

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.08.10**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2008.07.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.05.04**
126/2011

(73) Titular(es):

OMNIGEN RESEARCH, LLC
1767 NW KINGS BLVD CORVALLIS OR 97330US

(72) Inventor(es):

OMNIGEN RESEARCH, LLC **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA **PT**
RUA DAS FLORES, N.º 74, 4.º AND 1249-235 LISBOA

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE #-1,3(4)-ENDOGLUCANO-HIDROLASE, #-1,3(4)-GLUCANO, TERRA DIATOMÁCEA, ARGILA MINERAL E GLUCOMANANO PARA AUMENTAR A FUNÇÃO IMUNITÁRIA**

(57) Resumo:

É DESCRITO UM MÉTODO PARA O AUMENTO DA FUNÇÃO IMUNITÁRIA. O INVENTO COMPREENDE UMA COMBINAÇÃO DE #-1,3(4)- ENDOGLUCANO-HIDROLASE, #-1,3(4)-GLUCANO, TERRA DIATOMÁCEA, ARGILA MINERAL E GLUCOMANANO, QUE É ALIMENTADA OU CONSUMIDA POR ESPÉCIES DE MAMÍFERO OU AVE EM QUANTIDADES SUFICIENTES PARA AUMENTAR A FUNÇÃO IMUNITÁRIA. O INVENTO DESCRITO PODE SER MISTURADO COM RAÇÕES OU ALIMENTOS, INCORPORADO EM RAÇÕES OU ALIMENTOS GRANULADOS OU ADMINISTRADO ORALMENTE À ESPÉCIE DE MAMÍFERO OU AVE.

RESUMO

"Utilização de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -1,3(4)-glucano, terra diatomácea, argila mineral e glucomanano para aumentar a função imunitária"

É descrito um método para o aumento da função imunitária. O invento compreende uma combinação de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -1,3(4)glucano, terra diatomácea, argila mineral e glucomanano, que é alimentada ou consumida por espécies de mamífero ou ave em quantidades suficientes para aumentar a função imunitária. O invento descrito pode ser misturado com rações ou alimentos, incorporado em rações ou alimentos granulados ou administrado oralmente à espécie de mamífero ou ave.

DESCRIÇÃO

"Utilização de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -1,3(4)-glucano, terra diatomácea, argila mineral e glucomanano para aumentar a função imunitária"

Referências Citadas [Referenciadas por]

Documentos de Patente U.S.

4857512	15 de Ago. de 1989	Wagner <i>et al.</i>	514/54
5183667	2 de Fev. de 1993	Koch, H.	424/474
5519009	1 de Out. de 1993	Donzis, B.	514/54
6395311	28 de Maio de 2002	Jia, Q.	424/744
6541678	1 de Abr. de 2003	Klein, B.	602/41
6573245	3 de Jun de 2003	Marciani, J.	514/25
6660722	9 de Dez. de 2003	Yvin, J.C.	514/54

Outras Referências:

Adib Conquy, M., C. Fitting. "Immunological status of cardiac arrest and resuscitated patients". <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2002/Cytoinf-en.html>, 2002.

AOAC. 2002. *Official Methods of Analysis*. 17^a Edição. AOAC International Press.

Burton, J.L., R.J. Erskine. "Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease". *Vet. Clin. Food Anim.* 19: 1-45, 2003.

Invivogen. <http://www.invivogen.com/genedescription/TLR01.htm>, 2004.

Travis, J. "Biologists reveal the proteins that first see dangerous microbes". *Semana de 8 de Set. de 2001* Vol. 160, No. 10.

Werling D., J.C. Hope, C.J. Howard, T.W. Jungi. "Differential production of cytokines, reactive oxygen and

nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists". *Immunology* 111: 41-52, 2004.

White, S.N., K.H. Taylor, C.A. Abbey, C.A. Gill, J.E. Womack. "Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 10364-10369, 2003.

