tipo 1; HcpA: subunidade A da coli pilus hemorrágica; SfaA: subunidade A da fímbria S; AggB: Fímbria de adesão agregativa I subunidade B; YbgD: suposta subunidade A da fímbria Ybg; YehA: Fímbria suposta subunidade Yeh A; Cah: homólogo do antígeno 43 de ligação ao cálcio; AIDA-I: adesina envolvida na adesão difusa; Eha: autotransportador enterohemorrágico de *E. coli*; Ag43: antígeno 43; EspP: plasmídeo de serina protease extracelular codificado; EspC: proteína C secretada por EPEC; PssA: protease secretada por STEC; EibG: proteína G de ligação à imunoglobulina de *E. coli*; Saa: autotransportador de adesão autoaglutinante de STEC; Sab: autotransportador de STEC que contribui para a formação de biofilme; Paa: proteína associada a A/E suína; Efa1: fator EHEC para adesão; Iha: adesina homóloga de IrgA; OmpA: proteína A da membrana externa; ToxB: toxina B; Slp: lipoproteína induzível por falta de carbono; FdeC: fator de adesão de *E. coli*; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. MUC1/MUC15: Mucina 1/15; LDH: Lactaderina; ADPH: Adipofilina; BTN: Butirofilina; XDH/XO: Xantina desidrogenase/oxidase; CD36: Cluster de diferenciação 36; PP3: Proteose peptona 3; TAG: triacilgliceróis.



Fonte: Bagel et al., 2022.

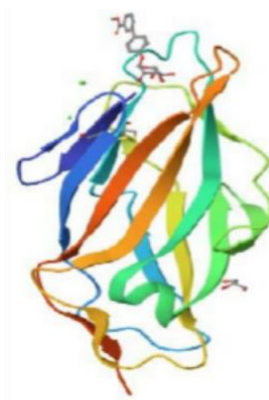
1.5.5 Fim-H

Fim-H está localizado na ponta da fímbria tipo I de *E. coli* e é usado pela bactéria para aderir às células suas hospedeiras. Pesquisas extensivas realizadas em modelos de cistite murina evidenciaram que pili tipo 1 e adesão mediada por Fim-H são essenciais para invasão bacteriana (Krammer *et al.*, 2018). Os pilis do tipo 1 são compostos por quatro subunidades proteicas diferentes (FimH, FimG, FimF e FimA), mantendo uma interação não covalente para formar a fibra do pilus (Van Eyssen *et al.*, 2023).

A adesina de dois domínios situada na ponta distal do pilus tem a capacidade de se ligar a frações de manose com especificidade estereoquímica. Ela tem um domínio de pilina interagindo com o resto do pilus tipo 1 e um domínio de lectina que medeia a ligação do tecido hospedeiro (Van Eyssen *et al.*, 2023).

Fim-H reconhece as manoses nas glicoproteínas epiteliais do hospedeiro (figura 5) (Bravo *et al.*, 2015), e por mediar a aderência das bactérias gram-negativas nas membranas de mucosas, possui um papel importante no estabelecimento da infecção por *Shigella* (Sauer *et al.*, 2016).

Figura 5: Estrutura cristalina do domínio da lectina FimH ligado ao éster meta-metílico do bifênol manosídeo. A adesão celular mediada por FimH a proteínas manosiladas é crítica na capacidade da *E. coli* uropatogênica (UPEC) de colonizar e invadir o epitélio da bexiga durante a infecção do trato urinário.



Fonte: Han et al., 2010.

1.5.6 OMPs

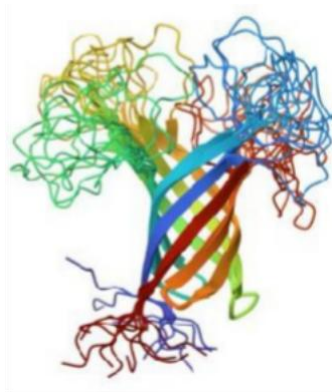
As porinas ou proteínas de membrana externa (OMPs) são categorizadas em pequenas âncoras de membrana de barril β (OmpA, OmpX), porinas gerais não específicas (OmpF, OmpC), porinas específicas de substrato (PhoE, LamB) e receptores dependentes de TonB (FhuA, FepA) (MISHRA *et al.*, 2020). As OMPs são expostas ao exterior da célula bacteriana e são a primeira linha de contato entre bactérias e seu ambiente. Dada sua localização, elas desempenham um papel crítico em diversos processos celulares, como absorção de nutrientes, sinalização celular, exportação de resíduos, patogenicidade e evasão das defesas do hospedeiro (Saitz *et al.*, 2022).

Algumas OMPs servem como adesinas, ou seja, permitem que as bactérias se juntem as células, também desempenham papel importante na virulência, além de serem extremamente imunogênicas e, portanto, as tornam candidatas eficazes para o desenvolvimento de vacinas e diagnósticos devido aos seus epítomos expostos na superfície celular (Prakash *et al.*, 2020).

1.5.7 OmpA

OmpA é uma proteína de membrana externa altamente abundante e conservada em bactérias gram-negativas. Ela tem uma estrutura em forma de barril que confere atividade de porina (figura 6). Além de sua função no influxo e efluxo de vários compostos, OmpA é uma proteína multifacetada com várias outras funções (Scheller *et al.*, 2021).

Figura 6: Estrutura da solução de alta resolução do domínio transmembrana da proteína A da membrana externa.



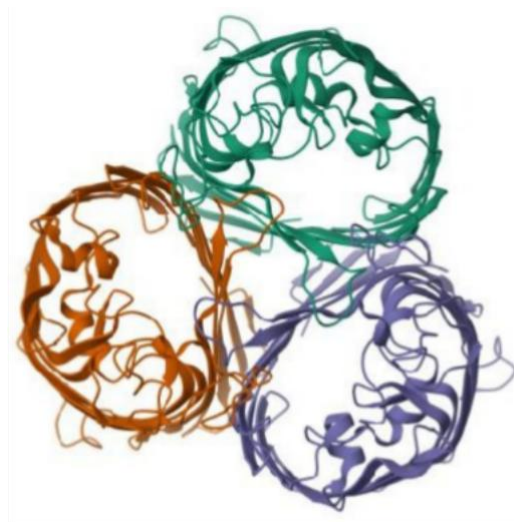
Fonte: Cierpicki et al., 2006.

É importante salientar que o OmpA é um fator de virulência conhecido em vários patógenos bacterianos que demonstram influenciar processos associados à virulência, como fixação, formação de biofilme, modulação imunológica, invasão, replicação e disseminação entre células eucarióticas (Murphy *et al.*, 2020).

1.5.8 OmpC

A OmpC é composta por barris β de 16 fitas com aminoácidos carregados negativamente que contribuem para a formação do orifício da porina e promovem suas propriedades de exclusão de tamanho e permeabilidade. OmpC facilita tanto a entrada quanto a resistência de antibióticos, como β -lactâmicos, bem como o movimento de substâncias hidrofílicas com baixo peso molecular sobre a membrana externa (figura 7) (Zhou *et al.*, 2023).

Figura 7: Osmoporina OmpC de *E. coli* K12.



Fonte: Su et al., 2021.

1.6 Tratamento de doenças diarreio gênicas

O controle eficiente para as doenças diarreicas requer conhecimento das etiologias mais importantes da diarreia em populações e áreas geográficas específicas, porém, os dados sobre a incidência de etiologias diarreicas na população em geral em países de baixa e média renda são escassos devido à falta de vigilância (Thystrup *et al.*, 2024).

Muitas intervenções estão disponíveis para conter doenças diarreicas e todas elas podem contribuir para a prevenção global delas. Entre as intervenções estão presentes as vacinas, amamentação precoce e exclusiva, suplementos de vitaminas, promoção da lavagem das mãos com sabão, melhoria da quantidade e qualidade da água, saneamento básico, reposição de fluidos e entre elas, a utilização de medicamentos como antibióticos (Meki *et al.*, 2022).

Entretanto, o uso indevido de antibióticos aumenta os custos de terapia, reações adversas aos medicamentos e a mortalidade dos pacientes. O uso inapropriado desse medicamento é definido como o uso de antibióticos de uma forma que minimiza os efeitos terapêuticos e ao mesmo tempo, aumenta a toxicidade e o desenvolvimento de resistência (Beyene Dereje et al., 2023).

Com isso, a resistência antimicrobiana (RAM) se torna uma ameaça crescente à saúde global e foi associada a 4,95 milhões de mortes em 2019 globalmente, mais do que HIV e malária juntos. A RAM compromete muitos aspectos da medicina moderna pois, além

das doenças infecciosas bacterianas, também pode afetar cirurgias, transplantes de órgão e tratamento de doenças e enfermidades (Frost *et al.*, 2023).

A maioria das infecções por *Shigella*, por exemplo, são autolimitadas, mas em casos graves podem ser fatais se não forem tratadas. O uso de antimicrobianos é a estratégia de rotina para limitar a infecção, aumentar a recuperação e reduzir a transmissão. Contudo, a espécie *S. sonnei*, por exemplo, se tornou resistente a esses antimicrobianos (Shad; Shad, 2020).

No estudo de Odundo *et al.* (2024) foram avaliados os padrões de resistência à azitromicina em *Escherichia coli* e *Shigella* antes e depois da COVID-19, no Quênia, e durante 4,5 anos, 2.7590 amostras fecais foram coletadas e testadas para ambas. Os resultados mostraram que foi identificado 116 isolados de *E. coli* no total, 64,7% de crianças, sendo 58,7% pré e 41,3% pós-COVID-19. Em adultos, foram identificados 46,3%, sendo 46,3% pré e 53,7% pós-COVID-19. Além do mais, também foram identificados 109 isolados de *Shigella spp.* no total, 52,3% de adultos, sendo 54,4% pré e 45,6% pós-COVID-19. Em crianças, foi identificado 47,7%, sendo 73,1% pré e 26,9% pós-COVID-19. A resistência à azitromicina aumentou significativamente de antes para depois da COVID-19, de 6,3% para 40,4%.

As vacinas também podem ser ferramentas altamente eficazes no combate à RAM e foram destacadas pela OMS. As vacinas que possuem como alvo patógenos bacterianos, reduzem infecções causadas por patógenos resistentes ou suscetíveis a antibióticos e contribuem para a proteção de populações não vacinadas se níveis suficientes de imunidade forem mantidos (FROST *et al.*, 2023). Com isso, a produção de vacinas pode reduzir o uso de antibióticos e, consequentemente, ajudar a diminuir o surgimento de patógenos entéricos resistentes a antimicrobianos (Hausdorff *et al.*, 2023).

No entanto, a imunização passiva usando IgY também é uma abordagem alternativa promissora para combater o surgimento de novos e atuais patógenos resistentes a medicamentos, já que os anticorpos IgY apresentam atividades contra alguns patógenos, mostrando seu desempenho na prevenção imunoterapêutica e no tratamento de patógenos com resistência antimicrobiana (El-Kafrawy *et al.*, 2023).

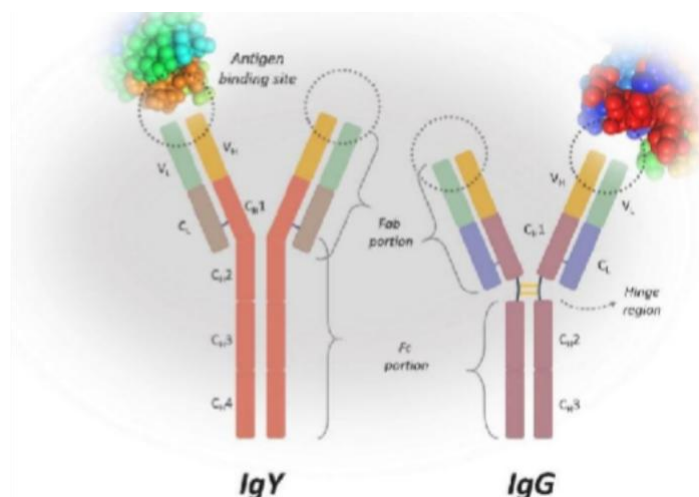
1.7 Tecnologia IgY

O termo “tecnologia IgY” foi introduzido na década de 1990, usado para descrever um procedimento que consiste na imunização de aves, especialmente galinhas poedeiras, a fim de produzir anticorpos policlonais da classe Y (IgYs). As

imunoglobulinas Y podem ser isoladas em grandes quantidades da gema de ovo “imune” e têm sido aplicadas a vários campos da biotecnologia e biomedicina (Karachaliou; Vassilakopoulou; Livaniou, 2021).

A função da molécula IgY é análoga a da IgG de mamíferos. No entanto, embora ambas as imunoglobulinas contenham dois braços Fab que incluem domínios variáveis da cadeia leve e os dois primeiros domínios constantes da cadeia pesada, suas estruturas mostram algumas diferenças. Ao contrário da IgG, que tem três domínios constantes na cadeia pesada, a IgY contém quatro domínios constantes de cadeia pesada (figura 8) (Silva *et al.*, 2021).

Figura 8: Representação esquemática IgY de galinha e IgG de mamífero: moléculas de anticorpos contendo duas cadeias pesadas e duas leves conectadas por ligações dissulfato. O domínio de anticorpos de fragmento (Fab) se liga a epítomos antigênicos. O domínio cristalizável de fragmento (Fc) interage com a superfície das células e tem funções efetoras biológicas.



Fonte: Silva e Villar, 2021.

As cadeias leves e pesadas da IgY têm massa molecular aparente de 25 kDa e 70 kDa e juntas formam uma estrutura tridimensional de aproximadamente 180 kDa. Esta estrutura é sistematicamente dividida em duas porções, uma porção Fab, responsável pela ligação antígeno-anticorpo, e uma porção Fc (região cristalizável), que corresponde à cauda da molécula que interage com os receptores Fc da superfície celular e ativa o sistema imunológico. Diferentemente das IgGs, na ligação entre porções Fab e Fc, há ausência da região de dobradiça, o que torna as IgYs menos flexíveis, mas não afeta a especificidade da molécula (Silva *et al.*, 2021).

O uso da tecnologia IgY também apresenta a vantagem de que as galinhas são capazes de produzir entre 100 e 150 mg de anticorpos IgY por gema, dos quais entre 1

e 10% da quantidade total de anticorpos são específicos, uma quantidade maior em comparação a outros animais, como roedores, por exemplo, reduzindo consideravelmente o número de animais necessários para a produção de anticorpos (Pereira *et al.*, 2019).

1.7.1 Tecnologia IgY como imunoterapia

A produção, extração e uso de anticorpos IgY específicos da gema do ovo, é um método inovador para produzir anticorpos para imunoterapia passiva e profilaxia. Klemperer (1893) descobriu que as gemas extraídas de ovos coletados após a imunização de galinhas com toxina tetânica poderiam proteger com sucesso camundongos após um desafio letal com a toxina, evidenciando a presença de anticorpos no sangue e nos ovos (Leiva *et al.*, 2020).

Em decorrência disso, muitas pesquisas têm se concentrado no uso de IgY para aplicações de imunização passiva, e tornou-se uma abordagem ainda mais atraente devido ao surgimento de microrganismos novos resistentes a medicamentos, doenças que não respondem à terapia medicamentosa e indivíduos com sistemas imunológicos debilitados, que possuem restrições às vacinas convencionais. Além disso, anticorpos que são administrados passivamente têm a capacidade de fornecer proteção rápida e imediata (Kovacs-Nolan; Mine, 2012).

Os anticorpos IgY podem ser utilizados como opção terapêutica, pois pode reduzir e prevenir a colonização bacteriana. IgY específicos contra a enterotoxina *Escherichia coli* foi proposta como um elemento de suplementação de alimentos, pois resiste à pasteurização sem afetar sua atividade de neutralização, mantendo a capacidade de inibir *in vitro* o crescimento de *E. coli* (León-Núñez *et al.*, 2022). Embora o uso de IgY forneça apenas proteção temporária e a dosagem deva ser repetida quando os indivíduos estão em risco de exposição, ela é eficaz imediatamente, ao contrário de uma vacina, pois não requer 5 a 6 semanas para alcançar eficácia na proteção (Chen *et al.*, 2022).

No estudo de Han *et al.* (2021) foi investigado os efeitos da IgY no crescimento, inibição da adesão e morfologia da *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) K88 *in vitro*, e avaliou-se os efeitos protetores da IgY na saúde intestinal e resposta imune de camundongos infectados com ETEC *in vivo*. Resultados mostraram que O IgY anti-ETEC inibiu o crescimento de ETEC, reduziu a aderência de ETEC às células epiteliais intestinais e danificou a morfologia e integridade da célula da bactéria. A administração oral de IgY anti-ETEC melhorou efetivamente os sinais clínicos induzidos por ETEC,

reduziu a sua colonização e a permeabilidade intestinal, aliviou a resposta inflamatória por meio da redução da produção e expressão de citocinas pró-inflamatórias, melhorou a morfologia intestinal e inibiu a ativação excessiva da resposta imune da mucosa dos camundongos desafiados.

Em um estudo mais recente, Shoushtari *et al.* (2023) avaliaram a produção de IgY contra *Vibrio cholerae* como efeito protetor em camundongos. Os resultados mostraram que a taxa de sobrevivência de camundongos tratados com 2 mg/mL de IgY foi de 60% após 4 horas e 40% após 6 horas e a taxa de sobrevivência de camundongos tratados com 5 mg/mL de IgY foi de 70% após 4 horas e 60% após 6 horas, o que sugeriu que a IgY isolada da gema de ovo foi eficaz na prevenção e tratamento da cólera.

Quando administrada oralmente, a IgY, como uma substância à base de proteína, é altamente suscetível à degradação por proteases gástricas e pelo ambiente ácido do estômago, o que pode levar à perda de sua atividade biológica. Portanto, a aplicação da tecnologia de microencapsulação é essencial para preservar tal atividade e melhorar sua estabilidade (LU *et al.*, 2025). Estudos demonstraram que o alginato de sódio (SA) e a quitosana (CS) são biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos e exclusivamente sensíveis ao pH, e tem sido cada vez mais usados para encapsulamento e estabilização em sistemas de administração de medicamentos enterais (Jin *et al.*, 2023).

O estudo realizado por Jin *et al.* (2023) teve como objetivo investigar os efeitos das microcápsulas de alginato de sódio e quitosana no desempenho do crescimento, parâmetros séricos e saúde intestinal de frangos de corte. Dessa maneira, concluíram que a IgY encapsulada aumenta a eficiência da passagem de IgY pelo ambiente gastrointestinal em comparação à IgY não microencapsulada, o que tem um efeito positivo na melhoria da saúde intestinal e na modulação da resposta imune.

Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar o potencial da imunoglobulina aviária (IgY) como método de imunidade passiva, para a utilização em imunoterapia e imunoprevenção contra doenças diarreicas, principalmente as causadas pelas bactérias *Shigella* e *Escherichia coli*, e consequentemente analisar a produção de anticorpos contra esses organismos. Como as principais vantagens da realização deste estudo, temos a redução do número de animais necessários para obtenção dos anticorpos a serem utilizados para imunoterapia, devido ao alto rendimento obtido por meio da tecnologia IgY, bem como o baixo custo de produção destas moléculas.

1.8 Estudos prévios desenvolvidos pelo Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA-FIOCRUZ)

Estudos anteriores desenvolvidos por nossa equipe exploram a tecnologia IgY para o desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico e terapia de doenças infecciosas, como por exemplo, o conduzido por Clorives (2019), onde imunoglobulinas Y contra antígenos de *Shigella* spp. foram produzidas e avaliadas. Neste, foi utilizado o peptídeo P9 de *Shigella flexneri* para imunização de galiformes, que apresentou capacidade de induzir resposta imune significativa. O IgY anti-P9 foi capaz de reconhecer o antígeno-alvo na forma sintética, desnaturada e nativa de *Shigella*. O anticorpo obtido apresentou reatividade cruzada contra outras cepas de bactérias diarreio gênicas, mas demonstraram grande potencial para utilização em métodos de imunidade passiva contra *Shigella* spp.

Também desenvolvido por nossa equipe, no estudo de Glória (2022) foram desenvolvidos de insumos e métodos para diagnóstico de malária utilizando a tecnologia

IgY, onde as aves foram imunizadas utilizando peptídeos sintetizados com especificidade para *P. vivax* (PvLDH), *P. vivax* + *P. falciparum* (pLDH) e *P. falciparum* (PfGDH) acoplados a nanotubos de carbono (NTC) solubilizados. Os peptídeos descritos no trabalho apresentaram reatividade similares, e a avaliação do reconhecimento dos anticorpos direcionados à detecção de pLDH em amostras clínicas de pacientes demonstrou resultado promissor, sendo um desses capazes de detectar antígenos de *P. vivax* e *P. falciparum*, e outro especificamente para *P. falciparum*, mostrando que essa tecnologia utilizando IgY é um método viável para a produção de ferramentas de diagnóstico, por conta de suas vantagens éticas e econômicas.

Além disso, em um estudo mais recente, em Clorives (2024) é abordado sobre novas ferramentas e imunoensaios para detecção de *Escherichia coli* diarreio gênicas e *Shigella flexneri*, que buscou desenvolver e avaliar anticorpos IgY direcionados contra os antígenos FimH dessas bactérias e EtpA de *E. coli* ETEC, avaliando-os por diferentes imunoensaios, um inclusive utilizando esferas magnéticas e “quantum dots”. A análise de resposta imune humoral IgY produzidas pelas galinhas imunizadas revelaram que o pool de peptídeos EtpA provocou uma produção maior e prolongada de anticorpo, quando comparada contra a resposta do antígeno FimH. Os anticorpos anti-FimH apresentaram reatividade pan-específica e a detecção de um maior número de bactérias foi obtida nos imunoensaios utilizando os anticorpos gerados conjugados a “quantum dots” e esferas magnéticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Avaliar o potencial *in vivo* de anticorpos IgY como método de imunidade passiva contra infecções causadas por *Shigella* ou *Escherichia coli*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter anticorpos IgY contra os antígenos alvo por meio de imunizações em galinhas;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de reconhecimento dos anticorpos IgY frente às bactérias-alvo por meio de citometria de fluxo;
- Avaliar a atividade funcional *in vitro* dos anticorpos IgY por meio dos ensaios de difusão em ágar (antibiograma) e determinação de concentração inibitória mínima (CIM);
- Avaliar *in vivo* o potencial protetor dos anticorpos IgY em modelo murino experimental desafiado com *Shigella flexneri*.

3. CAPÍTULO I

Neste capítulo apresentamos um artigo de revisão que aborda as principais aplicações da tecnologia IgY nas áreas de diagnóstico e tratamento de doenças. O estudo reúne evidências da literatura científica recente, destacando o crescente interesse no emprego de anticorpos IgY para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e estratégias terapêuticas direcionadas a diferentes agentes infecciosos e condições patológicas. São discutidos os métodos de obtenção e produção desses anticorpos, bem como suas principais vantagens em relação aos anticorpos produzidos em mamíferos, incluindo elevada escalabilidade, menor custo de produção e aspectos éticos favoráveis.

Os trabalhos analisados foram organizados de acordo com suas aplicações diagnósticas e terapêuticas, enfatizando os resultados obtidos para diferentes patógenos e modelos experimentais. Entre as aplicações diagnósticas, destacam-se os diversos formatos de imunoenaios descritos na literatura, especialmente os testes do tipo ELISA. No âmbito terapêutico, são apresentados estudos que demonstram o potencial da IgY na prevenção e no tratamento de infecções causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas. O conjunto das evidências revisadas reforça o amplo potencial biotecnológico e comercial da tecnologia IgY, consolidando-a como uma alternativa promissora para aplicações em saúde humana e animal.

Informações sobre o artigo

Título do artigo: “Applications of IgY technology in diagnosis and treatment: A review”

Situação: Aceito para publicação

Revista: BioTechnology (ISSN: 0860-7796; Citescore: 5.0; Percentil: 77%)

Aplicações da tecnologia IgY no diagnóstico e tratamento: uma revisão.

Applications of IgY technology in diagnosis and treatment: A review

Letícia Coelho da Cruz ^{1*}, Juliane Corrêa Glória ^{3,5*}, Caio Coutinho de Souza ¹, Jehovanna Victoria Marín Salgado ⁶, Luis André Moraes Mariúba ^{1,2,3,4,5}

¹ Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC-UFAM), Manaus, AM, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Imunologia básica e aplicada, Universidade Federal do Amazonas (PPGIBA-UFAM), Manaus, AM, Brazil

³ Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ), Manaus, AM, Brazil

⁴ Programa de Pós-graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ), Manaus, AM, Brazil

⁵ INCT-CONEXÃO BIO3TOX- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Pesquisa e Excelência do Conhecimento da Amazônia Ocidental/Oriental em Biodiversidade, Biotecnologia, Biometeorologia e Toxicologia Aplicada à Uma saúde, Fiocruz Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

⁶ Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil

Corresponding author: Luis André Moraes Mariúba. Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ), Rua Teresina, 476, Adrianópolis, CEP 69057-070, Manaus, AM, Brazil.

Phone: +55 92 3621-2323. Email: andre.mariuba@fiocruz.br

*These authors contributed equally to this work.

RESUMO

A tecnologia IgY, derivada da gema de ovos de galinhas imunizadas, surgiu como uma alternativa promissora e versátil às imunoglobulinas de mamíferos para aplicações diagnósticas e terapêuticas. Ao contrário dos anticorpos IgG convencionais produzidos em mamíferos, a IgY pode ser obtida de forma não invasiva a partir de gemas de ovos, garantindo o bem-estar animal e possibilitando a produção em larga escala e com baixo custo. Além das vantagens éticas e econômicas, a IgY exibe alta especificidade antigênica, forte afinidade e reatividade cruzada reduzida com receptores Fc de

mamíferos, fatores reumatóides e componentes do complemento, o que minimiza a interferência de fundo em imunoenaios. Essas propriedades tornam a IgY particularmente atraente para uso em plataformas de imunodiagnóstico, como ELISA, ensaios imunocromatográficos e sistemas de detecção baseados em biossensores. Esta revisão destaca os avanços recentes na tecnologia IgY, com ênfase em estratégias de imunização, metodologias de extração e purificação e otimização da estabilidade e atividade do anticorpo. Além disso, o potencial terapêutico da IgY é discutido, incluindo seu papel na neutralização de patógenos, inibição da adesão microbiana, modulação da microbiota intestinal e aplicações tópicas para infecções de mucosas e pele. Em conjunto, essas descobertas reforçam a IgY como uma ferramenta robusta e inovadora para pesquisa translacional, diagnósticos clínicos e estratégias alternativas de imunoterapia.

Palavras-chave: Tecnologia IgY; diagnóstico; tratamento; detecção de antígenos; anticorpos policlonais.

ABSTRACT

IgY technology, derived from the egg yolk of immunized hens, has emerged as a promising and versatile alternative to mammalian immunoglobulins for both diagnostic and therapeutic applications. Unlike conventional IgG antibodies produced in mammals, IgY can be obtained non-invasively from egg yolks, ensuring animal welfare and enabling large-scale, cost-effective production. In addition to ethical and economic advantages, IgY exhibits high antigen specificity, strong affinity, and reduced cross-reactivity with mammalian Fc receptors, rheumatoid factors, and complement components, which minimizes background interference in immunoassays. These properties make IgY particularly attractive for use in immunodiagnostic platforms such as ELISA, immunochromatographic assays, and biosensor-based detection systems. This review highlights recent advances in IgY technology, emphasizing immunization strategies, extraction and purification methodologies, and optimization of antibody stability and activity. Moreover, the therapeutic potential of IgY is discussed, including its role in pathogen neutralization, inhibition of microbial adhesion, modulation of the intestinal microbiota, and topical applications for mucosal and skin infections. Collectively, these findings reinforce IgY as a robust and innovative tool for translational research, clinical diagnostics, and alternative immunotherapy strategies.

Keywords: IgY technology, diagnosis, treatment, antigen detection, polyclonal antibodies.

1. INTRODUÇÃO

A emergência de saúde pública causada pelo novo coronavírus destacou a importância de contar com ferramentas para diagnósticos rápidos e precisos, capazes de atender à imensa demanda global por testes, bem como tratamentos eficazes. Nesse contexto, a tecnologia de anticorpos IgY surge como uma opção promissora para atender a essas necessidades, representando um método versátil para obtenção de insumos biológicos que ganhou considerável atenção nas últimas décadas.

Os anticorpos IgY são uma das classes de imunoglobulinas encontradas em aves, répteis e peixes pulmados, análogos à imunoglobulina G (IgG) de mamíferos, e são transferidos da corrente sanguínea para a gema em desenvolvimento por meio de receptores específicos, onde são armazenados e funcionam para proteger o embrião; sua produção foi descrita em diferentes modelos animais (Haese et al., 2015; Najdi et al., 2016; Pacheco et al., 2023). Na década de 1980, Klemperer foi o primeiro a relatar que os anticorpos IgY em aves são transferidos do soro para a gema do ovo (Zhang, Vieira-Pires e Xu, 2021). Atualmente, há uma tendência crescente no número de publicações, citações e instituições de pesquisa de diferentes países que trabalham com tecnologia IgY, especialmente nos últimos 10 anos. Esse cenário levou a uma maior maturidade tecnológica para a comercialização (Wu; Yakhkeshi; Zhang, 2022), demonstrando um valor de mercado de aproximadamente US\$ 2 bilhões por ano (Conroy et al., 2017).

Embora a imunoglobulina Y (IgY) compartilhe algumas características com a imunoglobulina G (IgG), a distância filogenética entre aves e mamíferos torna o uso da IgY vantajoso para o diagnóstico e tratamento de doenças medicamente importantes, pois reduz a probabilidade de falsos positivos e outras interferências nos ensaios (Sivaprasad et al., 2020). Oferece várias vantagens em relação à IgG em mamíferos, incluindo redução da imunogenicidade, maior especificidade, menos efeitos colaterais e facilidade de produção e purificação em larga escala (Ge; Dias; Zhang, 2024). Além disso, a IgY é altamente estável, pois pode ser armazenada a 4 °C por aproximadamente dez anos sem perda significativa de atividade biológica, e pode ser mantida em temperatura ambiente por seis meses ou a 37 °C por um mês (Abbas et al., 2019). Essas características são altamente vantajosas para indústrias com alta produção, pois reduzem os custos associados a instalações de armazenamento frigorífico e proporcionam maior estabilidade para a aplicação de testes diagnósticos baseados em IgY e imunoterapia em áreas remotas.

Apesar dessas características, os anticorpos IgG em mamíferos continuam sendo as moléculas mais amplamente utilizadas para a detecção de doenças humanas. No entanto, seu uso apresenta várias desvantagens, principalmente relacionadas às baixas concentrações de anticorpos específicos gerados pela imunização de mamíferos — frequentemente exigindo o uso de múltiplos animais para obter rendimentos adequados — bem como preocupações éticas associadas à experimentação animal, incluindo procedimentos invasivos como sangramentos repetidos e, em alguns casos, eutanásia (Michelchen; Micheel; Hanack, 2020). O método utilizado para obter anticorpos IgY oferece uma alternativa eficiente e eticamente favorável, reduzindo o número de animais necessários e proporcionando uma abordagem não invasiva e mais econômica em comparação com a produção convencional de anticorpos em mamíferos (Schade; Hlinak, 1996).

Dadas as vantagens da IgY sobre a IgG em mamíferos, o uso dessas biomoléculas se expandiu nos campos veterinário, biomédico e biotecnológico, onde são aplicadas como ferramentas para imunoterapia e imunodiagnóstico para uma ampla gama de doenças infecciosas (Hridya et al., 2025; Thirumalai et al., 2019). Portanto, o principal objetivo desta revisão é relatar avanços da última década em imunoenaios e imunoterapias utilizando anticorpos policlonais IgY. Diferentes abordagens são descritas e seu desempenho também é discutido.

2. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS IgY

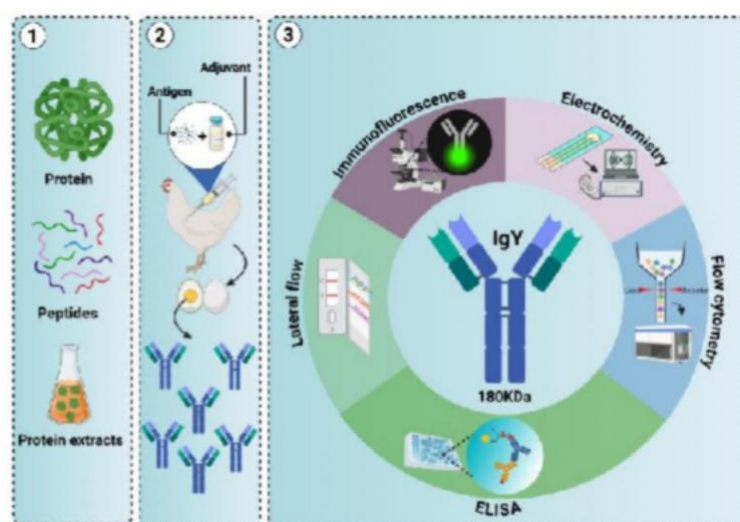
A tecnologia IgY baseia-se na imunização de aves com um antígeno-alvo (proteínas, extratos de proteína ou peptídeos) para obter anticorpos IgY, que são posteriormente extraídos da gema do ovo (Li et al., 2015; Schade et al., 2005; Sudjarwo; Indriyani; Sudjarwo, 2014). Atualmente, várias abordagens são usadas para a extração e purificação de IgY da gema de ovo, permitindo a precipitação de anticorpos usando solventes, sulfatos, polímeros e ajuste de pH, entre outras abordagens. Após a extração, a IgY pode ser purificada usando cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão de tamanho, filtração em gel e outros métodos (Amro; Al-Qaisi; Al-Razem, 2018; Bizanov, 2017; Pauly et al., 2011; Tong et al., 2015).

Bizanov (2017) analisou cinco técnicas de purificação IgY baseadas no uso de diluição de água sob condições ácidas, meios ácidos, combinações de solventes, uso de polietilenoglicol a 3,5% e aplicação de gomas naturais (polissacarídeos polianiónicos). O autor relatou que a diluição da água combinada com métodos cromatográficos e de

filtração parece proporcionar as melhores recuperações de IgY e pode ser facilmente aplicada na indústria (Bizanov, 2017).

Por ano, uma galinha pode botar aproximadamente de 300 a 325 ovos, o que corresponde a cerca de 17 a 35 g de IgY por galinha por ano. No entanto, o custo da IgY por grama (g) ou miligrama (mg) produzido é atribuído a vários fatores, como manejo (alojamento, alimentação), extração e purificação de anticorpos, pesquisa e desenvolvimento e escala de produção (Tabll et al., 2024). Amro et al. (2018) relataram que a seleção da raça de galinha é importante para obter altos rendimentos de IgY, pois observaram mais do que o dobro da quantidade de anticorpos ao usar galinhas Rhode Island Red em comparação com ovos de Leghorn Branco de Pente Único. No geral, a tecnologia IgY demonstra versatilidade em aplicações biotecnológicas, e o processo pelo qual anticorpos específicos são obtidos para aplicações diagnósticas é descrito na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática da tecnologia IgY.



3. APLICAÇÕES DA IMUNOGLOBULINA IgY

Nas últimas décadas, o número de estudos sobre as atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antiparasitárias *in vitro* e *in vivo* da IgY aumentou significativamente. Devido às propriedades da IgY, ela pode ter uma ampla gama de aplicações em profilaxia e tratamento na medicina humana e veterinária (Leiva et al., 2020); por exemplo, periodontite, gengivite, cárie dentária, doenças infecciosas entéricas, úlcera gástrica, diarreia na panturrilha, mastite bovina e outros (Wu et al., 2022).

Os anticorpos IgY têm potencial para serem usados em pesquisas, diagnósticos e aplicações terapêuticas devido ao seu conjunto distinto de propriedades, incluindo

reconhecimento mais amplo de epítomos por organismos aviários em comparação com mamíferos, falta de ativação do sistema complementar humano, produção de alto rendimento e experimentação limitada em animais (Tabll et al., 2024).

O desenvolvimento de ensaios imunodiagnósticos baseados em IgY atraiu considerável atenção, e várias revisões relataram a aplicação de anticorpos IgY no diagnóstico de doenças infecciosas e crônicas. Os anticorpos IgY foram incorporados em diversos formatos de imunoensaios, incluindo ELISA, Western blot, imunohistoquímica, imunocromatografia, imunofluorescência e sistemas de biossensores, para uso diagnóstico tanto na medicina humana quanto veterinária (Pacheco et al., 2023).

3.1 APLICAÇÕES DE ANTICORPOS IgY EM IMUNOENSAIOS

3.1.1 Infecção bacteriana

O ELISA (ensaio imunossorvente ligado a enzimas) é uma das plataformas diagnósticas mais amplamente utilizadas e requer anticorpos altamente específicos para a detecção de biomarcadores. Os anticorpos IgY demonstraram excelente aplicabilidade em ensaios baseados em ELISA, permitindo o diagnóstico de uma ampla gama de doenças infecciosas.

Anticorpos IgY foram usados, por exemplo, no desenvolvimento de um ELISA sanduíche para a detecção da proteína de membrana externa W (OmpW) e da citotoxina B (CtxB) do *Vibrio. cólera* (Bayat; Khabiri; Hemati, 2018). Cólera é uma infecção bacteriana com certas peculiaridades em sua epidemiologia, como a falta de estabilidade no número de casos ao longo dos anos, combinada com a natureza inespecífica de seus sintomas, que dificulta a vigilância eficaz (Azman; Moore; Lessler, 2020). O imunoensaio mostrou um limite de detecção de 10^3 CFU/mL de *V. cholera* para a proteína OmpW e 33 pg/mL para a detecção da proteína recombinante citotoxina B, que é usada para determinar a sensibilidade dos anticorpos no reconhecimento desse antígeno (Bayat; Khabiri; Hemati, 2018).

Para o diagnóstico da tuberculose — entre as dez doenças mais letais causadas por um único agente infeccioso no mundo (Who, 2020) — Chen et al. (2013) desenvolveram um método inovador para imobilizar anticorpos IgY contra o complexo *Mycobacterium tuberculosis* em microsferas de alginato. Assim, desenvolveram uma ferramenta diagnóstica para infecções bacterianas com especificidade comparável à ELISA. A grande superfície de contato das microsferas aumentou o limite de detecção, que foi avaliado medindo a intensidade de fluorescência das bactérias-alvo marcadas.

Novos métodos surgiram na última década para detectar antígenos patógenos. Por exemplo, Kota et al. (2020) desenvolveram um ensaio de PCR de imunocaptura usando anticorpos IgY contra a proteína *Staphylococcus aureus* A (SpA) para detectar a bactéria em amostras clínicas, ambientais e de alimentos. Após a captura bacteriana, as células foram lisadas e submetidas a PCR. O ensaio recém-desenvolvido não mostrou reatividade cruzada com patógenos alimentícios Gram-positivos ou Gram-negativos e atingiu um limite de detecção de $>10^2$ CFU/mL em culturas de caldo e 10^2 – 10^3 CFU/mL em amostras naturais. Separadamente, foi desenvolvido um ensaio imunossorvente híbrido ligado a sanduíche aptamer-link para a enterotoxina estafilocócica B (SEB), empregando anti-SEB IgY como anticorpo de captura e aptameros biotinilados para detecção. Esse ensaio atingiu um limite de detecção de 50 ng/mL, representando uma abordagem custo-efetiva para monitorar a SEB em matrizes alimentares e ambientais (Mudili et al., 2015).

No estudo de Tianbao et al. (2024), galinhas foram imunizadas com *Leptospira* inativada para determinar se anticorpos específicos IgY poderiam ser produzidos e extraídos, e para avaliar sua eficácia protetora. Os autores mostraram que a IgY podia ser obtida dos ovos de aves vacinadas e ligar-se especificamente ao patógeno, conforme indicado por microaglutinação (MAT) e ensaios ELISA. Testes in vivo em hamsters revelaram que o tratamento precoce da IgY aumentou a sobrevivência para 100%.

Em um estudo sobre infecções bacterianas, Moosavi et al. (2025) avaliaram a atividade inibitória in vitro dos anticorpos IgY provocados por vários antígenos *Salmonella Typhimurium*. A especificidade foi avaliada por Western blot, e a ligação indireta da ELISA mediu a IgY tanto no soro quanto na gema do ovo. Os resultados indicam que um protocolo de imunização adequado, juntamente com a seleção ótima de antígenos, pode servir como uma base sólida para o desenvolvimento futuro de vacinas.

3.1.2 Infecção viral

No contexto de infecções virais, Budama-Kilinc et al. (2018) foram os primeiros a produzir anticorpos IgY direcionados a um peptídeo do domínio extracelular da proteína matriz 2 (M2e) para detecção da influenza A. Os anticorpos, conjugados a partículas de látex, detectaram duas cepas virais de forma eficaz. Posteriormente, Okzan et al. (2019) usaram o mesmo antígeno M2e para desenvolver um ELISA sanduíche com anticorpos IgY marcados com fosfatase alcalina. O ensaio produziu resultados consistentes com a RT-PCR, embora estudos adicionais sejam necessários para avaliar totalmente a sensibilidade e especificidade.

O vírus da Hepatite A (VHA) é transmitido pela via fecal-oral e está geralmente associado a condições sanitárias e socioeconômicas (Mantovani et al., 2015). Utilizando anticorpos específicos IgY, Bentes et al. (2015) desenvolveram um ensaio de imunofluorescência indireta capaz de detectar antígenos virais em fígados congelados de macacos infectados experimentalmente. Esse método oferece uma plataforma que pode ser estendida para aplicações diagnósticas ou de pesquisa adicionais.

Uma metodologia diagnóstica usando IgY foi desenvolvida para detectar os enterovírus 71 (EV71), o principal agente etiológico da doença da mão, pés e boca (HFMD), que é transmitida pela via fecal-oral e amplamente distribuída mundialmente, afetando principalmente crianças menores de cinco anos (Chang; Chen; Chen, 2016; Chen et al., 2007). Neste estudo, as galinhas foram imunizadas com EV71 inativado, e foram obtidos anticorpos IgY que reconhecem especificamente as proteínas da cápside viral VP2 e VP3. Esses anticorpos foram então empregados em um ensaio de sensor de fluorescência, alcançando um limite de detecção de 10^4 PFU/mL e concordância de 94,44% com amostras clínicas confirmadas por RT-PCR (Nie et al., 2019).

Amaral (2025) descreve a produção e purificação da IgY policlonal contra o SARS-CoV-2 para fins diagnósticos. A capacidade da IgY de detectar SARS-CoV-2 em amostras clínicas de saliva usando ELISA e ensaios de blot pontográfico mostrou resultados promissores em termos de precisão, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, e coeficiente de kappa de Cohen.

Na medicina veterinária, Qi et al. (2024) usaram anticorpos IgY específicos contra a proteína E2 do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um ELISA para detectar patógenos causando diarreia em bovinos, demonstrando alta especificidade ao reconhecer apenas BVDV. Quando usados em ensaios como imunocromatografia e ELISA, os anticorpos IgY produzidos contra partículas semelhantes ao parvovírus canino demonstraram sensibilidade e especificidade na identificação desse vírus em amostras fecais caninas (Wang et al., 2020).

3.1.3 Infecção por protozoários

Silva et al. (2019) usaram anticorpos IgY para desenvolver um modelo de monitoramento para malária e leishmaniose. Galinhas expostas a picadas de mosquitos infectados produziram anticorpos IgY que visavam tanto a saliva dos vetores da doença quanto os parasitas. Esses anticorpos foram detectados nos ovos usando a técnica

ELISA, estabelecendo uma metodologia inovadora para vigilância epidemiológica em áreas rurais.

A malária, a doença parasitária mais importante no mundo (OMS, 2020), foi investigada usando anticorpos IgY para diagnóstico. Em 2010, Hurdal et al. produziram anticorpos IgY direcionados aos peptídeos *Plasmodium lactato* desidrogenase (pLDH), que detectaram a proteína nativa em ensaios de Western blot e imunofluorescência. De forma semelhante, anticorpos IgY contra a desidrogenase *Plasmodium gliceraldeído 3-fosfato* (pGAPDH) reconheceram a proteína nativa em ensaios de imunofluorescência e ELISA (Krause et al., 2017).

Em parasitologia, a IgY tem sido usada principalmente para o diagnóstico de várias doenças, incluindo clonorchíase, esquistossomíase e toxoplasmose (Léon-Núñez et al., 2022). Galinhas imunizadas com a proteína SAG1 de *T. gondii* produziram anticorpos IgY específicos de forma eficiente e em escala (Cakir-Koc, 2016). Cakir-Koc et al. (2020) posteriormente acoplaram esses anticorpos a contas de látex, que reconheceram células infectadas com *taquizoítos de T. gondii* em ensaios de aglutinação, demonstrando sua utilidade para a detecção de infecções. De forma semelhante, Sert et al. (2017) desenvolveram um ensaio de imunofluorescência usando anti-SAG1 IgY marcado com FITC, enquanto Júnior et al. (2012) geraram anticorpos anti-STAg IgY (direcionados às proteínas *taquizoíticas de T. gondii*) que detectaram formas parasitárias em ensaios imunohistoquímicos em lâminas embutidas em parafina e monocamadas de cultura celular. Além disso, no estudo de Ferra et al. (2025), o potencial da IgY para detectar o protozoário *Toxoplasma gondii* foi avaliado produzindo anticorpos IgY contra sua proteína de superfície SAG-1, que reagiu com o antígeno-alvo nos ensaios ELISA e Western blot.

Os sistemas CRISPR-Cas são cada vez mais aplicados em diagnósticos para detecção altamente específica de ácidos nucleicos. Anticorpos IgY direcionados a SpCas9 foram desenvolvidos para detectar componentes do CRISPR-Cas em amostras biológicas, mostrando alta especificidade e sensibilidade em *promastigotos de Leishmania braziliensis* que expressam SpCas9 (León et al., 2023).

3.1.4 Infecção por Helminto

Em doenças causadas por nematoides, De Faria et al. (2019) descreveram o desenvolvimento de anticorpos IgY contra um extrato antigênico de larvas filariformes

infecciosas (iL3) e fêmeas partenogenéticas (pF) de *Strongyloides venezuelensis*, relatando sensibilidades de 95,56% e 88,89% e especificidades de 95,56% e 91,11% para iL3 e pF em ELISA, respectivamente. Com base no mesmo princípio, Teimoori et al. (2017) desenvolveram um novo ELISA sanduíche usando anti-rOV-CF IgY (cathepsina *F recombinante Opisthorchis viverrini*) e demonstraram um limite de detecção de 70 ng de antígenos parasitários, com o ELISA sanduíche mostrando especificidade e sensibilidade de 93,3% e 76,7%, respectivamente.

Dependendo do objetivo, a presença de reatividade cruzada entre espécies pode ser aproveitada no desenvolvimento de imunodiagnósticos, como demonstrado por Carrara et al. (2020), que produziram anticorpos IgY contra a fração hidrofóbica dos metacercários de *Taenia crassiceps* (hFTc) para uso no diagnóstico da neurocisticercose humana (NCC), uma doença neurológica negligenciada causada por *Taenia solium*. Esse parasita é mais difícil de obter do que o *T. crassiceps*, pois as amostras de *T. solium* devem vir do líquido cefalorraquidiano, enquanto as de *T. crassiceps* são obtidas do soro. Nos ensaios ELISA sanduíche, esses anticorpos demonstraram 93,2% de sensibilidade e 94,3% de especificidade na detecção de pacientes com CCN confirmada, fornecendo assim uma nova ferramenta para um diagnóstico mais simples e eficaz dessa doença.

A helmintíase transmitida pelo solo (STH) é a doença tropical negligenciada mais prevalente, causada por várias espécies de vermes parasitas (Mutombo et al., 2019). A microscopia óptica é o método diagnóstico mais comumente utilizado, mas sua precisão pode ser afetada por fatores como viabilidade do parasita e a experiência do técnico (Mutombo et al., 2019). Em um estudo de Souza et al. (2020), galinhas foram imunizadas com um extrato salino de *Ancylostoma ceylanicum*, e os anticorpos IgY resultantes foram purificados e aplicados em ensaios ELISA sanduíche para detectar complexos proteicos no soro de indivíduos infectados. O ensaio alcançou 90% de sensibilidade e 86,7% de especificidade, demonstrando seu potencial como alternativa à microscopia óptica.

A ascariase humana é uma doença negligenciada que afeta principalmente as regiões mais pobres do mundo, e seu diagnóstico é complicado pelo fato de que, em alguns casos, o parasita leva cerca de 60 dias para se tornar detectável nas fezes de indivíduos infectados (Bharti; Bharti; Khurana, 2018). Em resposta a essa questão, anticorpos contra o extrato de *Ascaris suum* foram produzidos e avaliados para o reconhecimento

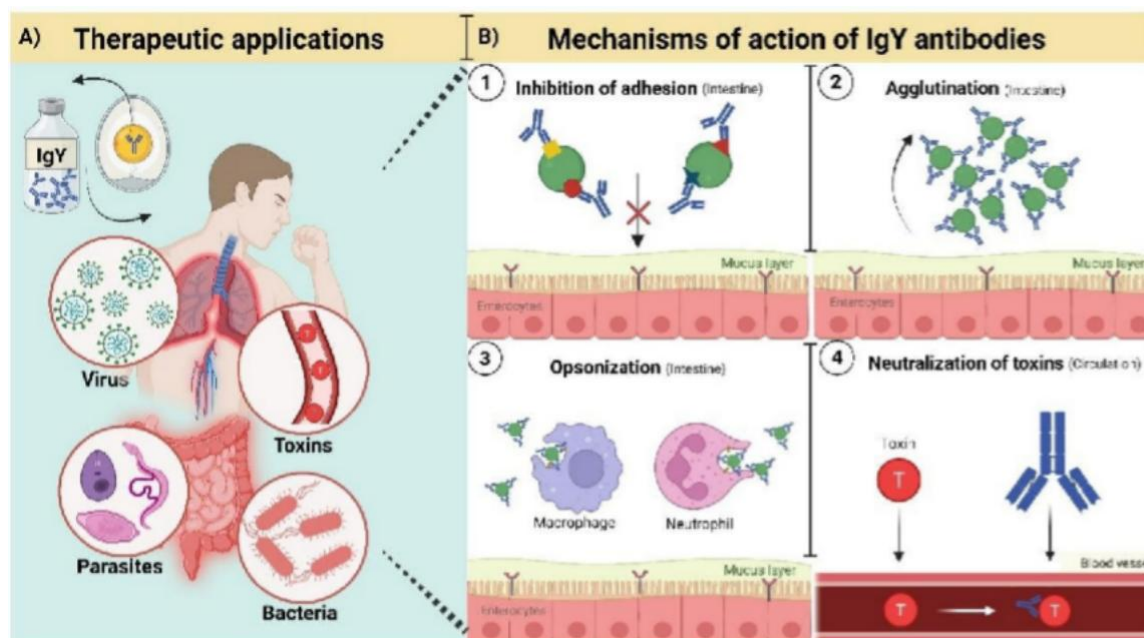
das proteínas de *A. suum* por imunoblotting, que identificou 12 bandas correspondentes ao extrato de *A. suum*, e por imunofluorescência usando ovos, porções uterinas e cutículas de *A. suum*. A detecção dos complexos mostrou 80% de sensibilidade e 90% de especificidade (Lopes et al., 2020). Essa nova ferramenta econômica abre caminho para sua aplicação em vários tipos de imunodiagnóstico para essa doença.

3.2 APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE ANTICORPOS IgY CONTRA ALVOS VIRAIS, BACTERIANOS, PARASITÁRIOS E VENENOSOS

Os anticorpos IgY atuam principalmente por meio do reconhecimento específico e do bloqueio direcionado, exercendo seus efeitos por meio de mecanismos como inibição da adesão microbiana, aglutinação de patógenos e opsonização entre diferentes classes de agentes biológicos (Fig. 2).

Figura 2. Aplicações terapêuticas e mecanismos de ação dos anticorpos IgY.

(A) Potencial terapêutico da IgY contra diferentes agentes biológicos. (B) Principais mecanismos de ação dos anticorpos IgY: (1) inibição da adesão microbiana ao epitélio; (2) aglutinação de microrganismos, facilitando sua remoção; (3) opsonização, promovendo o reconhecimento e a fagocitose por células imunes; (4) neutralização de toxinas, bloqueando seus efeitos biológicos.



Em bactérias, foi demonstrado que a IgY se liga a estruturas expostas na superfície de organismos Gram-negativos, incluindo fimbriae (píli), flagelos, lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa (Zhang et al., 2024). Essa interação pode prejudicar a

função desses componentes e interferir nas vias de sinalização associadas à colonização, prevenindo assim a adesão e inibindo o crescimento bacteriano (Qiu et al., 2025).

Em infecções virais, a IgY pode inibir o estágio inicial da infecção ao impedir a ligação de proteínas virais aos receptores das células hospedeiras (Artman et al., 2021). Em parasitas, incluindo protozoários e helmintos, a IgY interfere na invasão e sobrevivência ao direcionar fatores de virulência e enzimas (Grando et al., 2017; Borges et al., 2018). No contexto da terapia com antivenenos, a IgY se liga diretamente aos componentes tóxicos do veneno, neutralizando sua atividade biológica e reduzindo seus efeitos nocivos (Leiva et al., 2021; Krishnaraj et al., 2025).

A atividade aglutinante da IgY envolve a agregação de microrganismos mediada por ligação multivalente a epítomos antigênicos (Thu et al., 2017). Por exemplo, a IgY pode se ligar à parede celular dos patógenos e promover a aglutinação, inibindo assim a formação de biofilmes em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (Li et al., 2020), bactérias anaeróbias importantes envolvidas na doença periodontal.

A ligação da IgY aos antígenos de superfície também pode aumentar a fagocitose de microrganismos invasores. O *Anti-Pseudomonas* IgY demonstrou promover a opsonização bacteriana e aumentar a atividade fagocítica de neutrófilos polimorfonucleares humanos (Thomsen et al., 2015).

No estudo de Zhou e Ma (2018), macrófagos peritoneais murinos e células THP-1 foram cultivados com IgY anti-lipopolissacarídeo (LPS) *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Os resultados mostraram que a IgY anti-LPS estimulou a proliferação de macrófagos, promoveu a extensão dos pseudópodes e aumentou a capacidade fagocítica.

Eles exercem efeitos protetores ao neutralizar patógenos e toxinas, regular a imunidade intestinal e inibir inflamação e alergias. Devido à sua segurança e acessibilidade, os anticorpos IgY têm potencial significativo para aplicações como tratamento de infecções gastrointestinais, fortalecimento da imunidade mucosa e prevenção de alergias (Qiu et al., 2025).

A imunização passiva com anticorpos IgY oferece uma abordagem alternativa para tratar infecções em pessoas imunocomprometidas e para minimizar os potenciais efeitos colaterais associados à vacinação. Essas preparações de anticorpos contêm principalmente anticorpos policlonais IgY derivados do soro de animais imunizados, como galinhas (Abbas et al., 2019).

A IgY também oferece uma alternativa não antibiótica para o manejo dessas infecções, reduzindo o risco de resistência antimicrobiana (El-Kafrawy et al., 2023). O uso de produtos bioterapêuticos baseados em IgY aumentou significativamente, especialmente em suplementos alimentares e aplicações tópicas como cremes, pomadas, géis e sprays para uso em humanos (Yakhkeshi et al., 2025).

A capacidade dos anticorpos IgY de tratar e prevenir vírus que afetam diferentes animais tem sido amplamente estudada e eles demonstraram sua eficácia. A administração oral de anticorpos IgY tem demonstrado benefícios contra vírus em bovinos, como o coronavírus bovino e seu grupo. Em espécies caninas, a IgY também tem se mostrado eficaz contra o parvovírus canino e o vírus da cinomose canina. Além disso, em aves, a IgY demonstrou aplicabilidade terapêutica contra vírus como o vírus da doença de Newcastle, influenza e reovírus (Hridya et al., 2025).

Anticorpos IgY obtidos de aves e purificados da gema de ovo foram testados como ferramentas para o tratamento de doenças infecciosas, autoimunes e alérgicas. Em particular, eles foram usados contra vírus e bactérias que causam distúrbios respiratórios em humanos e animais (Léon-Núñez et al., 2022). Antídotos à base de IgY também foram desenvolvidos, demonstrando a capacidade de neutralizar o veneno de cobras como *Naja naja*, *Trimeresurus albolabris* e *Bothrops alternatus* (Capota et al., 2025).

A IgY pode fornecer uma abordagem segura e rápida para profilaxia e desenvolvimento terapêutico contra uma variedade de patógenos. Especificamente, a imunidade passiva obtida por meio do tratamento superficial com IgY pode capturar patógenos antes que eles entrem no corpo (Lee et al., 2021). A IgY administrada por via oral também demonstrou proteger contra patógenos entéricos como *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Salmonella* e rotavírus, ligando e neutralizando toxinas ou bloqueando a adesão do patógeno.

Além disso, no setor alimentício, o desenvolvimento de uma fórmula de gema de ovo em pó com açúcares protetores contendo antigliadina IgY demonstrou outra aplicação da tecnologia IgY: a prevenção da doença celíaca. Tanto a gliadina isolada quanto a gliadina presentes na matriz alimentar foram neutralizadas in vitro por essa fórmula, que também impediu a absorção intestinal em camundongos, sugerindo resultados promissores para a profilaxia da doença celíaca (Grzywa et al., 2023).

No entanto, a IgY pode ser usada como uma molécula natural e econômica, fornecendo proteção imune passiva contra uma variedade de patógenos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas em humanos e animais (Tabela 1). A intervenção com

IgY funciona como uma terapia de coquetel ao direcionar múltiplos patógenos, permitindo o estabelecimento de uma ampla gama de terapias e possibilitando tratamentos mais personalizados com base na análise da condição do paciente (Yakhkeshi et al., 2022).

Embora o uso da IgY ofereça apenas proteção temporária e a dosagem deva ser repetida quando os indivíduos estiverem em risco de exposição, ele é imediatamente eficaz, ao contrário da vacina, pois não requer de 5 a 6 semanas para alcançar a eficácia protetora (Chen et al., 2022).

Tabela 1: Tratamentos utilizando IgY.

Biological Agent	In vivo/In vitro Study	Human/Animal Model	Route of Administration	IgY Effects	Reference
SARS-CoV-2	<i>In vitro</i>	not applicable	not applicable	It is anticipated that chicken-derived scFv IgY antibodies developed against SARS-CoV-2 using phage display technology could serve as a potential model for the efficient mass production of high-affinity IgY antibodies to treat this disease, with standardized preparation for effective long-term use.	Somasundaram et al. (2020)
H5N1 (Influenza)	<i>In vivo</i>	Mice	Intranasal	Protects mice from influenza virus-induced pathology, and the treatment does not inhibit the development of protective immunity after challenge with either heterologous or homologous influenza virus.	Eriksson et al. (2024)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>In vivo</i>	Mice and humans	Oral	Protection against dental caries, plaque accumulation, and reinfection.	Xu et al. (2018)
<i>Enterotoxigenic E. coli</i>	<i>In vivo</i>	Humans	Oral	Reduction in the duration of diarrhea in children whose stools contained one or more target organisms at the time of inclusion in the study.	Gaensbauer et al. (2017)
	<i>In vivo</i>	Mice	Subcutaneous	Effective in neutralizing the lethal effects and the hemorrhagic,	Liu et al. (2017)

<i>Deinagkistrodon acutus</i>				edematous, and myotoxic activities of <i>D. acutus</i> venom.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>In vitro/In vivo</i>	Mice	Intravenous	Anti-PAO1 IgY effectively protected burned, infected mice and reduced the bacterial load. Many studies on the therapeutic applications of IgY have consistently shown that, although these antibodies successfully inhibit initial bacterial colonization, they are ineffective in preventing systemic infections.	Ahmadi et al. (2024)
Bovine respiratory syncytial virus (BRSV)	<i>In vitro</i>	not applicable	not applicable	Preparation of purified IgY, obtained from chickens immunized with BRSV, neutralized BRSV in vitro.	Lee et al. (2017)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (TB)	<i>In vitro</i>	not applicable	not applicable	Specific IgY against TB increased from two weeks after the first immunization and persisted for 200 days after the last immunization.	Nair et al. (2010)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>In vivo</i>	Mice	Intraperitoneal	Anti- <i>A. baumannii</i> IgY specific for pan-resistant strains reduced inflammatory cytokine levels, pulmonary inflammation, and mortality.	Shi et al. (2017)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>In vitro</i>	not applicable	not applicable	The specific IgY showed high binding specificity and inhibited bacterial growth in culture, likely by disrupting interactions with surface antigens, and exhibited no cross-reactivity with other bacterial strains.	Jagadeeswari et al. (2015)

<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>In vivo</i>	Mice	Intraperitoneal	IgY treatment reduced parasitemia on day 6 post-infection (PI) compared to the infected control group, but levels were similar by day 8 PI. Additionally, infected and treated animals (groups E and F) showed no amastigotes in cardiac tissue or cardiac lesions compared to the positive control group (group D).	Grando et al. (2018)
<i>E. coli</i> K88	<i>In vivo</i>	Pigs	Oral	Complete reduction of <i>E. coli</i> 72 hours after challenge.	Wang et al. (2019)
<i>Salmonella enteritis</i> (SE) and <i>Salmonella Typhimurium</i> (ST)	<i>In vivo</i>	Humans	Oral	Significant reduction in <i>Salmonella</i> colony counts in the cecum.	Karabasanavar et al. (2022)

3.2.1 Terapia antiviral

Ao direcionar proteínas virais específicas ou bloquear a ligação viral às células hospedeiras, os anticorpos IgY podem ser usados para prevenir ou tratar infecções virais (Tabll et al., 2024). No estudo de Somasundaram et al. (2020), foi destacada a importância geral da produção de IgY monoclonal usando o método de exibição de fagos, e foi descrita a potencial aplicação imunoterapêutica passiva da IgY para o tratamento e prevenção da infecção por SARS-CoV-2.

Também usando a exibição de fagos, Ge et al. (2022) desenvolveram um fragmento de variável de cadeia única de IgY (IgY-scFv) que demonstrou capacidade significativa de ligação ao fragmento S1 da proteína spike do SARS-CoV-2. No geral, as interações eletrostáticas desempenham um papel na determinação da afinidade de ligação e da estabilidade geral do complexo anticorpo-antígeno, sugerindo o potencial do IgY-scFv para uso em imunoterapia passiva e imunoenaios.

No estudo de Schwartz et al. (2022), um modelo murino foi usado para mostrar que a infecção do trato urinário induzida por *Pseudomonas aeruginosa*, juntamente com o uso profilático de IgY contra seis diferentes cepas de *P. aeruginosa*, reduziu significativamente a carga bacteriana intravesical, sugerindo uma nova estratégia não antibiótica para prevenir infecções urinárias por *P. aeruginosa*.

Em outro estudo, Eriksson et al. (2024) investigaram como o tratamento preventivo com anticorpos IgY específicos do vírus da influenza afetava a resposta imune do hospedeiro, utilizando camundongos adultos e idosos imunocompetentes, bem como camundongos adultos imunocomprometidos. Este estudo demonstrou que a terapia profilática com administração intranasal de anti-H5N1 IgY protege camundongos contra sintomas induzidos pelo vírus da gripe e não inibe o desenvolvimento da imunidade protetora após o desafio.

Rotavírus causam doenças gastrointestinais e diarreicas, resultando em altas taxas de mortalidade em várias espécies animais e diarreia aquosa severa e vômito em bebês e crianças pequenas (Lee et al., 2021). Em estudos de Wang et al. (2019), foi realizada uma meta-análise envolvendo 2.626 bebês, na qual 1.347 receberam anti-rotavírus IgY oral e 1.279 receberam tratamento convencional. A IgY antirrotavírus foi significativamente mais eficaz que o tratamento convencional.

Outro tipo de tratamento baseado em IgY envolve o vírus Ebola, que causa altas taxas de mortalidade em humanos e primatas não humanos (Who, 2021). No estudo

conduzido por Zhang et al. (2021), o vírus anti-Ebola IgY foi avaliado em camundongos recém-nascidos. Animais que receberam altas doses de IgY anti-Ebola apresentaram proteção completa, enquanto o grupo de baixa dose apresentou proteção parcial.

3.2.2 Terapia antibacteriana

As bactérias têm a capacidade de se autorreplicar e secretar fatores de virulência, permitindo que colonizem várias células e tecidos humanos e animais. Nesse contexto, a IgY tem sido usada como opção terapêutica porque pode reduzir e prevenir a colonização bacteriana (Léon Núñez et al., 2022).

Anticorpos específicos contra IgY têm sido usados contra bactérias patogênicas na cavidade oral, incluindo *Streptococcus mutans* e *Porphyromonas gingivalis*. Estudos mostraram que esses anticorpos podem inibir o desenvolvimento de cáries dentárias, acúmulo de placa e reinfecções (Xu et al., 2018). IgY também foi aplicada a outras patologias orais, como periodontite e halitose. Para avaliar sua capacidade de inibir o crescimento de *Fusobacterium nucleatum*, bactérias foram cultivadas em tubos contendo diferentes concentrações de IgY (Wang et al., 2019).

Outra bactéria estudada para tratamento baseado em anticorpos IgY é *Escherichia coli*, um componente integral da microflora de mamíferos, com vários patótipos associados ao desenvolvimento de doenças entéricas. Em um ensaio randomizado e controlado por placebo conduzido por Gaensbauer et al. (2017), 301 crianças na Guatemala com diarreia aguda não sangüinolenta receberam uma preparação combinada de IgY direcionada a rotavírus, *E. coli* enterotoxigênico, *E. coli* Shiga-positivo e *Salmonella* (PTM202) ou placebo por três dias. Entre as crianças cuja diarreia foi causada por um ou mais patógenos alvo do PTM202, o tratamento com a preparação IgY reduziu significativamente a duração da diarreia em comparação com o placebo.

Mycobacterium tuberculosis (MBTC) é responsável pelo desenvolvimento da tuberculose, uma doença respiratória fatal que também pode causar manifestações extrapulmonares e que tem se tornado cada vez mais difícil de tratar devido à resistência aos antibióticos (Chauhan et al., 2021). Em Sudjarwo et al. (2017), usando um modelo de células mononucleares de sangue periférico de rato, a administração de altas concentrações de anti-MBTC IgY aumentou a expressão da interleucina-2. Além disso, o uso de IgY também pode ser de interesse para um novo tratamento de micobactérias pulmonares não tuberculosas, que são consideradas mais difíceis de tratar devido à

frequente intolerância antimicrobiana e resistência a medicamentos (Shulha et al., 2019).

No estudo de Rezaeifard et al. (2021), foi investigada a difteria, uma doença bacteriana causada pela toxina da difteria produzida por *Corynebacterium diphtheriae*. A atividade neutralizante do anti-DT IgY foi avaliada em um ensaio de cultura celular, demonstrando que esses anticorpos podem servir como alternativa aos anticorpos equinos convencionais para direcionar a toxina. O estudo também avaliou o efeito neutralizante do anti-DT IgY em condições in vivo, fornecendo evidências complementares de seu potencial uso terapêutico.

3.2.3 Terapia antiparasitária

No estudo conduzido por Sampaio et al. (2014), foi produzido um IgY de alta avidéz contra o protozoário *Trypanosoma evansi*. Embora não tenha apresentado efeito profilático ou controle da infecção em camundongos tratados, o anti-*T. evansi* IgY aumentou as taxas de sobrevivência quando usado em combinação com medicamentos antihematozoários.

Grando et al. (2017) inocularam *Trypanosoma cruzi* trypomastigotos em galinhas e extraíram anti-*T. cruzi* IgY, que reagiu cruzadamente com antígenos de *T. evansi* em um ensaio Western blot. O estudo mostrou que a IgY anti-*T. cruzi* não é confiável como ferramenta diagnóstica, mas os antígenos de *T. cruzi* também podem ser usados para controlar infecções e reduzir a progressão da doença, servindo assim como uma forma de imunização/imunoterapia terapêutica.

Em outro estudo, Grando et al. (2018) demonstraram em um modelo murino que a administração profilática de anti-*T. cruzi* IgY a 50 mg/kg reduziu a parasitemia pós-provocação e previniu o desenvolvimento de lesões cardíacas causadas por amastigotas. Esses mesmos efeitos também foram observados com a administração terapêutica de 50 mg/kg de IgY, que também melhorou a resposta imune ao evitar o aumento da atividade enzimática nos linfócitos esplênicos dos animais.

No estudo de Hashemzadeh et al. (2016), a IgY foi explorada como tratamento contra infecção por *Cryptosporidium*. In vitro, os anticorpos IgY produzidos contra antígenos oocistos de *C. parvum* foram altamente específicos, reduziram a ligação do parasita às células Caco-2 e bloquearam a viabilidade de *C. parvum*.

3.2.4 Terapia com antiveneno

Nos últimos anos, ovos de galinhas imunizadas com antígeno foram reconhecidos como uma fonte valiosa de anticorpos IgY. Numerosos estudos sobre antivenenos IgY de cobras demonstraram que IgY derivado de ovos de galinha representa uma alternativa promissora aos antivenenos convencionais produzidos em grandes mamíferos, como cavalos (Liu et al., 2017).

Um dos efeitos adversos observados em indivíduos que recebem antivenenos produzidos em animais como cabras, ovelhas e cavalos está associado a proteínas séricas residuais resultantes da purificação insuficiente de IgG. Como a IgY pode ser facilmente purificada, seu uso pode reduzir a incidência desses efeitos colaterais (Pereira et al., 2019).

Da Rocha et al. (2017) produziram anticorpos IgY contra toxinas do veneno de cobra de *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca* e *Bitis arietans*. Esses anticorpos se ligavam a componentes específicos do veneno em ensaios Western blot e proporcionavam 100% de proteção em camundongos envenenados quando obtidos após a nona imunização. De forma semelhante, Duan et al. (2016) produziram antiveneno IgY a partir dos ovos de galinhas imunizadas com veneno de *Trimeresurus albolabris*. A IgY reconheceu a maioria das proteínas venenosas em análises Western blot e neutralizou seus efeitos tóxicos em camundongos de forma dependente da dose.

3.3 LIMITAÇÕES E DESAFIOS NO USO DA TECNOLOGIA IgY

A aplicação da tecnologia IgY em diagnósticos e terapias ainda enfrenta limitações importantes que dificultam seu uso generalizado. A IgY não ativa o sistema complementar dos mamíferos e não interage com os receptores Fc, características que a tornam um reagente atraente para aplicações *in vitro* (Constantin et al., 2020). No entanto, a ausência dessas interações levanta questões quanto à sua eficácia e segurança em aplicações sistêmicas, exigindo investigações adicionais (Esmaeili et al., 2025).

Do ponto de vista terapêutico, a administração oral apresenta desafios significativos, pois a IgY é suscetível à degradação sob condições fisiológicas. No trato gastrointestinal, ela é rapidamente degradada por enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, quimotripsina e elastase, destacando a necessidade de estratégias protetoras como encapsulamento (Wang et al., 2023).

Limitações adicionais estão associadas à produção de anticorpos. A IgY monoclonal recombinante oferece alta especificidade, mas está associada a custos de produção

elevados, desafios na identificação de epítomos e longos prazos de desenvolvimento (Tabll et al., 2024). Em contraste, preparações policlonais de IgY podem apresentar variabilidade de lote para lote devido a diferenças na composição e afinidade de anticorpos entre as galinhas, exigindo validação rigorosa e caracterização (Leow et al., 2021).

Em diagnósticos, embora a IgY ofereça vantagens para imunoenaios, a falta de padronização no uso de animais específicos livres de patógenos e nos processos de produção, extração e purificação permanece uma grande barreira para a aprovação regulatória e adoção mais ampla (Lee et al., 2021). A proteção limitada da propriedade intelectual reduziu ainda mais o interesse e o investimento da indústria no desenvolvimento comercial de produtos baseados em IgY (Yakhkeshi et al., 2022).

Vale notar que, em muitas aplicações, os anticorpos IgY são usados na forma de extratos brutos, que não possuem alto nível de pureza. No entanto, para aplicação ampla em diagnósticos, terapias e comercialização em larga escala, é essencial caracterizar minuciosamente a composição desses produtos e avaliar sua segurança para uso em humanos e animais (Zhang et al., 2023).

IgY é geralmente considerada segura; no entanto, seus efeitos a longo prazo permanecem insuficientemente caracterizados, especialmente em populações vulneráveis como crianças e indivíduos imunocomprometidos (Esmaeili et al., 2025). Mesmo preparações altamente purificadas podem conter proteínas residuais de ovo capazes de desencadear reações de hipersensibilidade em indivíduos suscetíveis (El-Kafrawy et al., 2026). Portanto, estudos adicionais são necessários para avaliar possíveis respostas antigênicas e alérgicas (Lee et al., 2021).

Apesar dos avanços significativos, o progresso adicional na tecnologia IgY dependerá de esforços coordenados em pesquisa básica e aplicada, otimização dos processos produtivos e desenvolvimento de estruturas regulatórias claras. Essas etapas são essenciais para padronizar protocolos, garantir a qualidade e reprodutibilidade do produto e expandir a validação clínica da eficácia e segurança em aplicações diagnósticas e terapêuticas (El-Kafrawy et al., 2026).

CONCLUSÕES

A tecnologia baseada em imunoglobulinas de gema de ovo mostra potencial promissor para avançar ferramentas diagnósticas e terapêuticas, destacando-se por sua

alta especificidade, baixo custo de produção e menor risco de reatividade cruzada com proteínas humanas.

Ensaio que utiliza IgY demonstraram eficácia na detecção sensível e precisa de patógenos, biomarcadores e toxinas, contribuindo para diagnósticos mais rápidos e confiáveis. No campo terapêutico, os anticorpos IgY representam uma alternativa inovadora e segura, especialmente diante da crescente preocupação com a resistência antimicrobiana e os efeitos adversos dos medicamentos convencionais.

Apesar dos desafios remanescentes relacionados à padronização de protocolos, escalabilidade da produção e marcos regulatórios, o crescente corpo de evidências científicas apoia a aplicação da IgY como uma estratégia viável para o futuro da medicina diagnóstica e terapêutica, com potencial para beneficiar tanto a saúde humana quanto animal.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer às instituições Fundação de Amparo à pesquisa do Amazonas – FAPEAM, EDITAL N. 004/2024 - PEX-CT&I/FAPEAM, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Bolsista CAPES Brasil) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro fornecido para este estudo.

REFERÊNCIAS

- Abbas AT, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, Azhar EIA. Anticorpos IgY para a imunoprevenção e tratamento de infecções respiratórias. *Hum Vacina Imuno*. 2019; 15(1):264-275. doi: 10.1080/21645515.2018.1514224. Epub 2018 19 de set. PMID: 30230944; PMCID: PMC6363154.
- Amaral, CML, Pinto Júnior, VC, Lima, DF, da Costa, H. paula S., Farias, DAB, da Silva Neto, JX, Guedes, MIF (2025). Utilização de IgY para diagnóstico de infecções respiratórias: aplicação prática em COVID-19. *Ciência Futura OA*, 11 (1). 2025. <https://doi.org/10.1080/20565623.2025.2546245>
- Amro WA, Al-Qaisi W, Al-Razem F. Produção e purificação de anticorpos IgY a partir da gema de ovo de galinha. *J Genet Eng Biotecnol*. junho de 2018; 16(1):99-103. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.10.003. Epub 10 de outubro de 2017. PMID: 30647711; PMCID: PMC6296578.
- Artman C, et al. Anticorpos aviários (IgY) que visam glicoproteína spike do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) inibem a ligação dos receptores e a replicação viral. *Uma, por favor*. 2021; 16(5):e0252399. doi:10.1371/journal.pone.0252399.

Azman AS, Moore SM, Lessler J. Vigilância e a luta global contra a cólera: Definição de prioridades e acompanhamento do progresso. *Vacina*. 29 de fevereiro de 2020; 38 Suppl 1(Suppl 1): A28-A30. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.06.037. Epub 2019 29 jun. PMID: 31266671; PMCID: PMC7054831.

Bayat M, Khabiri A, Hemati B. Desenvolvimento do ELISA sanduíche à base de IgY como ferramenta robusta para detecção e discriminação rápida de *Vibrio cholerae* toxigênico. *Pode infectar esse microbiol médico?* 2 de outubro de 2018;2018:4032531. doi: 10.1155/2018/4032531. Errata em: *O J Pode Infectar Esse Microbiol Médico*. 4 de março de 2019;2019:4164982. doi: 10.1155/2019/4164982. PMID: 30386445; PMCID: PMC6189684.

Bentes GA, Lanzarini NM, Lima LR, Manso PP, da Silva Ados S, Mouta Junior Sda S, Guimarães JR, de Moraes MT, Pelajo-Machado M, Pinto MA. Uso da imunoglobulina Y como anticorpo alternativo para a detecção do vírus da hepatite A em seções hepáticas congeladas. *Membro do Inst Oswaldo Cruz*. junho de 2015; 110(4):577-9. doi: 10.1590/0074-02760140457. Epub 15 de maio de 2015. PMID: 25993400; PMCID: PMC4501425.

Bharti B, Bharti S, Khurana S. Infestação de vermes: Diagnóstico, Tratamento e Prevenção. *Indian J Pediatr*. novembro de 2018; 85(11):1017-1024. doi: 10.1007/s12098-017-2505-z. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29127616.

Bizanov, G. Extração e purificação IgY a partir da gema de ovo de galinha. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, v. 68, n. 3, p. 265-272, 2017. BOUVARD, V. et al. Uma revisão dos carcinógenos humanos - Parte B: agentes biológicos. *The Lancet Oncology*, v. 10, n. 4, p. 321–322, abr. 2009.

Borges IP, et al. Efeitos antiparasitários induzidos por anticorpos policlonais IgY anti-fosfolipase A2 do *veneno* de *Bothrops pauloensis*. *Int J Biol Macromol*. 2018; 112:333–342. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178.

Budama-Kilinc Y, Cakir-Koc R, Ozdemir B, Kaya Z, Badur S. Produção e caracterização de um anticorpo IgY específico baseado em peptídeos M2E conservados: avaliação do potencial diagnóstico via conjugação com nanopartículas de látex. *Prepare-se Bioquímica Biotecnológica*. 2018; 48(10):930-939. doi: 10.1080/10826068.2018.1525564. Epub 2 de novembro de 2018. PMID: 30388960.

Cakir-Koc R. Produção de anticorpo IgY anti-SAG1 contra parasitas *Toxoplasma gondii* e avaliação da atividade de anticorpos pelo método ELISA. *Resolução Parasitol*. 2016 Ago; 115(8):2947-52. doi: 10.1007/s00436-016-5047-9. Epub 2016 15 de abr. PMID: 27079459.

Cakir-Koc R, Budama-Kilinc Y, Ustun E, Babur C. et al. Conjugação e caracterização de partículas de látex com anticorpos Y de imunoglobulina específicos de *Toxoplasma gondii* para finalidade diagnóstica e eficiência de avaliação em cultura InáVitro. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 92, p. 103145, 2020.

Capotă R, Ciaușu-Sliwa D, Bostănaru-Iliescu AC, Năstăsă V, Mareș M. Descobertas Recentes em Tecnologias e Aplicações de Imunoglobulina Y. *Int J Mol Sci*. 2025 2 de jul. 26(13):6380. doi:10.3390/ijms26136380. PMID: 40650158; PMCID: PMC12250558.

Carrara GMP, Silva GB, Faria LS, Nunes DS, Ribeiro VS, Lopes CA, Gonçalves-Pires MDRF, Santos MM, Borges IP, Ferreira-Junior Á, Ávila VMR, Costa-Cruz JM. Anticorpo IgY e neurocisticercose humana: uma abordagem inovadora para imunodiagnóstico usando *antígenos hidrofóbicos de Taenia crassiceps*. Parasitologia. fevereiro de 2020; 147(2):240-247. doi: 10.1017/S0031182019001446. Epub 23 de outubro de 2019. PMID: 31603062; PMCID: PMC10317684.

Chang, P.-C.; Chen, S.-C.; Chen, K.-T. O Status Atual da Doença Causada por Infecções por Enterovírus 71: Epidemiologia, Patogênese, Epidemiologia Molecular e Desenvolvimento de Vacinas. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 13, n. 9, p. 890, 9 set. 2016.

Chauhan A, Kumar M, Kumar A, Kanchan K. Revisão abrangente sobre o mecanismo de ação, resistência e evolução de medicamentos antimicobacterianos. Life Sci. 2021 1º de jun;274:119301. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119301. Epub 2021 Mar. 3. PMID: 33675895.

Chen KT, Chang HL, Wang ST, Cheng YT, Yang JY. Características epidemiológicas da doença mão-pé-boca e herpangina causadas pelo enterovírus 71 em Taiwan, 1998-2005. Pediatria. 2007 Ago; 120(2):e244-52. doi: 10.1542/peds.2006-3331. PMID: 17671037.

Chen CJ, Hudson AF, Jia AS, Kunchur CR, Song AJ, Tran E, Fisher CJ, Zanchi D, Lee L, Kargotich S, Romeo M, Koperniku A, Pamnani RD, Mochly-Rosen D. Profilaxia antiviral acessível baseada em IgY para ambientes com recursos limitados para lidar com riscos epidêmicos e pandêmicos. J Glob Saúde. 26 de fevereiro de 2022;12:05009. doi: 10.7189/jogh.12.05009. PMID: 35265332; PMCID: PMC8877785.

Conroy PJ, Direito direito, Caradoc-Davies TT, Whisstock JC. Anticorpos: Desde repertórios inovadores até definir e refinar a estrutura de alvos biologicamente importantes. Métodos. 2017 1º de mar. 116:12-22. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.01.003. Publicado em formato eletrônico de 2017 em 11 de jan. PMID: 28088364.

Constantin C, Neagu M, Supeanu TD, Chiurciu V, Spandidos DA. IgY - virando a página para a imunização passiva na infecção por COVID-19 (revisão). *Experiência Ther Med*. 2020; 20:151–158. doi:10.3892/etm.2020.8704. PMID: 32670000.

de Faria LS, de Souza DLN, Ribeiro RP, de Sousa JEN, Borges IP, Ávila VMR, Ferreira-Júnior Á, Goulart LR, Costa-Cruz JM. Anticorpos anti-IgY altamente específicos e sensíveis contra *Strongyloides venezuelensis* aplicados ao imunodiagnóstico de strongiloidiase humana. Parasitol Int. 2019 Out;72:101933. doi: 10.1016/j.parint.2019.101933. Epub 23 de maio de 2019. PMID: 31128257.

Da Rocha DG, Fernandez JH, De Almeida CMC, Da Silva CL, Magnoli FC, Da Silva OÉ, Da Silva WD. Desenvolvimento de anticorpos IgY contra toxinas anti-cobra dotados de atividade neutralizante altamente letal. Eur J Pharm Sci. 2017 30 de agosto; 106:404-412. doi: 10.1016/j.ejps.2017.05.069. Publicado em 2017 em 5 de jun. PMID: 28595875.

Duan HL, He QY, Zhou B, Wang WW, Li B, Zhang YZ, Deng QP, Zhang YF, Yu XD. Anticorpos IgY do veneno anti-Trimeresurus albolabris: preparação, purificação e eficácia neutralizante. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2016 24 de agosto; 22(1):23. doi: 10.1186/s40409-016-0078-3. PMID: 27563307; PMCID: PMC4997716.

El-Kafrawy SA, et al. Imunoterapia passiva IgY para preparação para pandemias: uma abordagem da plataforma One Health contra o patógeno X. *Clin Microbiol Rev.*2026:e00249-25. doi:10.1128/cmr.00249-25.

El-Kafrawy SA, Abbas AT, Oelkrug C, Tahoon M, Ezzat S, Zumla A, Azhar EI. Anticorpos IgY: O potencial promissor para superar a resistência a antibióticos. *Imunol frontal.* 2023 20 de janeiro de 14:1065353. doi: 10.3389/fimmu.2023.1065353. PMID: 36742328; PMCID: PMC9896010.

Eriksson M, Nylén S, Grönvik KO. A imunização passiva de camundongos com IgY anti-H5N1 protege contra infecção experimental pelo vírus da gripe e permite o desenvolvimento de imunidade protetora. *Vacina.* 14 de novembro de 2024; 42(25):126133. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.07.034. Publicado em 2024 16 de jul. PMID: 39019655.

Esmacili Z, Kamal Shahsavari S, Ghazvini K. Uma revisão sistemática dos efeitos terapêuticos dos anticorpos aviários (IgY) em infecções bacterianas humanas ao longo da década. *Terapêuticas de Anticorpos.* 2025; 8(2):111–123.

Ferra BT, Hadaś E, Jankowska K, Golab E, Dziadek B (2025) Desenvolvimento de proteínas quiméricas recombinantes de *Toxoplasma gondii* como potenciais alternativas ao lisado de taquizoíto de célula inteira em sorodiagnóstico. *Int J Mol Sci* 26(8):4384. <https://doi.org/10.3390/ijms25084384>. 2025.

Gaensbauer JT, Melgar MA, Calvimontes DM, Lamb MM, Asturias EJ, Contreras-Roldan IL, Dominguez SR, Robinson CC, Berman S. Eficácia de uma intervenção à base de colostro bovino e ovo na diarreia aguda infantil na Guatemala: um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. *BMJ Glob Health.* 2017 Dec 4; 2(4):e000452. doi: 10.1136/bmjgh-2017-000452. PMID: 29259822; PMCID: PMC5728299.

Ge, S.; DIAS, A. C. P.; Zhang, X. Quimerismo de IgY-scFv aviário e IgG-FC truncado: Uma estratégia inovadora na geração e aprimoramento de anticorpos entre espécies. *Imunologia*, v. 172, n. 1, p. 46–60, 2024.

Grando TH, Baldissera MD, de Sá MF, do Carmo GM, Porto BCZ, Aguirre GSV, Azevedo MI, de Jesus FPK, Santurio JM, Sagrillo MR, Stefani LM, Monteiro SG. Anticorpos aviários (IgY) contra *Trypanosoma cruzi*: Estudos de purificação e caracterização. *Métodos J Immunol.* 2017 Out;449:56-61. doi: 10.1016/j.jim.2017.07.002. Epub 2017 8 de jul. PMID: 28697990; PMCID: PMC7126890.

Grando TH, Baldissera MD, Do Carmo G, Oliveira CB, Santi ET, Doleski PH, Leal DBR, Stefani LM, Mendes RE, Da Silva AS, Monteiro SG. Atividades de ectoenzimas em linfócitos esplênicos de camundongos infectados experimentalmente por *Trypanosoma cruzi* e tratados com imunoglobulinas aviárias específicas: uma tentativa de melhorar a resposta imune. *Bioquímica de Células Moleculares.* novembro de 2018; 448(1-2):9-15. doi: 10.1007/s11010-018-3308-x. Publicado em formato eletrônico 12 de fevereiro de 2018. PMID: 29435869.

Grzywa R, Łupicka-Słowik A, Sieńczyk M. IgYs: no serviço secreto de sua majestade. *Imunol frontal.* 12 de junho de 2023;14:1199427. doi: 10.3389/fimmu.2023.1199427. PMID: 37377972; PMCID: PMC10291628.

Hashemzadeh Farhang H, Shahbazi P. Produção de anticorpo específico da gema do ovo (Igy) contra oocistos de *Cryptosporidium parvum*. *Med Lab J* (2016) 10:38–42. [Google Acadêmico].

Hridya, M. L. et al. Aproveitando o potencial da IgY: Uma abordagem criativa para imunodiagnóstico e imunoterapia contra doenças virais em animais. *Current Microbiology*, v. 82, n. 11, p. 537, 2025.

Hurdayal, R. et al. Peptídeos Anticorpos antipeptídicos diferenciam entre lactato desidrogenases plasmodiais. *Peptides*, v. 31, p. 525–532, 2010.

Innes, E. A. et al. Toxoplasmose ovina. *Parasitologia*, v. 136, n. 14, p. 1887–1894, 8 dez. 2009.

Júnior Á. et al. Produção, caracterização e aplicações de imunoglobulinas policlonais específicas de toxoplasma gondii. *PLoS UM*, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012.

Karlsson, M.; Kollberg, H.; Larsson, A. Chicken IgY: utilizando a vantagem evolutiva. *Revista Mundial de Ciência Avícola*, v. 60, n. 3, p. 341–348, 1 série. 2004.

Klemperer, F. Sobre imunidade natural e seu uso para a terapia de imunização. *Arch Exp Path Pharmacol*, v. 31, p. 356–82, 1893.

Kota RK, Reddy PN, Sreerama K. Aplicação de anticorpos IgY contra a proteína estafilocócica A (SpA) de *Staphylococcus aureus* para detecção e funções profiláticas. *Appl Microbiol Biotechnol*. novembro de 2020; 104(21):9387-9398. doi: 10.1007/s00253-020-10912-5. Epub 22 de setembro de 2020. PMID: 32960294.

Krause RGE, Hurdayal R, Choveaux D, Przyborski JM, Coetzer THT, Goldring JPD. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do *Plasmodium*: um potencial alvo para o diagnóstico da malária. *Exp Parasitol*. 2017 Ago;179:7-19. doi: 10.1016/j.exppara.2017.05.007. Publicado online em 26 de maio de 2017. PMID: 28552792.

Krishnaraj PN, et al. Neutralização da toxicidade sistêmica do veneno de *Daboia russelii* e fração de reprotoxina por anticorpos IgY. *Medicação Discov*. 2025:100217. doi:10.1016/j.medidd.2025.100217.

Lee L, Samardzic K, Wallach M, Frumkin LR, Mochly-Rosen D. Imunoglobulina Y para Potenciais Aplicações Diagnosticas e Terapêuticas em Doenças Infecciosas. *Imunol frontal*. 9 de junho de 2021;12:696003. doi: 10.3389/fimmu.2021.696003. PMID: 34177963; PMCID: PMC8220206.

Leiva CL, entre outros. Neutralização in vivo da letalidade do veneno de abelha por anticorpos IgY. *Mol Immunol*. 2021; 135:183–190. doi:10.1016/j.molimm.2021.03.008.

Leiva CL, Gallardo MJ, Casanova N, Terzolo H, Chacana P. Tecnologia IgY (anticorpos da gema de ovo) na medicina humana: Uma revisão de patentes e ensaios clínicos. *Int Imunofarmacol*. 2020 abr;81:106269. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106269. Epub 6 de fevereiro de 2020. PMID: 32036273.

León E, Ortiz V, Pérez A, Téllez J, Díaz GJ, Ramírez H MH, Contreras R LE. Produção de anticorpos policlonais IgY Anti-SpCas9 para uso em pesquisa com CRISPR. *ACS*

Omega. 6 de setembro de 2023; 8(37):33809-33818. doi: 10.1021/acsomega.3c04273. PMID: 37744827; PMCID: PMC10515394.

León-Núñez D, Vizcaíno-López MF, Escorcía M, Correa D, Pérez-Hernández E, Gómez-Chávez F. Anticorpos IgY como Bioterapêutica na Biomedicina. *Anticorpos (Basel)*. 29 de setembro de 2022; 11(4):62. doi: 10.3390/antib1040062. PMID: 36278615; PMCID: PMC9590010.

Leow CH, etc. Tecnologia IgY: produção e aplicação de anticorpos contra gema de ovo: conhecimento básico para uma prática bem-sucedida. Cham: Springer; 2021. p. 173–193.

Li X, et al. Produção e características de um novo anticorpo de gema de ovo de galinha (IgY) contra patógenos associados à periodontite. *J Microbiol Oral*. 2020; 12(1):1831374. doi:10.1080/20002297.2020.1831374.

Liu J, He Q, Wang W, Zhou B, Li B, Zhang Y, Luo C, Chen D, Tang J, Yu X. Preparação e eficácia neutralizadora de anticorpos IgY levantados contra o veneno de *Deinagkistrodon acutus*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017 Abr 4;23:22. doi: 10.1186/s40409-017-0112-0. PMID: 28396683; PMCID: PMC5379703.

Lopes CA, de Faria LS, de Sousa JEN, Borges IP, Ribeiro RP, Bueno LL, Rodrigues Ávila VM, Ferreira Júnior Á, Costa-Cruz JM. A imunoglobulina Y *anti-Ascaris seu* como uma nova ferramenta biotecnológica para o diagnóstico da ascariase humana. *J Helminthol*. 14 de agosto de 2019; 94:e71. doi: 10.1017/S0022149X19000701. PMID: 31409433.

Lv T, Xie X, Diao L, Jiang S, Ding Y, Yuan X, Gong L, Chen X, Zhang W, Cao Y. A imunoglobulina Y (IgY) específica de *Leptospira* é protetora em hamsters infectados. *Vacina*. 10 de maio de 2024; 42(13):3220-3229. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.04.010. Epub 2024 18 de abr. PMID: 38641497.

Mantovani, S. A. S. e outros. Desigualdades socioeconômicas e infecção pelo vírus da hepatite A em crianças amazônicas do oeste do Brasil: distribuição espacial e fatores associados. *BMC Doenças Infecciosas*, v. 15, n. 1, p. 428, 16 dez. 2015.

Michelchen, S., Micheel, B., & Hanack, K. (2020). Abordagem de imunização in vitro para gerar anticorpos monoclonais IgG murinos específicos. No bioRxiv. Laboratório de Cold Spring Harbor. <https://doi.org/10.1101/2020.11.24.393728>

Moosavi M, Rahimi S, Karimi Torshizi MA, Zahraei Salehi T, Ashrafi Tamai I, Grimes J. Avaliação in vitro do potencial inibitório de anticorpos específicos da gema do ovo induzidos por diferentes antígenos da *Salmonella Typhimurium*. *Poult Sci*. 2025 1º de outubro; 104(12):105934. doi: 10.1016/j.psj.2025.105934. Epub antes da impressão. PMID: 41072089; PMCID: PMC12547218.

Mudili V, Makam SS, Sundararaj N, Siddaiah C, Gupta VK, Rao PVL. Um novo sistema híbrido IgY-Aptamer para detecção econômica de SEB e sua avaliação em amostras de alimentos e clínicas. *Sci Rep*. 2015 Out 19;5:15151. doi: 10.1038/srep15151. Retratação em: *Sci Rep*. 2022 29 de junho; 12(1):10939. doi: 10.1038/s41598-022-15433-x. PMID: 26477645; PMCID: PMC4609960.

Mutombo PN, Man NWY, Nejsun P, Ricketson R, Gordon CA, Robertson G, Clements ACA, Chacón-Fonseca N, Nissapatorn V, Webster JP, McLaws ML. Diagnóstico e resistência a medicamentos de infecções por helmintos transmitidos pelo solo no solo:

uma perspectiva de saúde pública. *Parasitol adv.* 2019;104:247-326. doi: 10.1016/bs.apar.2019.02.004. Epub 2 de abril de 2019. PMID: 31030770.

Najdi S, Nikbakht Brujeni G, Sheikhi N, Chakhkar S. Desenvolvimento de imunoglobulinas Y (*IgYs*) *anti-Helicobacter pylori*, em codornas. *Resolução Veterinária Iran J* Primavera 2016; 17(2):106-110. PMID: 27822235; PMCID: PMC5090139.

Nie W, Zhao C, Guo X, Sun L, Meng T, Liu Y, Song X, Xu K, Wang J, Li J. Preparação e identificação de imunoglobulinas de gema de ovo de galinha contra o enterovírus humano 71 para diagnóstico da doença mão-pé-e-boca. *Bioquímica Anal.* 15 de maio de 2019;573:44-50. doi: 10.1016/j.ab.2019.02.029. Publicado em formato eletrônico 1º de março de 2019. PMID: 30831098.

Organização Mundial da Saúde. Ebola (2021). Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/ebola>. (Acessado em 18 de agosto de 2025).

Ozkan B, Budama-Kilinc Y, Cakir-Koc R, Mese S, Badur S. Aplicação de um bioconjugado de fosfatase Y-alcalina imunoglobulina como ferramenta diagnóstica para o vírus influenza A. *Bioengenharia*. dezembro de 2019; 10(1):33-42. doi: 10.1080/21655979.2019.1586054. PMID: 30913952; PMCID: PMC6527078.

Pacheco BLB, Nogueira CP, Venancio EJ. Anticorpos IgY de Aves: Uma Análise sobre Afinidade e Avidéz. *Animais (Basiléia)*. 7 de outubro de 2023; 13(19):3130. doi: 10.3390/ani13193130. PMID: 37835736; PMCID: PMC10571861.

Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. Anticorpos da gema de ovo (IgY) e suas aplicações na saúde humana e veterinária: uma revisão. *Int Imunofarmacol.* 2019 Ago;73:293-303. doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.015. Epub 22 de maio de 2019. PMID: 31128529; PMCID: PMC7106195.

Qi S, Wang J, Le T, Sun C, Chang J, Jiang Z, Yin X, Pang Q. Desenvolvimento de um ELISA competitivo pan-genotípico baseado em anticorpos monoclonais para a detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina. *Imunol frontal.* 25 de novembro de 2024;15:1504115. doi: 10.3389/fimmu.2024.1504115. PMID: 39654880; PMCID: PMC11625775.

Qiu H, Jin X, Zhang X, Chen K, Wang L, Huang J. Purificação das Imunoglobulinas de Gema de Ovo (IgY), Aumento de Atividade e Potenciais Benefícios para a Saúde Humana. *Nutrientes*. 6 de setembro de 2025; 17(17):2890. doi: 10.3390/nu17172890. PMID: 40944278; PMCID: PMC12430573.

Qiu HL, et al. Aplicação de anticorpos IgY na imunização passiva de animais de aquicultura. *Fisioterapia Frontal.* 2025;16:1701782. doi:10.3389/fphys.2025.1701782.

Rezaeifard M, Solhi R, Mohammadi M, Abbasi E, Aminian M. Produção de anticorpos policlonais IgY contra toxina diftérica e avaliação de seu efeito neutralizador por ensaio de células Vero. *BMC Biotechnol.* 12 de maio de 2021; 21(1):34. doi: 10.1186/s12896-021-00694-7. PMID: 33980219; PMCID: PMC8117566.

Sampaio LC, Baldissera MD, Grando TH, Gressler LT, Capeleto Dde M, de Sa MF, de Jesus FP, dos Santos AG Jr, Anciuti AN, Colonetti K, Stainki DR, Monteiro SG. Produção, purificação e potencial terapêutico de anticorpos da gema de ovo para tratamento da infecção por *Trypanosoma evansi*. *Veterinário Parasitol.* 29 de agosto de

2014; 204(3-4):96-103. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.05.032. Epub 28 de maio de 2014. PMID: 24916342.

Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Anticorpos da gema de ovo de galinha (tecnologia IgY): uma revisão do progresso na produção e uso em pesquisa e medicina humana e veterinária. *Altern Lab Anim*. 2005 Abr; 33(2):129-54. doi: 10.1177/026119290503300208. PMID: 16180988.

Schade R, Hlinak A. Anticorpos contra Gema de Ovo, Estado da Arte e Perspectivas Futuras. *ALTEX*. 1996; 13(5):5-9. PMID: 11178463.

Schwartz FA, Christophersen L, Thomsen K, Baekdal S, Pals Bendixen M, Jørgensen M, Bull Rasmussen IK, Laulund AS, Høiby N, Moser C. Chicken IgY reduz o risco de infecções urinárias por *Pseudomonas aeruginosa* em um modelo murino. *Microbiol frontal*. 2022 9 de set; 13:988386. doi: 10.3389/fmicb.2022.988386. PMID: 36160201; PMCID: PMC9505517.

Sert M, Cakir Koc R, Budama Kilinc Y. Novo anticorpo Igy marcado com Fitc: Imagem de fluorescência de *Toxoplasma gondii* in vitro. *Sci Rep*. 2017 Apr 12; 7(1):852. doi: 10.1038/s41598-017-00930-1. PMID: 28404997; PMCID: PMC5429814.

Shulha JA, Escalante P, Wilson JW. Abordagens farmacoterapêuticas em infecções por micobactérias não tuberculosas. *Mayo Clin Proc*. 2019 Ago; 94(8):1567-1581. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.12.011. Epub 1º de junho de 2019. PMID: 31160063.

Silva ROE, Almeida MEM, Marialva EF, Balieiro AADS, Castro DP, Rios-Velasquez CM, Mariúba LAM, Pessoa FAC. Ovos de galinha como ferramenta de vigilância para a presença de vetores de malária e leishmaniose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019 16 de maio; 52:e20180415. doi: 10.1590/0037-8682-0415-2018. PMID: 31141051.

Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. Anticorpos da gema de ovo (IgY) e suas aplicações na saúde humana e veterinária: uma revisão. *Int Immunofarmacol*. 2019 Ago;73:293-303. doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.015. Epub 22 de maio de 2019. PMID: 31128529; PMCID: PMC7106195.

Somasundaram R, Choraria A, Antonysamy M. Uma abordagem para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais IgY contra a proteína spike (S) do SARS CoV-2 usando o método de exibição de fagos: uma revisão. *Int Immunofarmacol*. 2020 Ago;85:106654. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106654. Epub 3 de junho de 2020. PMID: 32512271; PMCID: PMC7266779.

Souza DC, de Faria LS, Sousa JEN, Lopes CA, Ribeiro VDS, da Silva VJ, Ribeiro RP, Rabelo ÉML, Rodrigues Ávila VM, Ferreira Júnior Á, Costa-Cruz JM. Uso de anticorpos policlonais IgY para detectar complexos imunes séricos em pacientes com infecção ativa por ancilostomia. *Parasitologia*. maio de 2020; 147(6):715-720. doi: 10.1017/S0031182020000220. Epub 2020 13 de fev. PMID: 32051048; PMCID: PMC10317617.

Sudjarwo, S. A.; Indriyani, W.; Sudjarwo, G. W. Proteína de produção e caracterização da imunoglobulina Y específica anti-HIV para imunoterapia. *J. Appl. Pharm. Sci*, v. 4, n. 11, p. 30–34, 2014.

Sudjarwo SA, Eraiko K, Sudjarwo GW, Koerniasari. A potência da imunoglobulina da gema de ovo de galinha (IgY) específica como imunoterapia para a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. *J Adv Pharm Technol Res*. 2017 Jul-Set; 8(3):91-96. doi: 10.4103/japtr. JAPTR_167_16. PMID: 28795022; PMCID: PMC5527699.

Tabll AA, Shahein YE, Omran MM, Hussein NA, El-Shershaby A, Petrovic A, Glasnovic M, Smolic R, Smolic M. Anticorpos monoclonais IgY: avanços e limitações para aplicações de imunodiagnóstico e imunoterapia. As vacinas avançadas são imunógrafas. 25 de julho de 2024;12:25151355241264520. doi: 10.1177/25151355241264520. PMID: 39071998; PMCID: PMC11273732.

Teimoori S, Arimatsu Y, Laha T, Kaewkes S, Sereerak P, Sripa M, Tangkawattana S, Brindley PJ, Sripa B. Coproantígenos à base de IgY de frango capturam ELISA para diagnóstico de opintequiase humana. *Parasitol Int*. 2017 Ago; 66(4):443-447. doi: 10.1016/j.parint.2015.10.011. Epub 29 de abril de 2016. PMID: 27140305; PMCID: PMC5086311.

Thomsen K, Christophersen LB, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Moser C, Høiby N. Anticorpos IgY *Anti-Pseudomonas aeruginosa* induzem agregação bacteriana específica e internalização em neutrófilos polimorfonucleares humanos. *Infectar Immun*. 2015; 83(7):2686–2693. doi:10.1128/IAI.02970-14.

Qui HM, et al. Anticorpos da gema do ovo de galinha (IgY) para profilaxia e tratamento da diarreia por rotavírus em neonatos humanos e animais: uma revisão concisa. *Animação de Ciência Alimentar Coreana J Anima*. 2017; 37(1):1–10. doi:10.5851/kosfa.2017.37.1.1.

QUEM. Vacina contra a dengue: documento de posição da OMS, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. (QUEM). Relatório Mundial sobre Malária, 2020b

Wang F, Qiao W, Bao B, Wang S, Regenstein J, Shi Y, Wu W, Ma M. Efeito da IgY na Periodontite e Halitose Induzidas por *Fusobacterium nucleatum*. *J Microbiol Biotechnol*. 28 de fevereiro de 2019; 29(2):311-320. doi: 10.4014/jmb.1810.10044. PMID: 30609885.

Wang X, Song L, Tan W, Zhao W. Eficácia clínica da imunoglobulina oral Y na enterite por rotavírus infantil: revisão sistemática e meta-análise. *Medicina (Baltimore)*. julho de 2019; 98(27):e16100. doi: 10.1097/MD.00000000000016100. PMID: 31277110; PMCID: PMC6635298.

Wang Z, Ge S, Meng L, Gao F, Xie Y, Zhang X (2020) O Parvovírus Canino é diagnosticado e neutralizado pelo scFv IgY da gema de ovo de galinha expresso em células CRFK. *Vírus* 12(12):1417. <https://doi.org/10.3390/v12121417>.

Wang H, Zhong Q, Lin J. Anticorpo contra gema de ovo para imunização passiva: status, desafios e perspectivas. *J Química Agroalimentar*. 2023; 71(13):5053–5061. doi:10.1021/acs.jafc.2c07094.

Wu, J. e outros. O cartão de detecção usado para detectar rápida e quantitativamente o anticorpo sérico contra o sarampo é composto por cartolina de detecção e tiras de teste de detecção, incluindo carcaça, placa plástica, adesivo sensível à pressão, almofada de amostra e almofada de etiqueta, 2018.

Wu R, Yakhkeshi S, Zhang X. Análise cientométrica e perspectiva do estudo da tecnologia IgY. *Poult Sci.* 2022 Abr; 101(4):101713. doi: 10.1016/j.psj.2022.101713. Epub 2022 10 de jan. PMID: 35150941; PMCID: PMC8844298.

Xu Y, Selerio-Poely T, Ye X. Efeitos clínicos e microbiológicos do anticorpo da gema contra *Porphyromonas gingivalis* como complemento no tratamento da periodontite crônica moderada a grave: um ensaio clínico randomizado controlado por placebo. *J Periodontal Implant Sci.* 2018 27 de fev; 48(1):47-59. doi: 10.5051/jpis.2018.48.1.47. PMID: 29535890; PMCID: PMC5841267.

Yakhkeshi S, Isah MB, Sadeghi-Abandansari H, Zhang X. Avanços no design e estratégias de administração de formas de dosagem de anticorpos IgY: Status atual e perspectiva futura. *Int J Biol Macromol.* 2025 abr;300:140291. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.140291. Epub 2025 23 de jan. PMID: 39863212.

Yakhkeshi S, Wu R, Chelliappan B, Zhang X. Tendências na industrialização e comercialização da tecnologia IgY. *Imunol frontal.* 2022 Out 20;13:991931. doi: 10.3389/fimmu.2022.991931. PMID: 36341353; PMCID: PMC9630564.

Zhang L, et al. Efeitos da alimentação com anticorpos da gema de ovo de galinha na apoptose das células intestinais, estresse oxidativo e flora microbiana da tilápia (*Oreochromis niloticus*) infectada com *Streptococcus agalactiae*. *Imunológico de Peixes e Frutos do Vivo.* 2024;150:109596. doi:10.1016/j.fsi.2024.109596.

Zhang, X.; Vieira-Pires, R. S.; Xu, L. Desenvolvimento da tecnologia IgY: uma perspectiva histórica. In: *Tecnologia IgY: Produção e Aplicação de Anticorpos de Gema de Ovo*. [s. l.]: Publicação Internacional Springer, 2021. p. 3-14. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-72688-1_1.

Zhang X, Wu R, Chelliappan B. Investigação e compreensão proteômica sobre purificação IgY e desenvolvimento de produtos. *Poult Sci.* 2023; 102(8):102843. doi:10.1016/j.psj.2023.102843.

Zhang Y, Wei Y, Li Y, Wang X, Liu Y, Tian D, Jia X, Gong R, Liu W, Yang L. Os anticorpos IgY contra o vírus Ebola possuem proteção pós-exposição em um modelo de desafio de pseudovírus murino e excelente termostabilidade. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021 12 de mar; 15(3):e0008403. doi: 10.1371/journal.pntd.0008403. PMID: 33711011; PMCID: PMC7990235.

Zhou X, Ma S. Anticorpos anti-lipopolissacarídeos da gema do ovo aumentam a fagocitose dos fagócitos de mamíferos. *Biol Open.* 2018; 7(6):bio032821. doi:10.1242/bio.032821.

4. CAPÍTULO II

Neste capítulo são apresentados os resultados da avaliação do potencial terapêutico de anticorpos IgY produzidos contra peptídeos sintéticos derivados de enteropatógenos, por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, foi investigada a capacidade de reconhecimento dos anticorpos anti-P1 e anti-P8 frente a diferentes bactérias de importância clínica, incluindo *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC), enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigênica (ETEC) e *Salmonella* spp., utilizando a citometria de fluxo como ferramenta para avaliação da interação entre anticorpos e células bacterianas.

Em seguida, foram realizados ensaios microbiológicos para investigar a atividade funcional dos anticorpos sobre os microrganismos, incluindo testes de difusão em ágar, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e acompanhamento do crescimento bacteriano. Esses experimentos permitiram avaliar a possível atividade bacteriostática e bactericida dos anticorpos frente às cepas bacterianas estudadas.

Por fim, foi avaliado o potencial protetor dos anticorpos IgY em modelo experimental murino de infecção por *Shigella*, por meio do acompanhamento clínico diário dos animais tratados e dos respectivos grupos controles. A análise conjunta dos resultados obtidos possibilita discutir a capacidade de reconhecimento dos anticorpos, seus efeitos sobre o crescimento bacteriano e sua contribuição para a atenuação da evolução clínica da infecção, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias de imunoterapia passiva baseadas na tecnologia IgY.

Informações sobre o artigo

Título do artigo: “Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* potential of peptide-derived IgY antibodies against enteropathogenic bacteria”

Situação: a ser submetido.

Revista: A ser definida.

Avaliação do potencial *in vitro* e *in vivo* de anticorpos IgY derivados de peptídeos contra bactérias enteropatogênicas.

Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* potential of peptide-derived IgY antibodies against enteropathogenic bacteria

Letícia Coelho da Cruz ¹, Juliane Corrêa Glória ^{3,5}, Caio Coutinho de Souza ¹, Jehovanna Victoria Marín Salgado ⁶, Luis André Moraes Mariúba ^{1,2,3,4,5}

¹ Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC-UFAM), Manaus, AM, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Imunologia básica e aplicada, Universidade Federal do Amazonas (PPGIBA-UFAM), Manaus, AM, Brazil

³ Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ), Manaus, AM, Brazil

⁴ Programa de Pós-graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ), Manaus, AM, Brazil

⁵ INCT-CONEXÃO BIO3TOX- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Pesquisa e Excelência do Conhecimento da Amazônia Ocidental/Oriental em Biodiversidade, Biotecnologia, Biometeorologia e Toxicologia Aplicada à Uma saúde, Fiocruz Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

⁶ Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil

Corresponding author: Luis André Moraes Mariúba. Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ), Rua Teresina, 476, Adrianópolis, CEP 69057-070, Manaus, AM, Brazil.

Phone: +55 92 3621-2323. Email: andre.mariuba@fiocruz.br

RESUMO

A crescente resistência aos antimicrobianos e a elevada incidência de infecções causadas por enteropatógenos evidenciam a necessidade do desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas. Nesse contexto, os anticorpos IgY destacam-se como uma abordagem promissora de imunoterapia passiva devido à sua elevada especificidade, segurança e facilidade de obtenção. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de anticorpos IgY produzidos contra peptídeos sintéticos derivados de bactérias

enteropatogênicas por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, foi investigada a capacidade de reconhecimento dos anticorpos anti-P1 e anti-P8 frente às cepas de *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC), enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigênica (ETEC) e *Salmonella* por citometria de fluxo. Em seguida, foram realizados ensaios de difusão em ágar, determinação da concentração inibitória mínima e acompanhamento do crescimento bacteriano para avaliar sua atividade antimicrobiana. Por fim, foi empregado um modelo murino de infecção por *Shigella* para investigar o potencial protetor da imunoterapia passiva. Os resultados demonstraram que ambos os anticorpos foram capazes de reconhecer as diferentes bactérias avaliadas, porém não apresentaram atividade bacteriostática ou bactericida nas condições experimentais testadas. No modelo *in vivo*, observou-se uma tendência de proteção nos animais tratados com o anticorpo anti-P1, evidenciada pela melhora dos parâmetros clínicos em comparação ao grupo infectado não tratado. Em conjunto, os achados sugerem que os anticorpos IgY exercem seu efeito principalmente por mecanismos distintos da inibição direta do crescimento bacteriano e reforçam seu potencial como estratégia complementar para o controle de infecções causadas por enteropatógenos, justificando a realização de estudos adicionais para elucidar seus mecanismos de ação e confirmar sua eficácia.

Palavras-chave: Imunidade passiva; IgY; Doenças diarreicas; Enteropatógenos.

ABSTRACT

The increasing resistance to antimicrobials and the high incidence of infections caused by enteropathogens highlight the need for the development of alternative therapeutic strategies. In this context, IgY antibodies stand out as a promising approach to passive immunotherapy due to their high specificity, safety, and ease of obtaining them. This study aimed to evaluate the potential of IgY antibodies produced against synthetic peptides derived from enteropathogenic bacteria through *in vitro* and *in vivo* assays. Initially, the recognition capacity of anti-P1 and anti-P8 antibodies against diffusely adherent (DAEC), enteroinvasive (EIEC), enterotoxigenic (ETEC) and *Salmonella* spp. strains was investigated by flow cytometry. Subsequently, agar diffusion assays, determination of the minimum inhibitory concentration, and monitoring of bacterial growth were performed to evaluate their antimicrobial activity. Finally, a murine model of *Shigella* infection was contracted to investigate the protective potential of passive immunotherapy. The results demonstrated that both antibodies were able to target the different bacteria evaluated but did not show bacteriostatic or bactericidal activity under the experimental conditions tested. In the *in vivo* model, a protective trend was observed

in animals treated with the anti-P1 antibody, evidenced by the improvement in clinical parameters compared to the untreated infected group. Taken together, the findings suggest that IgY antibodies exert their effect mainly through mechanisms other than direct prevention of bacterial growth and reinforce their potential as a complementary strategy for controlling infections caused by enteropathogens, justifying further studies to elucidate their mechanisms of action and confirm their effectiveness.

Keywords: Passive immunity; IgY; Diarrheal diseases; Enteropathogens.

1. INTRODUÇÃO

As doenças diarreicas permanecem entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, especialmente em crianças menores de cinco anos, idosos, indivíduos imunocomprometidos e animais de produção. Apesar dos avanços nas medidas de saneamento básico, vacinação e terapia de reidratação oral, infecções causadas por bactérias, vírus e protozoários continuam representando um importante problema de saúde pública e econômica, sobretudo em países de baixa e média renda (Kelly, 2011; Bohles; Busch; Hensel, 2014).

Entre os principais agentes etiológicos destacam-se *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, rotavírus, norovírus e *Shigella* spp., responsáveis por episódios de diarreia aguda associados a elevadas taxas de hospitalização, mortalidade infantil e perdas produtivas na medicina veterinária (Kelly, 2011).

O tratamento convencional dessas infecções baseia-se principalmente na reposição hidroeletrólítica e, quando necessário, na utilização de antimicrobianos. Entretanto, o uso indiscriminado desses fármacos tem favorecido o surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana, considerada atualmente um dos maiores desafios para a saúde pública mundial. Dessa forma, cresce o interesse pelo desenvolvimento de estratégias alternativas capazes de prevenir ou controlar infecções entéricas sem promover pressão seletiva sobre microrganismos resistentes (Karthikeyan et al., 2022).

Nesse contexto, destaca-se a imunização passiva oral utilizando imunoglobulina Y (IgY), principal anticorpo presente na gema de ovos de galinhas imunizadas. A IgY é funcionalmente equivalente à IgG dos mamíferos e apresenta inúmeras vantagens biotecnológicas, como elevada produção em ovos, baixo custo de obtenção, método não

invasivo de coleta, alta especificidade antigênica, estabilidade durante o armazenamento e ausência de interação com receptores Fc e proteínas do sistema complemento de mamíferos, reduzindo reações inespecíficas. Além disso, sua produção atende aos princípios éticos dos 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement), por dispensar sangrias repetidas nos animais produtores (Xu et al., 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que anticorpos IgY específicos são capazes de neutralizar patógenos entéricos por diferentes mecanismos, incluindo bloqueio da adesão bacteriana ao epitélio intestinal, neutralização de toxinas, inibição da colonização e redução da carga infecciosa. Em modelos experimentais *in vivo*, a administração oral de IgY específica reduziu significativamente a incidência, a gravidade e a duração da diarreia causada por diferentes agentes infecciosos, evidenciando potencial tanto profilático quanto terapêutico (Diraviyam et al., 2014).

Além dos resultados obtidos em animais de produção, estudos envolvendo rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigênica e outros enteropatógenos demonstram que a imunoterapia passiva baseada em IgY constitui uma estratégia promissora para aplicação tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. Entretanto, aspectos relacionados à estabilidade da IgY no trato gastrointestinal, à formulação farmacêutica, à padronização das doses e aos protocolos de administração ainda necessitam de maior investigação para viabilizar sua ampla utilização clínica (Thu et al., 2017; Karthikeyan et al., 2022).

Uma revisão sistemática com metanálise realizada por Diraviyam et al. (2014) avaliou 61 estudos experimentais e concluiu que a administração de IgY promove redução significativa da ocorrência de diarreia em diferentes espécies animais, reforçando seu potencial como alternativa aos antibióticos. Os autores destacam, contudo, a necessidade de estudos experimentais mais robustos e metodologicamente padronizados para consolidar as evidências disponíveis.

Diante desse cenário, a avaliação *in vivo* do uso de anticorpos IgY como moléculas para proteção e tratamento contra doenças diarreicas representa uma importante linha de pesquisa, uma vez que pode contribuir para o desenvolvimento de terapias inovadoras, seguras e eficazes, além de reduzir a dependência do uso de antimicrobianos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia de

anticorpos IgY na prevenção e no tratamento de doenças diarreicas, gerando evidências experimentais que possam subsidiar futuras aplicações clínicas e biotecnológicas.

2. METODOLOGIA

2.1 Aspectos éticos

Para a produção dos anticorpos IgY utilizados neste estudo, foram empregadas galinhas da linhagem Dekalb White (*Gallus gallus domesticus*). A obtenção das aves, bem como os procedimentos de imunização e coleta dos ovos, foi realizada previamente pela empresa EzScience Biotecnologia, seguindo os protocolos estabelecidos pela empresa.

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas, entre 6-8 semanas de idade, obtidos e mantidos em condições convencionais no Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A autorização para o uso de animais neste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) do INPA sob o número de protocolo CONCEA/MCTI/0203172020/PESQUISA/000001/2025 conforme o documento no anexo 1.

Todos os procedimentos experimentais com os animais seguiram as normas relativas à utilização humanitária de animais com a finalidade em pesquisa, regulamentado pelo inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais.

2.2 Solubilização dos peptídeos

Os peptídeos utilizados foram selecionados em estudos anteriores realizados por nossa equipe (PARDO, 2016; CLORIVES, 2019). Estes foram solubilizados de acordo com sua carga elétrica, conforme a tabela 1 (PARDO, 2016). Logo, os peptídeos P1, P2, P4, P9, P10 por apresentarem uma estrutura menor que seis aminoácidos, foram diluídos em 1 mL de água ultrapura livre de RNase. Os demais peptídeos apresentam uma estrutura maior que seis aminoácidos. O peptídeo P8 que possui carga positiva foi diluído em solução aquosa de ácido acético a 10%. Para diluição dos peptídeos P5 e P11, que possuem carga negativa, foi utilizado solução aquosa de bicarbonato de amônio a 10%. Por fim, para os peptídeos P3, P7 e P12, por serem considerados de carga neutra, foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo adicionado 1 mL do solvente. A concentração final dos peptídeos foi estabelecida em 2 mg/mL.

Tabela 1: Informações dos peptídeos.

Código	Antígeno	Sequência	Solvente
P1	OmpC	LNRYDERYIG	Água
P2	OmpA	AQAAPKDNTWYT	Água
P3	OmpA	GAFGGYQVNPY	DMSO
P4	OmpA	PYKGDNINGAYK	Água
P5	OmpA	TGVSPVFAGGVEYAITPE	Bicarbonato de amônio
P7	FimH	GSAYGGVLSN	DMSO
P8	FimH	TVKYSGSSYP	Ácido acético
P9	FimH	VSSAGGVA	Água
P10	FimH	NNYNSD	Água
P11	FimH	ANNDVVVPTG	Bicarbonato de amônio
P12	FimH	SLGAVGTSAY	DMSO

2.3 Imunização de aves

Para a realização das imunizações nos animais experimentais, foram utilizadas duas aves *Gallus gallus* da linhagem Dekalb White, onde inicialmente, “pools” de peptídeos foram preparados de acordo com seus solventes. No “pool 1” continha os peptídeos P1, P2, P4, P9 e P10, nos quais são solúveis em água. O “pool 2” continha os peptídeos P3, P7 e P12, solúveis em DMSO, P5 e P11 solúveis em bicarbonato de amônio e o peptídeo P8, solúvel em ácido acético. Todos foram acoplados em nanotubo de carbono (NTC) solubilizado e ativado para servir como molécula carreadora, método o qual foi padronizado por nosso grupo sob patente de número INPI BR 10 2018 0719335. Para ocorrer a ligação do carreador a cada peptídeo pré-determinado, foram utilizados 245µL de nanotubo de carbono (NTC) solubilizado e ativado com 2,5µL de 50 mM NHS (N-hidroxissuccinimida) e 2,5µL de EDC (Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) a 57 mg/mL. Posteriormente, os inóculos foram preparados utilizando 250µL para os peptídeos diluídos em água, com 250 µL de adjuvante Montanide. Para os peptídeos diluídos nos demais solventes, foi utilizado 150µL para 150µL de adjuvante de Montanide.

A homogeneização do inóculo foi realizada em vórtex até atingir a consistência de uma emulsão, que não se dispersa na água. Em seguida, a inoculação via intramuscular foi realizada distribuindo a dose da seringa contendo os peptídeos solubilizados em três pontos diferentes do músculo peitoral das galinhas poedeiras, em doses semanais, por um total de 7 semanas. Para monitoramento de resposta imune humoral, oito coletas de sangue foram realizadas, a partir da veia ulnar, do início das imunizações (D0) e uma semana após cada inoculação.

2.4 Avaliação de resposta humoral aviária

O procedimento para visualizar a resposta imune humoral das aves foi realizado através do imunoensaio “dot blot” (DB), visando avaliar a capacidade de reconhecimento dos IgY aos peptídeos utilizados na etapa de imunização. Para isso, os peptídeos foram imobilizados em membrana de nitrocelulose utilizando o sistema “Bio-Dot 96-Well Microfiltration” (Bio-rad). Sendo assim, 1,6 µl de cada peptídeo diluído em água foi adicionado na linha A, e na linha B foi adicionado 1,3 µl dos peptídeos diluídos nos demais solventes (ácido acético, DMSO e bicarbonato de amônio), todos solubilizados em PBS 1X filtrado para um volume final de 1 mL (figura 12) (concentração final de 16 µg/mL). Em seguida, os poços foram bloqueados com tampão PBS+BSA 3% (tampão de bloqueio), preparado com água MiliQ por 30min. Posteriormente, foi feita a lavagem dos 16 poços utilizados, com PBS-Tween 0,1% para que, posteriormente, fosse adicionado 50 µl dos soros das aves (primário) diluídos em tampão de bloqueio na concentração de 1:250, correspondendo às 7 imunizações realizadas e o soro das galinhas antes das inoculações, por 1h em temperatura ambiente. Como secundário, foi adicionado anticorpo anti-chicken ligado à peroxidase de rabanete (SIGMA ALDRICH) diluído a 1:10.000 em tampão de bloqueio, por 30min. Os poços foram lavados novamente, a membrana retirada do sistema e revelada com o cromógeno DAB (Diaminobenzidina-3,3) + H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) + PBS 1X por cerca de 5-10 min.

Um segundo “dot blot” foi realizado imobilizando em poços distintos os peptídeos P1 à P8 na membrana de nitrocelulose já hidratada com água MilliQ. Para o experimento, os peptídeos foram imobilizados nas membranas de nitrocelulose (concentração final de 16 µg/mL) utilizando o sistema “Bio-Dot 96-Well Microfiltration” (Bio-rad). Em seguida, ao sistema foi adicionado uma solução de bloqueio PBS 1X acrescida com 3% de BSA (Bovin Serum Albumin) por 30 minutos

em temperatura ambiente. Posteriormente, o soro dos animais reativos no primeiro DB foi diluído em solução de bloqueio a 1:500 e adicionados ao sistema e incubados durante 60 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, o sistema foi lavado com PBS 1X + Tween 0,1% e o anticorpo anti-chicken ligado à peroxidase de rabanete (SIGMA ALDRICH) a 1:10.000 foi adicionado ao sistema e mantido sob incubação por 30 minutos. Após esse período, o sistema foi lavado com PBS 1X + Tween 0,1% e para prosseguir-se com a revelação conforme descrito anteriormente. O parâmetro de detecção considerado foi a presença/ausência de precipitação de coloração marrom como indício de detecção positiva/negativa dos anticorpos produzidos.

2.5 Extração de anticorpos

A extração dos anticorpos IgY foi realizada segundo o método de precipitação utilizando Polietileno Glicol (PEG) (Pauly *et al.*, 2011). A gema obtida dos ovos das galinhas imunizadas foi separada da clara através de filtro de papel qualitativo e a essa foi adicionado PBS (phosphate buffered saline) duas vezes o seu volume. Para a retirada de sólidos e gordura da gema, separação dos anticorpos IgY e outras proteínas, foram utilizados 3,5 % de PEG 6000. O sistema foi agitado por 10 minutos em vórtex seguido de centrifugação a 4°C por 20 min/13.000 x g para filtragem do sobrenadante. Foram adicionados ao novo volume 8,5 % de PEG 6000, seguido de agitação em vórtex por 10 minutos e centrifugação a 4 °C por 20 min/13.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet solubilizado em 1 mL de PBS e esse teve o volume completado com PBS para 10 mL. A esse volume foi adicionado 12% de PEG 6000 seguidos de nova agitação e centrifugação como já descrito. O pellet foi solubilizado em 800 µL de PBS e agitado outra vez em vórtex por 10 minutos. Diálise em solução salina de 0,1 % -1,6 % a 4 °C, seguido da determinação da concentração (Bradford) e estocagem do produto a -20 °C também foram efetuadas. A fim de atestar a qualidade desse procedimento e a pureza do anticorpo, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para que pudesse iniciar a avaliação dos anticorpos através de métodos imunológicos.

2.6 Determinação do reconhecimento de IgY por citometria de fluxo

O anticorpo IgY foi avaliado quanto ao reconhecimento dos antígenos de EHEC, EIEC, EPEC, ETEC, DAEC, *Shigella dysenteriae* e *Samonella enteretidis*. Essa etapa envolveu a preparação das bactérias um dia antes para posterior marcação com os

anticorpos IgY. Para isso, as células bacterianas foram pré-inoculadas em meio líquido LB a 37 °C / 18 horas sob agitação constante para a utilização no dia posterior.

Após esse período e a partir de espectrofotometria (600 nm), foram preparadas em microtubos as suspensões celulares referentes a cada bactéria citada, de concentração 1×10^5 UFC/mL⁻¹ as quais foram submetidas a lavagens por centrifugação em 14.000 rpm por 5 minutos a 4 °C com PBS 1x com BSA 0,5%, sempre descartando o sobrenadante. O painel do experimento foi constituído em seis condições: C1 (bactéria + brometo + anticorpo p1 + 2° anti-chicken), C2 (bactéria + brometo + anticorpo p8 + 2° anti-chicken), C3 (só bactéria), C4 (bactéria + 2° anti-chicken), C5 (bactéria + brometo) e C6 (bactéria + brometo + 2° anti-chicken). Em cada microtubo foram inseridos 5 µl de bactéria + 95 µl de PBS 1x e apenas os microtubos C1, C2, C5 e C6 foram corados com 8 µl de brometo de etídeo (concentração final de 0,016 mg/mL) que foram para incubação durante 30 min em temperatura ambiente, no escuro e nos demais microtubos foi adicionado PBS 1x.

Após outras lavagens com 300 µl de PBS 1x + BSA 0,5%, os microtubos com as bactérias presentes no tubo C1 e C2 foram então incubadas com o anticorpo IgY e os demais com PBS 1x + BSA 0,5% a temperatura ambiente por 1 hora em um termomixer, seguida de lavagens e descarte do sobrenadante para adição do anticorpo secundário anti-chicken (produzido em cabra) Alexa fluor 488 (Invitrogen, Oregon, USA) 1:400 (PBS 1x) nos tubos C1, C2, C4 e C6 e incubação por mais 30 minutos também em um termomixer. Após outro processo de lavagens com PBS 1x filtrado, uma ressuspensão de 200 µL foi transferida para tubos de citometria de fluxo. A capacidade opsonizante do IgY foi avaliada pelo equipamento de citometria de fluxo FAC's canto II no ILMD/Fiocruz-Amazônia, a partir dos programas FAC's Diva software versão 6.1.2. Os dados brutos, a análise de porcentagem de eventos, média de intensidade de fluorescência e a formatação dos gráficos de citometria, foram obtidos a partir do programa Flow-Jo versão 5.6.7.

2.7 Avaliação *in vitro* e *in vivo* dos anticorpos IgY desenvolvidos

2.7.1 Cepas Bacterianas

Cepas de *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae* e *Escherichia coli* (EHEC, ETEC, EIEC, EPEC, DAEC) pertencentes a bacterioteca da Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (RPT11H), e XL1-Blue provenientes do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-Amazônia) foram cultivadas em meio líquido Luria bertani (LB) a 37°C por 24 horas sob agitação constante. Os testes foram realizados na Fundação de

Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, onde ficam localizados os laboratórios da plataforma do Instituto.

2.7.2 Antibiograma

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão em ágar, segundo Grove e Randall (1995), com modificações segundo Bastos et al (2022).

Utilizou-se o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (AMH) (HIMEDIA) para a realização dos testes. Após esterilização do AMH, o meio foi distribuído 15 mL do meio de cultura AMH em placas de petri estéreis de 90 x 15 mm. As placas foram mantidas em temperatura ambiente até solidificar.

O processo de estriamento das placas iniciou-se logo após o preparo dos inóculos. Para isso, foi inserido um swab estéril em cada um dos diferentes tubos contendo os diferentes inóculos. Após tal procedimento, os microrganismos alvos foram semeados em toda a superfície da placa em três direções, girando a placa aproximadamente a 60° com o objetivo de assegurar distribuição uniforme do inóculo.

Para a aplicação dos anticorpos P1 e P8, foram confeccionados orifícios no meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, após o período de incubação foi feita a medição dos halos de inibição. Como controle positivo de atividade antimicrobiana, foi utilizado o antibiótico Imipinem associado à cilastatina sódica, na concentração de 62,5 µg/mL.

2.7.3 Concentração inibitória mínima com bactérias (CIM)

Os valores de CIM foram determinados utilizando o método de microtitulação em placa de 96 poços, de acordo com CLSI (2024), com modificações. Cada poço recebeu o inóculo bacteriano padronizado, as quais foram avaliadas nas concentrações de 0,75 a 0,37 µg/mL.

Na segunda etapa, foram adicionados 50 µl de BHI em todos os 96 poços, sendo que nos primeiros foram adicionados mais 50 µL dos anticorpos P1 e P8, completando um volume de 100 µL, em seguida foi feita uma diluição de ½ até o segundo poço e no último poço retirou-se e descartou-se 50 µL.

Posteriormente, foi adicionado 25 µL de inóculo bacteriano e 25 µL de resazurina a 0,01%. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Além disso, como controle positivo foi utilizado o antibiótico Imipinem + cilastatina sódica (TIENAM) e foi testado nas mesmas concentrações dos anticorpos.

A CIM foi definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento bacteriano, indicado pela permanência da coloração azul a resazurina.

2.7.4 Avaliação *in vivo* da capacidade de inibição de invasão

Antes dos procedimentos experimentais, os camundongos balb/C foram transferidos para a sala de experimentação e mantidos em isolamento por um período de duas semanas, para que houvesse adaptação da microflora dos animais de acordo com o ambiente a qual estiveram expostos. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em microisoladores autoclaváveis, e alimentados com ração e água esterilizadas (por autoclave a 121C°). Foram mantidos até 7 animais por microisolador. A limpeza ocorreu com uma frequência de 2 vezes na semana com a troca da maravalha e microisoladores por outros previamente esterilizados.

A infecção e testes de tratamento foram realizados em camundongos da linhagem balb/c fêmeas, de 6-8 semanas, para avaliar a atividade *in vivo* do efeito protetor do anticorpo de IgY específico para *Shigella flexneri* (M90T). O patógeno a ser selecionado para essa etapa foi o que apresentou melhor resultado de reconhecimento nos ensaios de citometria e ensaios de inibição de invasão *in vitro*. Inicialmente, foi determinada a dose letal da bactéria, sendo uma concentração em 10^{10} a ser analisada através de inoculações orais, assim como realizado por Rubens (2018) com modificações.

A partir deste resultado, grupos de camundongos foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos com 7 (sete) animais em cada: (G1) camundongos não expostos à infecção (grupo controle); (G2) grupo tratado apenas com PBS; (G3) grupo de camundongos tratados com IgY P1 específico; (G4) grupo de camundongos tratados com IgY P8 inespecífico (tabela 2). Os grupos G2 à G4 foram submetidos ao desafio com a bactéria *Shigella flexneri* M90T. Os parâmetros clínicos de cada camundongo foi monitorado diariamente cinco dias antes e durante o desafio.

Tabela 2: Delineamento experimental para avaliação *in vivo*.

GRUPO	TRATAMENTO	DESAFIO COM <i>SHIGELLA FLEXNERI</i> M90T	N (CAMUNDONGOS)
1	Controle	Não	7
2	PBS	Sim	7
3	IgY P1 específico	Sim	7
4	IgY P8 inespecífico	Sim	7

Para observar essa capacidade de inibição da invasão bacteriana, os camundongos pertencentes aos grupos tratados com os anticorpos (grupo 3 (IgY P1) e grupo 4 (IgY P8))

receberam, como pré-tratamento, uma dose diária de 250 µL (correspondendo a 4 mg por animal) do respectivo anticorpo por via oral, utilizando agulha de gavagem, durante cinco dias consecutivos antes do desafio bacteriano. Os anticorpos utilizados nessa etapa foram previamente liofilizados, obtendo-se aproximadamente 28 mg de cada preparação, e posteriormente ressuspensos em 1,75 mL de água Milli-Q estéril, para que contemplassem os sete animais de cada um dos dois grupos. No sexto dia, após jejum hídrico e alimentar de quatro horas, os animais foram desafiados com 300 µL de uma suspensão de *Shigella flexneri* administrada por gavagem. Após o desafio, os grupos tratados continuaram recebendo diariamente 250 µL na concentração de 16 µg/µL dos respectivos anticorpos durante os três dias subsequentes, nas mesmas condições empregadas no período de pré-tratamento. O grupo 1 e grupo 2 receberam 250 µL de PBS 1× filtrado, tanto durante o período de pré-tratamento quanto após o desafio bacteriano, seguindo o mesmo esquema experimental.

2.8 Análise estatística (software graph pad-prism 5.0)

Para avaliar a evolução do peso corporal dos animais, os dados de peso foram primeiramente transformados em variação percentual em relação ao peso do Dia 0 para cada animal, utilizando a fórmula $((\text{Peso_Dia_X} - \text{Peso_Dia_0}) / \text{Peso_Dia_0}) * 100$. Esta abordagem permitiu padronizar as comparações independentemente do peso inicial de cada indivíduo. A média e o desvio padrão dessas variações percentuais foram calculados para cada grupo em cada dia de experimento.

Para investigar a existência de diferenças significativas entre os grupos ao longo do tempo, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) de uma via para cada dia de experimento (Dia 0 ao Dia 4) sobre os valores de variação percentual de peso. O teste ANOVA determina se existe uma diferença estatisticamente significativa entre as médias de três ou mais grupos. Um p-valor inferior a 0.05 foi considerado como indicador de significância estatística.

Quando a ANOVA revelou uma diferença significativa ($p < 0.05$) para um determinado dia, foi subsequentemente aplicado um teste post-hoc de Tukey HSD (Honestly Significant Difference). Este teste permite realizar comparações múltiplas entre todos os pares de grupos, ajustando para o erro tipo I e identificando especificamente quais pares de grupos diferem significativamente entre si. Um p-valor ajustado inferior a 0.05 no teste de Tukey HSD foi utilizado como critério para declarar

uma diferença estatística entre os pares de grupos. Os animais com dados ausentes devido a óbito ou eutanásia foram excluídos das análises do respectivo dia.

Para avaliar diferenças nos scores totais de sintomas entre os grupos experimentais ao longo do tempo, os dados brutos de sintomas foram reestruturados para calcular o score total diário de sintomas para cada animal, somando-se os *scores* individuais dos seis sintomas para cada dia. Casos de óbito ou eutanásia foram excluídos dos cálculos diários para evitar vieses.

Para identificar dias com diferenças significativas entre os grupos, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) de uma via para cada dia experimental (Dia 0 a Dia 4). Quando a ANOVA revelou um p-valor inferior a 0.05, indicando uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, um teste post-hoc de Tukey HSD foi subsequentemente aplicado. Este teste permitiu identificar quais pares específicos de grupos apresentavam diferenças significativas no *score* total de sintomas, com um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0.05$). Os resultados forneceram *insights* sobre a eficácia dos tratamentos com IgY anti-P1 e anti-P8 em comparação com os grupos controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Acompanhamento da resposta humoral

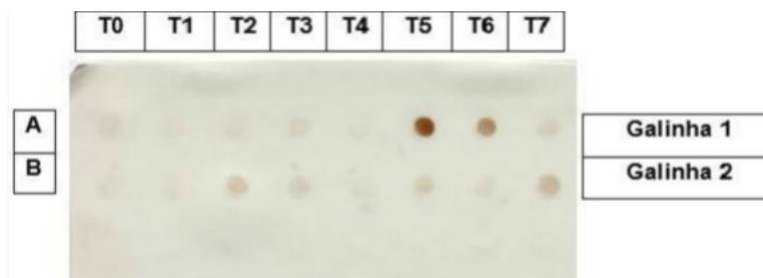
O acompanhamento da resposta imune humoral IgY detectável no soro das aves imunizadas com os peptídeos sintéticos foi realizado por imunoensaio dot-blot. Na figura 11, pode-se observar a membrana contendo o pool de peptídeos utilizados durante as imunizações. Na linha A, foi imobilizado o “pool 1” de peptídeos em cada poço, sendo colocado em contato com o soro da “galinha 1” imunizada em diferentes tempos de coleta. Foi possível observar uma maior reatividade no “tempo 5” (T5), correspondente ao 35º dia de coleta, obtido após a 4ª imunização.

Na linha B da figura 9, foi imobilizado o “pool 2” de peptídeos em cada poço, sendo colocado em contato com o soro da “galinha 2” imunizada em diferentes tempos de coleta. Foi observado uma maior reatividade no “tempo 7” (T7), correspondente ao 49º dia de coleta, obtido após a 6ª imunização. Foi observado ainda uma reatividade nos tempos T2, T3 e T5, porém em menor intensidade que o T7.

Para maior compreensão, o T0 (tempo 0) é o soro da galinha, obtido através da coleta de sangue, antes de iniciar as imunizações e T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7, são as coletas realizadas após uma semana da imunização subsequente, totalizando sete imunizações. O “pool 1” refere-se aos peptídeos diluídos em água, sendo utilizado para o experimento, 1,6 µl em cada poço e o “pool 2” são os peptídeos diluídos em DMSO, ácido acético e

bicarbonato de amônio, sendo utilizados 1,3 µl em cada poço. Antes do contato do soro aos peptídeos, houve uma etapa de bloqueio, necessária para evitar ligações inespecíficas no processo.

Figura 9: Dot-Blot da resposta humoral da ave sem imunização e das sete imunizações. Na linha A está presente o “pool 1” e linha B o “pool 2” de peptídeos. Em cada coluna foi colocado como primário soro de diferentes tempos de coleta dos animais imunizados.



Para melhor entendimento da resposta humoral produzida pelos animais experimentais, um segundo “dotblot” foi realizado imobilizando os peptídeos individualmente em cada poço do ensaio. Na figura 10, os peptídeos P1, P2, P4, P9 e P10 foram colocados em contato com o soro correspondente a “galinha 1”, tempo T5, sendo observada uma maior reatividade contra P1. As marcações detectadas em P9 e P10 também foram observadas no teste controle não contendo o soro do animal, correspondendo, portanto, a uma reatividade do imunoensaio causada pelo reconhecimento inespecífico do anticorpo secundário ao peptídeo imobilizado.

Na figura 11, os peptídeos P3, P7, P12, P5, P11 e P8 foram colocados em contato com o soro correspondente a “galinha 2”, tempo T7, sendo observada uma reatividade específica contra P8. As marcações detectadas em P3, P7, P12, P5 e P11 também foram observadas no teste controle não contendo o soro do animal, correspondendo, portanto, a uma reatividade do imunoensaio causada pelo reconhecimento inespecífico do anticorpo secundário ao peptídeo imobilizado.

Figura 10: “Dotblot” utilizando os peptídeos do “pool 1” e soro da “galinha 1” como anticorpo primário. Em cada coluna foi adicionada um peptídeo individualmente (P1, P2, P4, P9 e P10). Na linha A está presente o soro do animal após a 4ª imunização; na linha B está o soro negativo; na linha C está sem a presença do primário (soro da galinha).

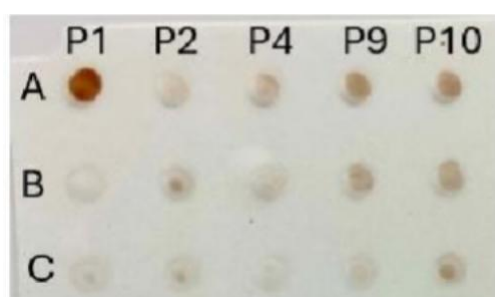
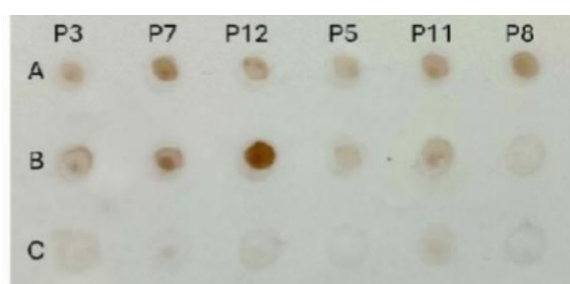


Figura 11: “Dotblot” utilizando os peptídeos do “pool 2” e soro da “galinha 2” como anticorpo primário. Em cada coluna foi adicionada um peptídeo individualmente (P3, P7, P12, P5, P11 e P8). Na linha A está presente o soro do animal após a 4ª imunização; na linha B está o soro negativo; na linha C está sem a presença do primário (soro da galinha).



A estrutura do sistema da figura 10 deu-se da seguinte maneira: na linha A o soro da galinha utilizado foi o obtido a partir da 4ª imunização, na linha B o soro negativo, ou seja, antes de iniciar as imunizações, e na linha C, o soro da ave (primário) não está presente. O mesmo ocorreu na figura 11, contudo, na linha A foi usado o soro da galinha obtido da 6ª imunização.

Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo corroboram trabalhos que demonstram elevada eficiência da imunização de aves na produção de IgY específicos contra diferentes enteropatógenos. León-Núñez et al. (2022), por exemplo, demonstraram que IgY produzidos contra enterotoxinas de *Escherichia coli* mantiveram elevada atividade neutralizante e capacidade de inibir o crescimento bacteriano *in vitro*. Da mesma forma, Han et al. (2021) demonstraram que anticorpos IgY específicos contra ETEC foram capazes de reduzir a adesão bacteriana às células epiteliais intestinais e promover proteção em modelo experimental murino, evidenciando que uma resposta humoral robusta representa o primeiro passo para o sucesso da imunoterapia passiva.

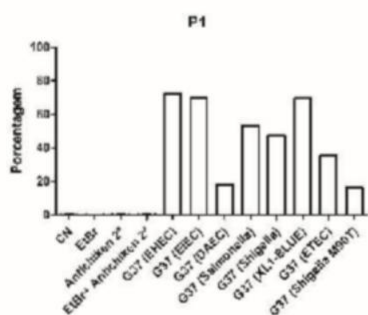
Nesse contexto, a confirmação da produção de anticorpos específicos observada no Dot-blot fornece o suporte biológico para os experimentos subsequentes realizados nesta dissertação. A elevada resposta humoral obtida permitiu a realização dos ensaios de reconhecimento antigênico por citometria de fluxo, da avaliação funcional por difusão em ágar e concentração inibitória mínima, culminando posteriormente na investigação do potencial protetor dos anticorpos em modelo murino. Dessa forma, os resultados demonstram que os peptídeos sintéticos selecionados foram capazes de induzir uma resposta humoral consistente, constituindo a base para as atividades biológicas observadas nas etapas seguintes do estudo.

3.2 Reconhecimento de IgY por citometria de fluxo

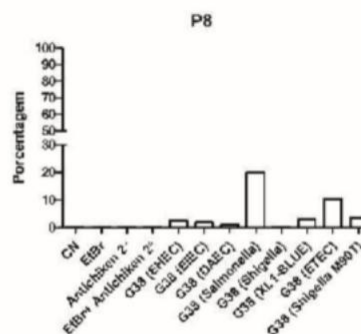
Com a análise através da porcentagem (%) de positividade e a média de intensidade de fluorescência (MFI), foi possível realizar o procedimento de citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-P1 e anti-P8 (figura 12).

Figura 12: Gráfico da citometria de fluxo do anticorpo P1 e P8. **(A)** Porcentagem de células fluorescentes na amostra P1. **(B)** Porcentagem de células fluorescentes na amostra P8. **(C)** Intensidade média de fluorescência (*Mean Fluorescence Intensity* – MFI) na amostra P1. **(D)** Intensidade média de fluorescência (MFI) na amostra P8. Os grupos experimentais incluem os controles (CN, EBF, anti-chicken e EBF + anti-chicken) e os diferentes isolados bacterianos representativos dos patótipos de *Escherichia coli* diarreiogênica e *Shigella*. Os valores estão expressos como porcentagem de células fluorescentes ou intensidade média de fluorescência.

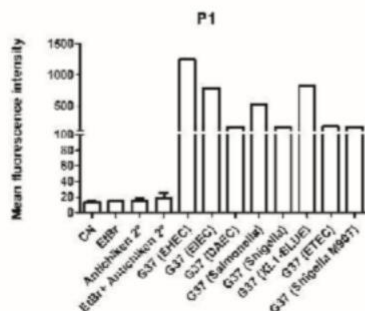
(A)



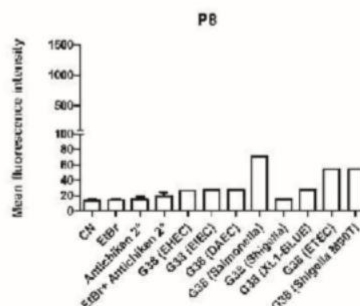
(B)



(C)



(D)



Dessa forma, a capacidade de reconhecimento dos anticorpos produzidos contra os peptídeos sintéticos P1 e P8 foi avaliada por citometria de fluxo utilizando diferentes cepas bacterianas como analisado na imagem anterior. Foram analisados dois parâmetros: a porcentagem de células fluorescentes, que representa a proporção de bactérias reconhecidas pelos anticorpos, e a intensidade média de fluorescência (MFI), que reflete a intensidade da ligação antígeno-anticorpo.

Os anticorpos obtidos a partir da imunização com o peptídeo P1 apresentaram elevada reatividade frente às cepas bacterianas avaliadas. Os maiores valores de MFI foram observados para as cepas EHEC, EIEC e XL1-BLUE, indicando que, além de reconhecerem uma elevada proporção de bactérias, os anticorpos anti-P1 produziram sinais fluorescentes mais intensos nessas cepas. A cepa de *Salmonella* apresentou intensidade intermediária, enquanto as demais bactérias exibiram valores inferiores, porém ainda acima dos controles. Em conjunto, esses resultados demonstram que os anticorpos gerados contra o peptídeo P1 reconhecem eficientemente antígenos presentes na superfície de diferentes enterobactérias, evidenciando amplo perfil de reatividade.

Por outro lado, os anticorpos produzidos contra o peptídeo P8 apresentaram perfil de reconhecimento consideravelmente inferior. A análise da porcentagem de células fluorescentes revelou baixos índices de marcação para praticamente todas as cepas avaliadas, sendo observada maior reatividade apenas para *Salmonella*, com aproximadamente 20% de células fluorescentes. As demais bactérias apresentaram

porcentagens reduzidas, frequentemente próximas aos valores observados nos controles negativos, indicando limitada capacidade de reconhecimento pelos anticorpos anti-P8.

A intensidade média de fluorescência obtida para os anticorpos anti-P8 também foram substancialmente inferiores à observada para os anticorpos anti-P1. Embora *Salmonella*, ETEC e *Shigella flexneri* M90T tenham apresentado valores discretamente superiores aos controles, os níveis de fluorescência permaneceram reduzidos em todas as cepas analisadas quando comparados aos obtidos para os anticorpos anti-P1. Esse comportamento indica que o peptídeo P8 induziu uma resposta humoral com menor capacidade de reconhecimento das bactérias intactas avaliadas.

A comparação entre os dois peptídeos demonstra diferenças marcantes no perfil de reconhecimento dos anticorpos produzidos. Enquanto os anticorpos anti-P1 apresentaram elevadas porcentagens de células fluorescentes associadas, em várias cepas, a altos valores de intensidade média de fluorescência, os anticorpos anti-P8 exibiram baixa frequência de células positivas e reduzida intensidade de marcação. Em conjunto, esses resultados sugerem que o epítipo representado pelo peptídeo P1 seja mais amplamente conservado e/ou mais acessível na superfície das enterobactérias avaliadas, favorecendo o reconhecimento pelos anticorpos. Em contraste, o epítipo correspondente ao peptídeo P8 pode apresentar menor conservação entre as espécies analisadas, menor exposição na superfície bacteriana ou menor capacidade de induzir anticorpos com elevada eficiência de reconhecimento.

Esses achados reforçam que a escolha do epítipo influencia diretamente a qualidade da resposta humoral induzida. O desempenho superior observado para o peptídeo P1 sugere maior potencial para aplicações que dependam do reconhecimento de bactérias intactas, hipótese que foi posteriormente explorada por meio dos ensaios de difusão em ágar, os quais permitiram avaliar se o maior reconhecimento observado por citometria também se traduziria em atividade funcional dos anticorpos.

3.3 Análise do antibiograma

Para este experimento não existe um padrão sobre o nível aceitável para determinar a eficácia de uma membrana, logo, utilizou-se como critério para a determinação de atividade antimicrobiana a presença de halo de inibição igual ou superior a 5 milímetros, de acordo com Al-Hebshi et al (2006) e Ostrosky et al (2008) (Tabela 3).

Tabela 3: Critério de avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.

Diâmetro	Resultado
Acima de 20	Boa atividade
Entre 15 e 20 mm	Moderada atividade
Entre 5 e 15 mm	Pouca atividade
Ausência do halo	Inativo

Os anticorpos foram testados frente a oito cepas bacterianas (DAEC, EHEC, EIEC, ETEC, EPEC, *Salmonella*, *Shigella* e XL1-blue), não apresentando halos de inibição em nenhuma delas. Contudo, há necessidade de repetir os ensaios com a cepa *Salmonella*, a fim de confirmar os resultados, uma vez que foi observada uma discreta redução no crescimento das colônias ao redor do halo. Esse achado pode sugerir uma possível ação bacteriostática, o que torna pertinente uma investigação mais detalhada, especialmente por se tratar de anticorpos (tabela 4).

Tabela 4: Atividade antibacteriana pelo método de difusão ágar.

Amostras	P1	P8	Imipenem
DAEC	-	-	35mm
ETEC	-	-	36mm
EIEC	-	-	40mm
EHEC	-	-	36mm
XL1-Blue	-	-	43mm
<i>Shigella</i>	-	-	40mm
<i>Salmonella</i>	-	-	35mm

Embora os anticorpos IgY não atuem por mecanismos bactericidas semelhantes aos dos antibióticos convencionais, sua ligação a proteínas de membrana externa ou adesinas pode bloquear funções essenciais relacionadas à adesão ao epitélio intestinal, formação de biofilmes e interação com o hospedeiro. Estudos demonstram que anticorpos específicos direcionados contra os fatores de virulência reduzem significativamente a capacidade de colonização bacteriana, mesmo sem provocar lise celular direta (Han et al., 2021).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os peptídeos capazes de induzir maior reconhecimento por citometria também apresentaram maior potencial para

promover inibição do crescimento bacteriano. Essa relação reforça que a eficiência funcional dos anticorpos depende, inicialmente, de sua capacidade de reconhecer epítomos conservados e acessíveis na superfície dos microrganismos.

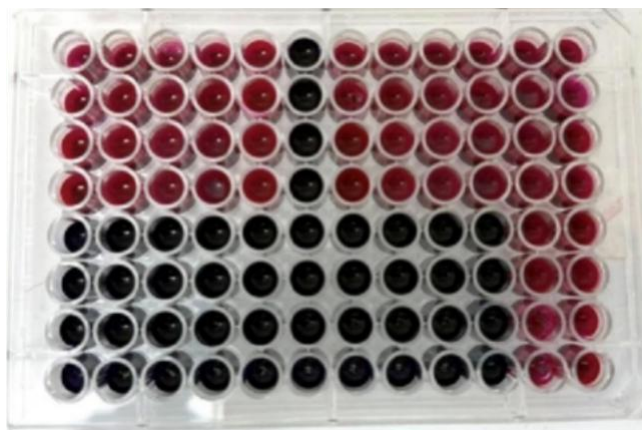
Além disso, a diferença observada entre os peptídeos evidencia que a localização e a função biológica do antígeno utilizado na imunização influenciam diretamente o desempenho dos anticorpos produzidos, reforçando a importância da seleção racional de epítomos para aplicações imunoterapêuticas.

3.4 Análise concentração inibitória mínima com bactérias (CIM)

Para analisar a concentração inibitória mínima, utilizamos o equipamento Glomax para realizar as leituras das placas de 96 poços, conforme descrito anteriormente. Foram realizadas oito leituras a cada 1 hora e após 24 horas e 48 horas, para que fosse possível observar a mudança tanto visual do crescimento bacteriano quanto através do equipamento.

Foi possível perceber uma diferença visual na coloração das placas a partir da 5ª leitura. A partir dessa leitura já foi possível concluir que a bactéria não estava mais inibindo seu crescimento diante da presença do anticorpo P1 e P8, apresentando uma coloração rosa, o que significa a presença e o crescimento da bactéria (figura 13). Os anticorpos foram testados frente a quatro cepas bacterianas (DAEC, ETEC, EIEC e *Salmonella*) e não apresentaram atividades significativas.

Figura 13: Placa do experimento de concentração inibitória mínima.

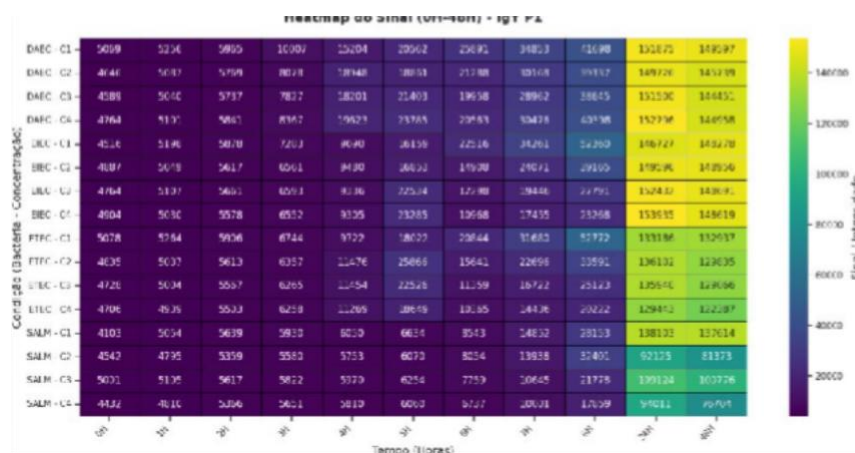


A partir desse experimento, também é possível obter gráficos tanto com o anticorpo P1 quanto com o P8 para observar a atividade de crescimento de cada bactéria e consequentemente visualizar se o anticorpo apresenta alguma atividade em inibir o crescimento de alguma delas (Figura 14).

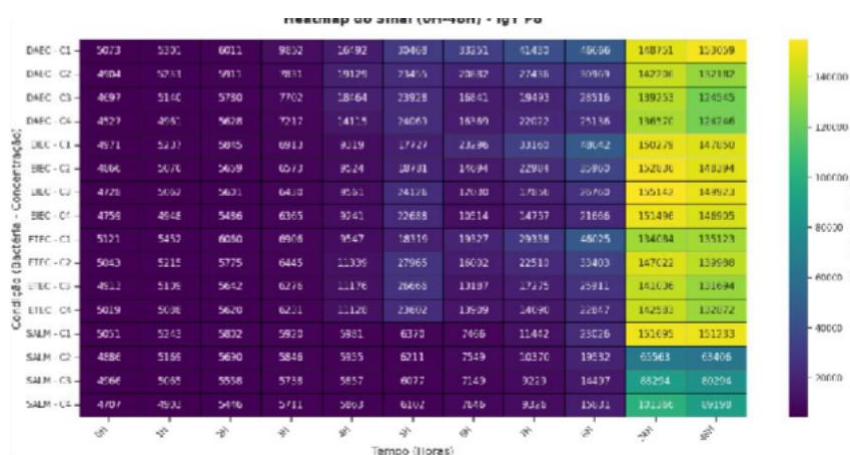
Figura 14: Gráfico de evolução do crescimento bacteriano. (A) crescimento bacteriano contendo o anticorpo IgY P1. (B) crescimento bacteriano contendo o anticorpo IgY P8. (C) crescimento bacteriano sem

IgY (controle). A figura apresenta três heatmaps que ilustram a evolução do sinal/intensidade associado ao crescimento bacteriano das cepas de *Escherichia coli* diarreiogênicas (DAEC, EIEC e ETEC) e *Salmonella* spp. ao longo de 48 horas de incubação (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 e 48 horas). Os heatmaps correspondem aos tratamentos com IgY produzido a partir do Pool 1 (IgY P1), IgY produzido a partir do Pool 8 (IgY P8) e ao controle sem IgY. Para cada bactéria foram avaliadas quatro concentrações bacterianas (C1–C4), enquanto o controle sem IgY apresenta a curva representativa de crescimento de cada microrganismo. A escala de cores representa a intensidade do sinal obtido no ensaio, em que tons escuros (roxo) indicam menor intensidade e, consequentemente, menor crescimento bacteriano, enquanto tons claros (verde/amarelo) indicam maior intensidade do sinal e maior crescimento bacteriano. Os valores numéricos inseridos em cada célula correspondem à intensidade do sinal registrada em cada ponto experimental.

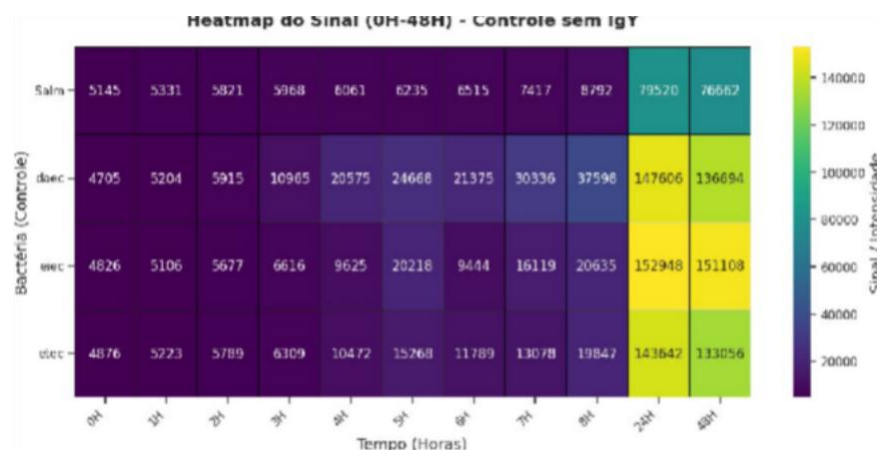
(A)



(B)



(C)



A determinação da concentração inibitória mínima complementou os resultados obtidos na citometria de fluxo e no ensaio de difusão em ágar, permitindo quantificar a eficiência biológica dos anticorpos produzidos. A CIM representa a menor concentração de anticorpos capaz de impedir o crescimento visível das bactérias, constituindo um parâmetro importante para estimar seu potencial terapêutico.

Os menores valores de CIM observados para determinados peptídeos indicam maior eficiência funcional dos anticorpos, uma vez que concentrações reduzidas foram suficientes para exercer efeito inibitório sobre os microrganismos avaliados. Esses resultados são consistentes com o elevado reconhecimento observado na citometria de fluxo e com os halos de inibição observados no ensaio de difusão em ágar, sugerindo uma correlação entre afinidade pelos antígenos e atividade biológica, mesmo que pouca, já que nos gráficos de crescimento bacteriano apresentado é possível observar que não houve influência do anticorpo IgY em nenhuma das condições testadas.

Por outro lado, os peptídeos que apresentaram maiores valores de CIM também demonstraram menor reconhecimento na citometria e menor atividade no ensaio de difusão em ágar, indicando que diferenças na exposição ou conservação dos epítomos podem influenciar diretamente a eficácia dos anticorpos produzidos.

Diversos estudos demonstram que anticorpos IgY específicos são capazes de reduzir a proliferação bacteriana, impedir a adesão às células intestinais e diminuir a colonização por enteropatógenos, reforçando o potencial da imunização passiva como estratégia complementar ao uso de antimicrobianos convencionais (Han et al., 2021; El-Kafrawy et al., 2023).

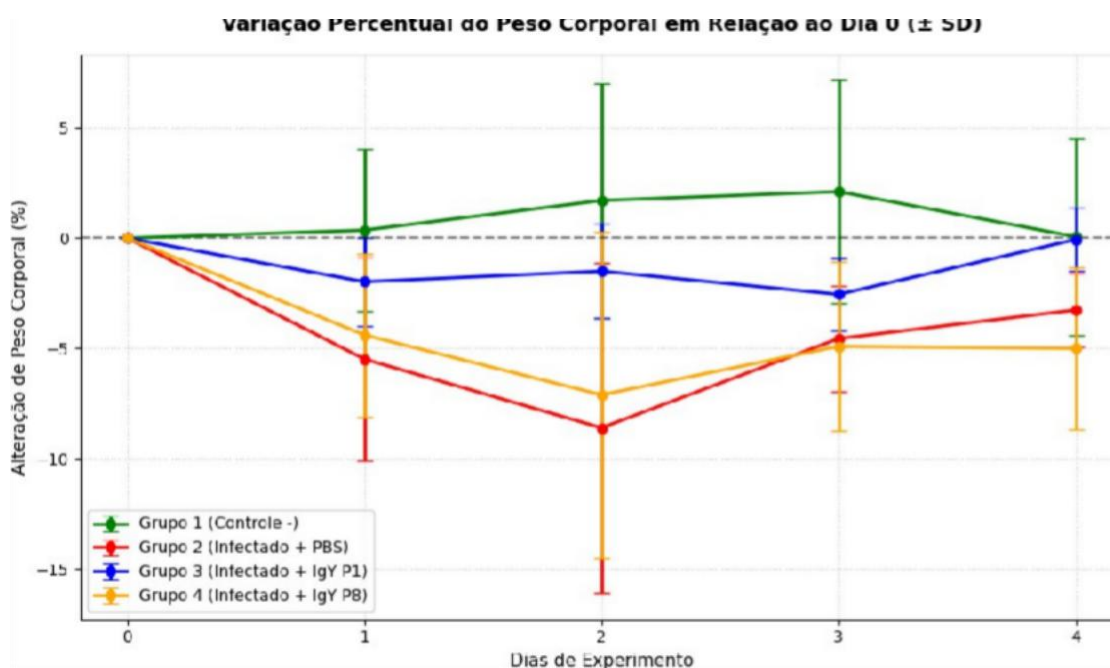
3.5 Avaliação *in vivo* da IgY

Após a confirmação da produção de anticorpos IgY específicos e de sua capacidade de reconhecimento dos antígenos bacterianos, foi realizada a avaliação *in vivo* da capacidade de inibição da invasão bacteriana, com o objetivo de investigar o potencial protetor desses anticorpos em modelo experimental murino. Para essa etapa, foram avaliados quatro grupos experimentais, constituídos por sete animais cada, os quais foram acompanhados diariamente durante todo o período experimental, conforme o delineamento descrito na metodologia.

Durante o acompanhamento, foram monitorados parâmetros clínicos previamente estabelecidos, incluindo peso corporal, aspecto das fezes, postura, atividade locomotora, grau de desidratação, aspecto da pelagem e alterações oculares (Anexo 2). Na figura 15 é

possível observar a variação percentual média do peso corporal conforme os dias do experimento.

Figura 15: Variação percentual média ($\pm$ desvio padrão) do peso corporal de camundongos em relação ao Dia 0, durante 5 dias de experimento, para os Grupos 1 (Controle -), 2 (Infectado + PBS), 3 (Infectado + IgY P1) e 4 (Infectado + IgY P8). A linha pontilhada horizontal em 0% indica o peso corporal basal (Dia 0).

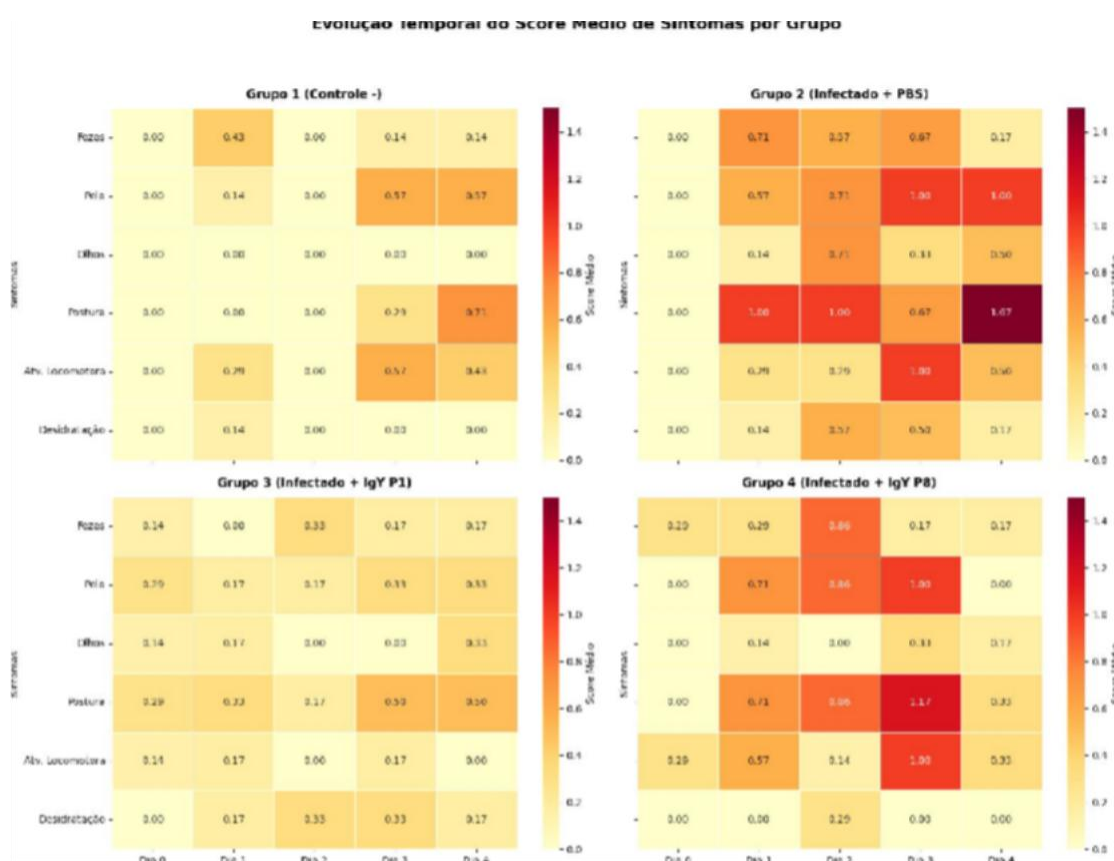


Um teste ANOVA de uma via revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no Dia 2 ($p < 0.05$), Dia 3 ($p < 0.05$) e Dia 4 ($p < 0.05$). Testes post-hoc de Tukey HSD indicaram as seguintes diferenças significativas: No Dia 2, o Grupo 1 (Controle negativo) foi significativamente diferente do Grupo 2 (Infectado + PBS). No Dia 3, o Grupo 1 (Controle negativo) foi significativamente diferente do Grupo 2 (Infectado + PBS) e do Grupo 4 (Infectado + IgY P8). É importante notar que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para o Grupo 3 (Infectado + IgY P1) em comparação com qualquer outro grupo em nenhum dos dias analisados pelos testes de Tukey HSD (p -ajustado > 0.05).

Cada parâmetro foi avaliado diariamente por meio de uma escala de escores variando de 0 a 4 (conforme o anexo 2), na qual valores crescentes correspondiam ao aumento da intensidade das alterações clínicas observadas, no qual foi possível organizar heatmaps (figura 16), onde no Dia 1, o Grupo 3 (Infectado + IgY P1) não apresentou diferença estatisticamente significativa com nenhum dos outros grupos. No Dia 4, o Grupo 3

(Infectado + IgY P1) apresentou uma diferença estatisticamente significativa em comparação com o Grupo 2 (Infectado + PBS) ($p\text{-adj} = 0.0137$). Não houve diferença significativa com o Grupo 1 (Controle negativo) nem com o 'Grupo 4 (Infectado + IgY P8)'. Assim, apenas o Grupo 3 mostrou uma diferença estatística apenas com o Grupo 2 no Dia 4.

Figura 16: Evolução Temporal do Score Médio de Sintomas por Grupo Experimental. O gráfico apresenta quatro heatmaps que ilustram a evolução do score médio de seis sintomas (Fezes, Pelo, Olhos, Postura, Atividade Locomotora e Desidratação) ao longo de cinco dias (Dia 0 a Dia 4) para diferentes grupos experimentais. Os scores variam de 0 a 2, com cores mais intensas (vermelho/laranja) indicando scores médios mais elevados e cores mais claras (amarelo) indicando scores médios mais baixos. Os grupos experimentais são: Grupo 1 (Controle -), animais não infectados; Grupo 2 (Infectado + PBS), animais infectados tratados com PBS (controle); Grupo 3 (Infectado + IgY P1), animais infectados tratados com imunoglobulina Y do pool 1; e Grupo 4 (Infectado + IgY P8), animais infectados tratados com imunoglobulina Y do pool 8. Animais que foram a óbito ou eutanasiados são representados nos dias subsequentes e não são considerados no cálculo da média para aquele dia.



Dessa forma, durante o período de acompanhamento, foram observadas alterações nos parâmetros clínicos avaliados, com intensidade variável entre os grupos experimentais. Os animais pertencentes ao grupo controle negativo (grupo 1) permaneceram clinicamente estáveis durante todo o período experimental. De maneira

geral, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros clínicos avaliados, incluindo aspecto das fezes, postura, atividade locomotora, grau de desidratação, aspecto da pelagem e alterações oculares, os quais permaneceram predominantemente com escore 0 durante o acompanhamento. O peso corporal apresentou pequenas variações entre os dias de avaliação, compatíveis com a variação fisiológica esperada para os animais, sem evidências de comprometimento clínico. Esses resultados demonstram a manutenção das condições gerais de saúde dos animais e corroboram a ausência de infecção ou de efeitos adversos relacionados ao protocolo experimental.

Nos animais pertencentes ao grupo infectado (Grupo 2), observou-se maior frequência de alterações clínicas ao longo do período experimental, embora a maioria permanecesse dentro da faixa de escores leves a moderados, também houve um óbito de um dos animais. Se observou uma discreta redução do peso corporal nos primeiros dias de acompanhamento, com recuperação parcial em parte dos animais ao final do experimento. No grupo infectado tratado com IgY P1 (Grupo 3), a maior parte dos animais apresentou alterações clínicas discretas durante o acompanhamento, mantendo escores baixos para a maioria dos parâmetros avaliados. Entretanto, um dos animais evoluiu para óbito no primeiro dia experimental. Cabe ressaltar que esse animal já apresentava condições clínicas comprometidas no dia inicial do acompanhamento, incluindo baixo peso corporal e escores elevados para alguns parâmetros clínicos.

E por fim, no grupo tratado com IgY P8 (Grupo 4), a maioria dos animais também apresentaram alterações clínicas predominantemente leves. Contudo, um animal apresentou agravamento progressivo do quadro clínico, caracterizado pela perda acentuada de peso e aumento dos escores clínicos, sendo submetido à eutanásia conforme os critérios de desfecho humanitário estabelecidos no protocolo experimental.

Esses resultados são coerentes com os achados obtidos nos experimentos *in vitro*. A elevada capacidade de reconhecimento observada na citometria de fluxo, especialmente para os anticorpos produzidos contra o peptídeo P1, demonstra que esses anticorpos reconhecem eficientemente antígenos presentes na superfície bacteriana. Da mesma forma, os resultados obtidos no ensaio de difusão em ágar e na determinação da concentração inibitória mínima evidenciaram que esses anticorpos também apresentam atividade funcional, sendo capazes de interferir no crescimento bacteriano. Em conjunto, esses resultados sugerem que o reconhecimento eficiente dos antígenos bacterianos constitui um requisito importante para que os anticorpos exerçam efeito protetor durante a infecção experimental.

Embora um animal do grupo tratado com IgY P1 tenha evoluído para óbito e um animal do grupo tratado com IgY P8 tenha atingido os critérios de desfecho humanitário, esses eventos devem ser interpretados com cautela. No caso do grupo tratado com P1, o animal já apresentava baixo peso corporal e sinais clínicos importantes antes do início do acompanhamento, indicando condições individuais que provavelmente influenciaram sua evolução clínica. Da mesma forma, a necessidade de eutanásia de um animal tratado com P8 ocorreu de forma isolada e não refletiu o comportamento predominante do grupo, no qual a maioria dos animais apresentou apenas alterações clínicas leves. Considerando o reduzido número de animais por grupo, variações individuais podem exercer influência significativa sobre os resultados, sendo importante interpretar esses eventos dentro do contexto geral do experimento.

Estudos anteriores reforçam essa interpretação. Han et al. (2021) demonstraram que a administração oral de IgY específico contra *Escherichia coli* enterotoxigênica reduziu significativamente a colonização bacteriana intestinal, preservou a integridade da mucosa, diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e melhorou os sinais clínicos de camundongos infectados. De maneira semelhante, Shoushtari et al. (2023) observaram aumento da sobrevivência de camundongos tratados com IgY específico contra *Vibrio cholerae*, demonstrando que a imunoterapia passiva pode conferir proteção mesmo na ausência da eliminação completa do patógeno. Esses estudos corroboram a hipótese de que os anticorpos IgY atuam principalmente reduzindo a virulência bacteriana e limitando a progressão da infecção, em vez de exercer atividade bactericida direta.

Outro aspecto que deve ser considerado é que a eficácia da imunoterapia passiva depende de diversos fatores, incluindo concentração dos anticorpos administrados, momento da administração em relação ao desafio infeccioso, estabilidade dos anticorpos no trato gastrointestinal e acessibilidade dos epítomos-alvo. Como descrito por Lu et al. (2025), a degradação proteolítica dos anticorpos no ambiente gástrico representa uma das principais limitações da administração oral de IgY, razão pela qual estratégias como a microencapsulação têm sido propostas para aumentar sua estabilidade e biodisponibilidade. Dessa forma, a otimização da formulação e do protocolo de administração poderá potencializar os efeitos protetores observados neste estudo.

De maneira geral, os resultados obtidos demonstram que os anticorpos IgY produzidos a partir dos peptídeos sintéticos apresentaram potencial para atenuar as manifestações clínicas da infecção experimental, corroborando os achados observados nos ensaios *in vitro* de reconhecimento antigênico e atividade funcional. Embora sejam

necessários estudos adicionais envolvendo maior número de animais, diferentes doses, protocolos de administração e avaliação da carga bacteriana e da resposta inflamatória intestinal, os resultados obtidos reforçam o potencial da tecnologia IgY como uma estratégia promissora de imunoterapia passiva para prevenção e controle de infecções causadas por enterobactérias diarreio gênicas, especialmente diante do crescente cenário de resistência aos antimicrobianos.

Logo, neste estudo foi avaliado o potencial de anticorpos IgY produzidos contra peptídeos sintéticos derivados de enteropatógenos como estratégia de imunoterapia passiva. Os resultados demonstraram que os anticorpos anti-P1 e anti-P8 foram capazes de reconhecer diferentes espécies bacterianas, evidenciado pelos ensaios de citometria de fluxo, confirmando sua especificidade para os antígenos avaliados. Entretanto, os ensaios *in vitro* não evidenciaram atividade bacteriostática ou bactericida frente às cepas testadas, sugerindo que seu mecanismo de ação não está relacionado à inibição direta do crescimento bacteriano. No modelo experimental murino de infecção por *Shigella*, observou-se uma tendência de proteção nos animais tratados com o anticorpo anti-P1, indicando um possível efeito benéfico da imunoterapia passiva sobre a evolução da infecção. Em conjunto, os resultados reforçam o potencial da tecnologia IgY como estratégia complementar para o controle de enteropatógenos e fornecem subsídios para a continuidade das investigações, visando elucidar seus mecanismos de ação e confirmar sua eficácia em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

Beyene Dereje et al. Antibiotic utilization pattern in treatment of acute diarrheal diseases: the case of Hiwot Fana Specialized University Hospital, Harar, Ethiopia. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice*, v. 16, n. 1, 10 maio 2023.

Bohles, N.; Busch, K.; Hensel, M. Vaccines against human diarrheal pathogens: current status and perspectives. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 10, n. 6, p. 1522–1535, 2014.

Bravo, V. et al. Distinct Mutations Led to Inactivation of Type 1 Fimbriae Expression in *Shigella* spp. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, 26 mar. 2015.

Chen, C. J. et al. Affordable IgY-based antiviral prophylaxis for resource-limited settings to address epidemic and pandemic risks. v. 12, 26 fev. 2022.

Diraviyam, T. et al. Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, e97716, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0097716.

El-Kafrawy, S. A. et al. IgY antibodies: The promising potential to overcome antibiotic resistance. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 20 jan. 2023.

Frost, I. et al. The role of bacterial vaccines in the fight against antimicrobial resistance: an analysis of the preclinical and clinical development pipeline. *The Lancet Microbe*, v. 4, n. 2, p. e113–e125, fev. 2023.

Han, S. et al. Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Protects Mice Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection Through Improving Intestinal Health and Immune Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 13 abr. 2021.

Hausdorff, W. P. et al. Vaccine value profile for *Shigella*. *Vaccine*, v. 41, p. S76–S94, 10 out. 2023.

Karachaliou, C.-E.; Vassilakopoulou, V.; Livaniou, E. IgY technology: Methods for developing and evaluating avian immunoglobulins for the in vitro detection of biomolecules. *World Journal of Methodology*, v. 11, n. 5, p. 243–262, 20 set. 2021.

Karthikeyan, M. et al. Passive immunotherapy using chicken egg yolk antibody (IgY) against diarrheagenic *Escherichia coli*: A systematic review and meta-analysis. *International Immunopharmacology*, v. 102, 108381, 2022.

Kelly, P. Diarrhoeal disease. *Clinical Medicine*, v. 11, n. 5, p. 488–491, 2011.

Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, Palo Alto, v. 3, p. 163–182, 2012. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101137.

Krammer, E.-M. et al. Targeting Dynamical Binding Processes in the Design of Non-Antibiotic Anti-Adhesives by Molecular Simulation—The Example of FimH. *Molecules*, v. 23, n. 7, p. 1641, 5 jul. 2018.

Leiva, C. L. et al. IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. *International Immunopharmacology*, v. 81, p. 106269, abr. 2020.

León-Núñez, D. et al. IgY Antibodies as Biotherapeutics in Biomedicine. *Antibodies*, v. 11, n. 4, p. 62, 29 set. 2022.

Meki CD, Ncube EJ, Voyi K. Frameworks for mitigating the risk of waterborne diarrheal diseases: A scoping review. *PLoS One*. 2022 Dec 9;17(12):e0278184. doi: 10.1371/journal.pone.0278184. PMID: 36490262; PMCID: PMC9733858.

Mishra, M. et al. Antibiotic Resistance Profile, Outer Membrane Proteins, Virulence Factors and Genome Sequence Analysis Reveal Clinical Isolates of *Enterobacter* Are Potential Pathogens Compared to Environmental Isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 21 fev. 2020.

Murphy, E. R. et al. Regulation of OmpA Translation and *Shigella dysenteriae* Virulence by an RNA Thermometer. *Infection and Immunity*, v. 88, n. 3, 20 fev. 2020.

Odundo, E. A. et al. Azithromycin Resistance Patterns in *Escherichia coli* and *Shigella* before and after COVID-19, Kenya. *Emerging Infectious Diseases*, v. 30, n. 14, out. 2024.

Pereira, E. P. V. et al. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, v. 73, p. 293–303, 1 ago. 2019.

Prakash Narayana Reddy et al. Functional characterization of a broad and potent neutralizing monoclonal antibody directed against outer membrane protein (OMP) of *Salmonella typhimurium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 6, p. 2651–2661, 29 jan. 2020.

Sauer, M. M. et al. Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. *Nature Communications*, v. 7, 10738, 2016.

Shad, M. A.; Shad, A. *Shigella sonnei*: virulence, antibiotic resistance and current treatment options. *Infection and Drug Resistance*, 2020.

Shoushtari, A. et al. Protective effect of egg yolk immunoglobulin (IgY) against *Vibrio cholerae* infection in mice. *Iranian Journal of Microbiology*, 2023.

Silva, R. M.; Deodato, R. M.; Villar, L. M. Chicken IgY antibodies: a promising tool in immunodiagnosis and immunotherapy. *International Immunopharmacology*, v. 95, 107603, 2021.

Thu, H. M. et al. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) for Prophylaxis and Treatment of Rotavirus Diarrhea in Human and Animal Neonates: A Concise Review. *Food Science of Animal Resources*, v. 37, n. 1, p. 1–9, 2017.

Van Eyssen, K. et al. FimH as a vaccine target against Enterobacteriaceae infections. *Frontiers in Immunology*, 2023.

Xu, Y. et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 6, p. 860–868, 2011.

Zhou, Y. et al. Outer membrane porin OmpC: structure, function and role in antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 2023.

5. CONCLUSÃO GERAL

A presente pesquisa demonstrou que os anticorpos IgY produzidos contra peptídeos sintéticos derivados de enteropatógenos apresentam elevado potencial de reconhecimento antigênico, constituindo uma estratégia promissora para o desenvolvimento de imunoterapia passiva contra bactérias causadoras de doenças diarreicas. No Capítulo I, a revisão evidenciou o crescente interesse científico pelo emprego dos anticorpos IgY, destacando suas vantagens em relação aos anticorpos produzidos em mamíferos, como elevada especificidade, facilidade de obtenção, menor custo de produção, escalabilidade e aspectos éticos favoráveis, além de seu amplo potencial de aplicação no controle de agentes infecciosos de importância para a saúde humana e animal. Contemplando essas evidências, o capítulo II mostra que através dos ensaios de citometria de fluxo que tanto os anticorpos anti-P1 quanto os anti-P8 foram capazes de reconhecer as diferentes espécies bacterianas avaliadas (*Escherichia coli* difusamente aderente – DAEC, enteroinvasiva – EIEC, enterotoxigênica – ETEC e *Salmonella* spp.), onde o anti-P1 reconhece mais as *E. coli* e *Shigella* e o anti-P8 *Salmonella* confirmando a especificidade dos anticorpos produzidos e a preservação dos epítomos presentes nos peptídeos sintéticos utilizados para a imunização.

Apesar da elevada capacidade de reconhecimento, os ensaios *in vitro* de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e acompanhamento do crescimento bacteriano demonstraram que os anticorpos não apresentaram atividade bacteriostática ou bactericida frente aos microrganismos avaliados nas condições experimentais empregadas. Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação da IgY não está relacionado à inibição direta do crescimento bacteriano, mas possivelmente à interferência em processos associados à patogenicidade, como adesão às células do hospedeiro, invasão tecidual, neutralização de fatores de virulência ou facilitação da eliminação dos patógenos pelo sistema imune.

No modelo experimental murino, a administração oral dos anticorpos permitiu avaliar seu potencial protetor durante a infecção. Embora não tenha sido observada proteção completa contra a infecção, os animais tratados com o anticorpo anti-P1 apresentaram uma tendência de melhora clínica em comparação ao grupo controle infectado, especialmente no modelo de infecção por *Shigella flexneri*, sugerindo um possível efeito protetor da imunoterapia passiva. Esses achados, embora ainda preliminares, indicam que o anticorpo anti-P1 pode exercer um papel benéfico na

modulação da evolução da infecção, justificando a continuidade das investigações para confirmar sua eficácia.

Em conjunto, os resultados obtidos reforçam que a tecnologia IgY apresenta potencial como estratégia complementar para o controle de enteropatógenos, sobretudo por sua elevada capacidade de reconhecimento dos antígenos bacterianos e pela tendência de proteção observada no modelo experimental. Entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nessa proteção, otimizar as condições de administração e avaliar de forma mais abrangente a eficácia terapêutica dos anticorpos produzidos, contribuindo para o desenvolvimento de alternativas ao uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento e prevenção das doenças diarreicas.

6. PERSPECTIVAS

Os achados apresentados neste trabalho evidenciam a necessidade de investigações complementares que permitam aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação dos anticorpos IgY e consolidar seu potencial como estratégia de imunoterapia passiva contra enteropatógenos.

Entre essas abordagens, destaca-se a quantificação da carga bacteriana nas fezes dos animais, por meio de cultivo microbiológico e/ou técnicas moleculares, permitindo avaliar se o tratamento com IgY promove redução da colonização intestinal e da eliminação fecal dos patógenos ao longo da infecção.

Adicionalmente, a avaliação da resposta imunológica sistêmica, por meio da coleta de sangue dos camundongos para dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-17), permitirá investigar se a imunoterapia com IgY é capaz de modular a resposta inflamatória induzida pela infecção.

Outra abordagem importante consiste na realização de análises histopatológicas, permitindo investigar as alterações teciduais decorrentes da infecção e do tratamento com os anticorpos IgY. A caracterização microscópica das lesões, associada à avaliação do infiltrado inflamatório, da integridade tecidual e de possíveis alterações morfológicas, contribuirá para uma compreensão mais ampla dos efeitos da imunoterapia passiva sobre a progressão da doença e dos mecanismos envolvidos na proteção observada.

Além disso, estudos futuros poderão avaliar diferentes concentrações e esquemas de administração dos anticorpos, bem como o emprego de formulações microencapsuladas, visando aumentar sua estabilidade durante a passagem pelo trato gastrointestinal e, consequentemente, sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica. A associação dessas abordagens à quantificação da carga bacteriana, ao perfil de citocinas e às análises histopatológicas permitirá uma avaliação integrada da resposta ao tratamento, fornecendo evidências mais robustas acerca do potencial dos anticorpos IgY como estratégia alternativa para a prevenção e o controle de infecções causadas por enteropatógenos.

7. REFERÊNCIAS

Abdoli, A.; Maspi, N. Commentary: Estimates of Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Diarrhoeal Diseases: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Frontiers in Medicine*, v. 5, 29 jan. 2018.

Afrad MH, Islam MT, Begum YA, Saifullah M, Ahmmed F, Khan ZH, Habib ZH, Alam AN, Shirin T, Bhuiyan TR, Ryan ET, Khan AI, Qadri F. Antibiotic resistance and serotype distribution of *Shigella* strains in Bangladesh over the period of 2014-2022: evidence from a nationwide hospital-based surveillance for cholera and other diarrheal diseases. *Microbiol Spectr*. 2024 Nov 14;12(12):e0073924. doi: 10.1128/spectrum.00739-24. Epub ahead of print. PMID: 39540737; PMCID: PMC11619575.

Al- Hebshi, N.; Al-Haroni M.; Skaug, N. In vitro antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts Against oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, v. 51, n.3, p. 183-188, 2006.

Asato V, Bassal R, Meron-Sudai S, Goren S, Keinan-Boker L, MacLennan CA, Cohen D. IgG Serum Antibodies to *Shigella sonnei* Lipopolysaccharide Are Inversely Associated with the Incidence of Culture-Proven *S. sonnei* Shigellosis in Israeli Children and Adolescents. *Vaccines (Basel)*. 2024 Feb 25;12(3):239. doi: 10.3390/vaccines12030239. PMID: 38543873; PMCID: PMC10974432.

Aslam A, Hashmi MF, Okafor CN. Shigelose. [Atualizado em 26 de fevereiro de 2024]. Em: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482337/>

Bao, S. et al. Viral metagenomics of the gut virome of diarrheal children with Rotavirus A infection. *Gut Microbes*, v. 15, n. 1, 13 jul. 2023.

Bastos, I. S. et al. Silver tungstate microcrystals and their performance over several clinical multidrug resistant microorganisms. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 647, 20 Ago. 2022.

Belina, D. et al. Occurrence of Diarrheagenic Pathogens and Their Coinfection Profiles in Diarrheic Under Five Children and Tracked Human Contacts in Urban and Rural Settings of Eastern Ethiopia. *Microbiology Insights*, v. 16, 1 jan. 2023.

Bendary, M. M. et al. What Is behind the Correlation Analysis of Diarrheagenic *E. coli* Pathotypes? v. 11, n. 7, p. 1004–1004, 2 jul. 2022.

Berihun Mossie Mulu et al. Characteristics of Pathogenic *Escherichia coli* Associated with Diarrhea in Children under Five Years in Northwestern Ethiopia. *Tropical medicine and infectious disease*, v. 9, n. 3, p. 65–65, 21 mar. 2024.

Beyene Dereje et al. Antibiotic utilization pattern in treatment of acute diarrheal diseases: the case of Hiwot Fana Specialized University Hospital, Harar, Ethiopia. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice*, v. 16, n. 1, 10 maio 2023.

Bilge, S. S. et al. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. v. 171, n. 8, p. 4281–4289, 1 ago. 1989.

Bopp, C. A.; Brenner, F. W.; Fields, P. I.; Wells, J. G.; Strockbine, N. A. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In: MURRAY PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, PFALLER MA, YOLKEN RH (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. V. 1, cap. 42, p. 654-671.

Bravo, V. et al. Distinct Mutations Led to Inactivation of Type 1 Fimbriae Expression in *Shigella spp*. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, 26 mar. 2015.

Buskirk, Amanda D. et al. Perfis imunológicos da mucosa associados à gravidade da doença diarreica em crianças infectadas com *Shigella* e *Escherichia coli* enteropatogênica inscritas no estudo multicêntrico entérico global. *American Society for Microbiology*, [s. l.], v. 13, n. 4, 2022.

Chen, C. J. et al. Affordable IgY-based antiviral prophylaxis for resource-limited settings to address epidemic and pandemic risks. v. 12, 26 fev. 2022.

Clorives Lopes Batista, J. PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS Y CONTRA ANTÍGENOS DE *Shigella spp*. 2019. 56 f. Tese – Universidade Federal do Amazonas, 2019.

Clorives Lopes Batista, J. Novas ferramentas e imunoensaios para detecção de *Escherichia coli* diarreio gênicas e *Shigella flexneri*. 2024. 56 f. Tese – Universidade Federal do Amazonas, 2024.

Corrêa Glória, J. NOVAS ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS E MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA. 2022. 163 f. Tese – Universidade Federal do Amazonas, 2022.

Cristina da Silva Pardo, M. IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS IMUNOGÊNICOS DE *Shigella flexneri*. 2016. 81 f. Tese - Universidade Federal do Amazonas, 2016.

Da Cruz, C. B. N. et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.

Duarte, J.L et al. Variabilidade climática e internações por doenças diarreicas infecciosas em um município da Amazônia Ocidental brasileira. *Ciencia & Saude Coletiva*, v. 24, n. 8, p. 2959–2970, 1 ago. 2019.

El-Kafrawy, S. A. et al. IgY antibodies: The promising potential to overcome antibiotic resistance. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 20 jan. 2023.

Eybpooosh, S. et al. Frequency of five *Escherichia Coli* pathotypes in Iranian adults and children with acute diarrhea. *PLOS ONE*, v. 16, n. 2, p. e0245470, 4 fev. 2021.

Farthing, M. et al. Diarreia aguda em adultos e crianças: uma perspectiva mundial. *World Gastroenterology Organisation Global Guideline*, [s. l.], p. 1-25, 2012.

Fatima R, Aziz M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. [Updated 2023 Jun 26]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519509/>

Focaccia, R. V. *Tratado de Infectologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. p. 984-989.

Frost, I. et al. The role of bacterial vaccines in the fight against antimicrobial resistance: an analysis of the preclinical and clinical development pipeline. *The Lancet Microbe*, v. 4, n. 2, p. e113–e125, fev. 2023.

GBD 2021 Diarrhoeal Diseases Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific burden of diarrhoeal diseases, their risk factors, and aetiologies, 1990–2021, for 204 countries and territories: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Infectious Diseases*. 2025;25(5):519–536.

Haufan, I. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in mid-Norway: A prospective, case control study. *PloS one*, v. 19, n. 4, p. e0301625–e0301625, 18 abr. 2024.

Han, S. et al. Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Protects Mice Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection Through Improving Intestinal Health and Immune Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 13 abr. 2021.

Hausdorff, W. P. et al. Vaccine value profile for *Shigella*. *Vaccine*, v. 41, p. S76–S94, 10 out. 2023.

Heo, N. et al. The Epidemiological and Clinical Characteristics of the Largest Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, v. 38, n. 15, 1 jan. 2023.

Hobot, J. A. *Bacterial Ultrastructure*. *Molecular Medical Microbiology*, p. 7–32, 1 jan. 2015.

Jeannett Alejandra Izquierdo-Vega et al. A Mini-Review of Enteroaggregative *Escherichia coli* with a Specific Target on the Virulence Factors Controlled by the AggR Master Regulator. *Polish Journal of Microbiology*, v. 72, n. 4, p. 347–354, 1 dez. 2023.

Jesser, K. J.; Levy, K. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. Publish Ahead of Print, 6 ago. 2020.

Jin, Y. et al. Effect of microencapsulation of egg yolk immunoglobulin Y by sodium alginate/chitosan/sodium alginate on the growth performance, serum parameters, and intestinal health of broiler chickens. *Animal Bioscience*, v. 36, n. 8, p. 1241–1251, 27 fev. 2023.

Júlia Cunha Gonzales et al. A high number of multidrug-resistant and predominant genetically related cluster of *Shigella flexneri* strains isolated over 34 years in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 1563–1571, 24 jul. 2020.

Karachaliou, C.-E.; Vassilakopoulou, V.; Livaniou, E. IgY technology: Methods for developing and evaluating avian immunoglobulins for the in vitro detection of biomolecules. *World Journal of Methodology*, v. 11, n. 5, p. 243–262, 20 set. 2021.

Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.

- Khalil, I. A. et al. Morbidity and mortality due to *shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. *The Lancet. Infectious Diseases*, v. 18, n. 11, p. 1229, 1 nov. 2018.
- Krammer, E.-M. et al. Targeting Dynamical Binding Processes in the Design of Non-Antibiotic Anti-Adhesives by Molecular Simulation—The Example of FimH. *Molecules*, v. 23, n. 7, p. 1641, 5 jul. 2018.
- Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. *Shigellosis*. *The Lancet*. 2018;391(10122):801–812.
- Leiva, C. L. et al. IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. *International Immunopharmacology*, v. 81, p. 106269, abr. 2020.
- León-Núñez, D. et al. IgY Antibodies as Biotherapeutics in Biomedicine. *Antibodies*, v. 11, n. 4, p. 62, 29 set. 2022.
- Liu, W. et al. Rapid discrimination of *Shigella spp.* and *Escherichia coli* via label-free surface enhanced Raman spectroscopy coupled with machine learning algorithms. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 8 mar. 2023.
- Lopes, L. M. et al. Heterogeneity among Strains of Diffusely Adherent *Escherichia coli* Isolated in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1968–1972, abr. 2005.
- Lozer, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infectious Diseases*, v. 13, n. 1, 8 set. 2013.
- Lu, W. et al. Study of microencapsulation of immunoglobulin Y on the targeted controlled intestinal release. *LWT*, p. 117466–117466, 1 jan. 2025.
- Meki CD, Ncube EJ, Voyi K. Frameworks for mitigating the risk of waterborne diarrheal diseases: A scoping review. *PLoS One*. 2022 Dec 9;17(12):e0278184. doi: 10.1371/journal.pone.0278184. PMID: 36490262; PMCID: PMC9733858.
- Mishra, M. et al. Antibiotic Resistance Profile, Outer Membrane Proteins, Virulence Factors and Genome Sequence Analysis Reveal Clinical Isolates of *Enterobacter* Are Potential Pathogens Compared to Environmental Isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 21 fev. 2020.
- Murphy, E. R. et al. Regulation of OmpA Translation and *Shigella dysenteriae* Virulence by an RNA Thermometer. *Infection and Immunity*, v. 88, n. 3, 20 fev. 2020.
- Nataro, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, n. 11, p. 142-201, 1998.
- Noriega, F. R; Liao, F. M.; Formal, S. B.; Fasano, A.; Levine, M. M. Prevalence of *Shigella* enterotoxin 1 among *Shigella* clinical isolates of diverse serotypes. *J. Infect. Dis.*, n. 172, p. 1408-1410, 1995.

Nunes, M. R. C. M. et al. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility of the bacterium to antimicrobials: a study in Teresina, Piauí, Northeast of Brazil. *Jornal de pediatria*, v. 88, n. 2, p. 125–128, 2012.

Odunto, Elizabeth A. et al. Imunização de coelhos com vacina bioconjugada quadrivalente de *Shigella* induz anticorpos funcionais reativos com isolados de *Shigella* do Quênia. *American Society for Microbiology*, [s. l.], v. 7, n. 3, 2022.

Odundo, E. A. et al. Azithromycin Resistance Patterns in *Escherichia coli* and *Shigella* before and after COVID-19, Kenya. *Emerging Infectious Diseases*, v. 30, n. 14, out. 2024.

Okumo, N. O. et al. Risk factors for diarrheagenic *Escherichia coli* infection in children aged 6–24 months in peri-urban community, Nairobi, Kenya. *PLOS global public health*, v. 3, n. 11, p. e0002594–e0002594, 22 nov. 2023.

Ostrosky, E. A.; Mizumoto, M. K.; Lima, M. E. L.; Kaneko, T. M.; Nishikawa, S. O.; Freitas, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, p. 301-307, 2008.

Pacheco BLB, Nogueira CP, Venancio EJ. IgY Antibodies from Birds: A Review on Affinity and Avidity. *Animals (Basel)*. 2023 Oct 7;13(19):3130. doi: 10.3390/ani13193130. PMID: 37835736; PMCID: PMC10571861.

Pajuelo, M. J. et al. Epidemiology of enterotoxigenic *Escherichia coli* and impact on the growth of children in the first two years of life in Lima, Peru. *Frontiers in Public Health*, v. 12, p. 1332319, 2024.

Pakbin, B.; Bruck, W. M.; Rossen, J. W. A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: a Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 18, p. 9922, 14 set. 2021.

Parsot, C. *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiology Letters*, v. 252, n. 1, p. 11–18, 1 nov. 2005.

Pedraza, D. F.; Queiroz, D. de; Sales, M. C. Doenças infecciosas em crianças pré-escolares brasileiras assistidas em creches. *Ciencia & saude coletiva*, v. 19, n. 2, p. 511–528, 2014.

Pereira, E. P. V. et al. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, v. 73, p. 293–303, 1 ago. 2019.

Prakash Narayana Reddy et al. Functional characterization of a broad and potent neutralizing monoclonal antibody directed against outer membrane protein (OMP) of *Salmonella typhimurium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 6, p. 2651–2661, 29 jan. 2020.

Riley, L. W. Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, v. 8, n. 4, 31 dez. 2020.

- Salehi, M. et al. Antibacterial effects of egg yolk immunoglobulin (IgY) on *Helicobacter pylori*. *Iranian Biomedical Journal*, v. 23, n. 1, p. 55, 2019.
- Santos, A. C. M. dos et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains recovered from an infant with diarrhea: Evolutionary relationships and virulence genotypes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 595–602, 2023.
- Shaw, K. A. et al. Geographic distribution and variation by seasonality of diarrhea due to enteropathogens among HIV-exposed infants in Africa. *Clinical Infectious Diseases*, v. 79, n. 3, p. 453–462, 1 ago. 2024.
- Shikhov, N. A. et al. Application of bacterial lysates in pediatrics: A review. *Frontiers in Pediatrics*, v. 11, 2023.
- Silva, T. et al. Antigen discovery and new vaccine candidates for *Shigella* through bioinformatic and proteomic approaches. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 16, n. 7, p. 1520–1534, 2020.
- Silva, T. et al. Draft genome sequences of 13 *Shigella flexneri* strains from cases of shigellosis in children from Belém, Brazil. *Genome Announcements*, v. 5, n. 24, 15 jun. 2017.
- Skopek, R. et al. Advances in the development of *Shigella* vaccines. *Microorganisms*, v. 10, n. 6, p. 1196, 2022.
- Smith, J. L. *Shigella* as a Foodborne Pathogen. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 6, n. 6, p. 613–624, 1 ago. 2009.
- Staley, C. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes of children in Ghana: seasonality, age distribution, and virulence gene diversity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 130, n. 3, p. 699–709, 2021.
- Stenberg, J.; Larsson, A. Pathogenicity Islands. In: *Molecular Medical Microbiology*. [s. l.] Elsevier, 2015. p. 45–68.
- Su, T. et al. Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Shigella* species from food products in China. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.
- Thompson, C. N. et al. The Ecology and Control of Bacterial Foodborne Infections in the Developing World. *Environmental Microbiology*, v. 24, n. 5, p. 1866–1888, 2022.
- Torres, A. G. et al. *Escherichia coli*: Pathogenomics and Molecular Epidemiology. *Encyclopedia of Microbiology*, p. 852–878, 1 jan. 2019.
- Tovar-Hernández, H. A. et al. Oral immunotherapy using IgY antibodies for the prevention and treatment of rotavirus and *Escherichia coli* infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 17, n. 4, p. 1120–1132, 2021.
- Vaz, T. M. I. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* O111:H12 strain from a food poisoning outbreak in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 284, p. 1–10, 2018.

Vial, P. A. et al. Pathogenesis of *Shigella* Infection. In: *Encyclopedia of Microbiology*. [s. l.] Elsevier, 2009. p. 123–136.

Who. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. [s. l.]: World Health Organization, 2017.

World Health Organization. *Diarrhoeal disease*. Geneva: WHO; 2024.

Who. *Shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhoea vaccines: WHO position paper, February 2024. *Weekly Epidemiological Record*, v. 99, n. 7, p. 53–74, 16 fev. 2024.

Yang, Y. et al. Egg yolk antibody (IgY) targeting intestinal *Escherichia coli* F4 fimbriae could be a new option to treat porcine neonatal diarrhea. *BMC Veterinary Research*, v. 15, n. 1, p. 224, 2019.

Yang, Y. et al. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veteránřství*, v. 70, n. 12, p. 645–654, 2020.

Yang, Y. et al. Advances in research on the immunological function of IgY. *AMB Express*, v. 11, n. 1, p. 109, 2021.

Zhang, X. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in food animals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 40, 2015.

Zhang, Y. et al. Structural insight into pathogenic *Escherichia coli* adherence to host cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 142, p. 103938, 2020.

Zhang, R. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Shigella flexneri* serotype 2 variant in China. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 746907, 2021.

Zhu, C. et al. Heterogeneity and Characteristics of *Escherichia coli* Strains of Clinical Importance. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 59, n. 4, 19 mar. 2021.

Zhou, Y. et al. Outer membrane porin OmpC: structure, function and role in antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 2023.

8. ANEXOS

Anexo 1

CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO OU PESQUISA CIENTIFICA

Título: Avaliação in vivo do uso de anticorpos IgY como moléculas de tratamento contra doenças diarreicas

Title: In vivo evaluation of the use of IgY antibodies as treatment molecules against diarrheal diseases

Tipo: PESQUISA(research)

Responsável (PI): LETICIA COELHO DA CRUZ

CPF: 035.816.122-32

Data início (initial date): 28/07/2025

Data fim (end date): 28/07/2026

Nome da instituição/CNPJ: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA, INOVACOES E COMUNICACOES / 01.263.896/0015-60

Nome da CEUA: COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INPA

Cadastro solicitado à CEUA/Aprovado pela CEUA

Grupo Taxonômico	Animais	Linhagem	Idade	Peso Aproximado	Quantidade Solicitada a CEUA			Quantidade Aprovada pela CEUA		
					Machos	Fêmeas	Sexo não verificado	Machos	Fêmeas	Sexo não verificado
Rodent	Camundongo	Balb/C	6/8semanas	25 a 40 g		70			70	
Total Pesquisa		-	-	-	0	70	0	0	70	0
Total Animais		-	-	-	70			70		

Certificamos a atividade de ensino que envolve a criação, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), está de acordo com os ditames da Lei nº 11.794/2008, do Decreto nº 6.899/2009, bem como das normativas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA/MCTI.

We certify that the teaching proposal which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) is in accordance with Law # 11.794/2008, Decree # 6.899/2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (Concea/MCTI).

Data de aprovação (approval date): 15/08/2025

Protocolo (protocol): CONCEA/MCTI/0203172020/PESQUISA/000001/2025

Anexo 2

Quadro 1. Critérios de pontuação empregados para a avaliação clínica diária dos animais experimentais. Os parâmetros avaliados incluíram postura corporal, comportamento, aspecto e consistência das fezes, turgor cutâneo, aspecto dos olhos e presença de sangue nas fezes. Para cada parâmetro foi atribuído um escore de 0 (normal) a 4 (alteração mais grave), permitindo o acompanhamento da evolução clínica dos animais ao longo do experimento.

Parâmetro	Escore	Critério de avaliação
Postura corporal	0	Normal
	1	Leve arqueamento
	2	Corcunda evidente
	3	Corcunda persistente
	4	Corcunda severa
Comportamento	0	Normal
	1	Leve menos ativo
	2	Letargia moderada
	3	Pouca movimentação
	4	Prostração severa
Consistência das fezes	0	Fezes normais (fezes secas, cilíndricas e intactas)
	1	Fezes com diarreia leve (ligeiramente pegajosas, aderindo ao papel de filtro)
	2	Fezes com diarreia moderada (fezes moles, sem formação e com separação de água)
	3	Fezes com diarreia grave (fezes líquidas)
	4	Diarreia intensa/aquosa
Turgor cutâneo	0	Retorno imediato (< 1 s)
	1	Retorno discretamente lento (1–2 s)
	2	Retorno lento (2–3 s)
	3	Retorno muito lento (> 3 s)
	4	Prega cutânea permanece evidente
Aspectos dos olhos	0	Olhos normais
	1	Leve afundamento
	2	Afundamento moderado
	3	Olhos claramente encovados
	4	Olhos profundamente encovados