Weber, P.S.D., S.A. Madsen, G. W Smith, J.J. Ireland, J.L. Burton. "Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle". *Vet. Immunol. Immunopath.* 83: 213-240, 2001.

CAMPO DO INVENTO

Esta divulgação refere-se a métodos e composições para o aumento da função imunitária em espécies de mamífero e ave.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O sistema imunitário consiste em duas características gerais. Estas são: o sistema imunitário inato e 2) o sistema imunitário adaptativo (mediado por anticorpos). O sistema inato representa a primeira linha de defesa contra um patogénio invasor (bacteriano ou fúngico) e proporciona ao sistema imunitário adaptativo tempo suficiente (3-5 dias) para que possa criar anticorpos que sejam utilizados para "combater" os patogénios. Embora os sistemas inato e adaptativo sejam frequentemente descritos separadamente, eles funcionam em série; esforçando-se por sequestrar e neutralizar um confronto patogénico.

O sistema imunitário inato. O sistema imunitário inato consiste em vários componentes interessantes: Aspectos incluem:

1. Barreiras físicas e químicas a patogénios proporcionadas pelo epitélio, ácido gástrico e enzimas digestivas.

2. Células que engolfam e digerem patogénios invasores (p.ex., neutrófilos).

3. Receptores à superfície destas células que reconhecem e se ligam a patogénios.

4. Moléculas de sinalização (p.ex., quimocinas, citocinas) que comunicam os locais de infecção e regulam a expressão de genes imunitários.

Neutrófilos. Os neutrófilos estão entre as células mais importantes do sistema imunitário inato. São as primeiras células a chegar a um local de infecção. Em mamíferos, são milhares de milhões de neutrófilos dos quais cerca de metade estão livremente em circulação no sangue (Burton e Erskine, 2003). Os restantes são mantidos em reserva na medula óssea onde se formam. Os neutrófilos expressam uma proteína de ligação extracelular nas suas membranas designada "L-selectina" (também designada CD62L). O papel da L-selectina é interagir fracamente com a parede das células endoteliais permitindo assim que o neutrófilo "role" ao longo da parede de um vaso sanguíneo e "monitore" a parede celular quanto à presença de sinais que indiquem um local de infecção (Figura 1). A presença de patogénios nos tecidos periféricos causa a libertação de químicos locais que então sinalizam a um neutrófilo rolante uma infecção. Em resposta a estes sinais, a L-selectina é derramada da superfície do neutrófilo (ver Figura 1) e outras moléculas mais adesivas são expressas à sua superfície. Estas moléculas essencialmente "colam" o neutrófilo dentro do vaso sanguíneo adjacente ao local de infecção. O neutrófilo activado migra então através da parede das células endoteliais para o patogénio invasor. A interleucina-1 β é produzida pelo neutrófilo como citocina pró-inflamatória. Isto ajuda na mediação da inflamação e na reclusão dos patogénios invasores. Durante a migração dos neutrófilos, sinais químicos originários do local de infecção (tais como TNF- α e interferon- γ) activam o neutrófilo para se tornar uma "célula assassina" madura. O neutrófilo maduro migra para o local de infecção onde interage com padrões microbianos associados ao patogénio (PAMPs) à superfície dos patogénios através de vários tipos de receptores. Estes receptores são expressos à superfície do neutrófilo e incluem os seguintes tipos bem identificados (Figura 2):

a- CD18 e CD14

b- Receptores semelhantes a Toll (TLRs)

c- C3b e C3bi (factores do complemento)

d- Fc

Ligação de neutrófilos a patógenos através de receptores. Ambos os receptores CD14 e CD18 ligam-se ao lipopolissacárido (LPS), uma estrutura polissacarídica vulgar associada às membranas de bactérias gram-negativas. Adicionalmente, os neutrófilos expressam receptores semelhantes a Toll (TLRs) que reconhecem e se ligam a estruturas adicionais associadas a patógenos. Até agora, foram identificados dez receptores semelhantes a Toll diferentes em mamíferos (Figura 2 e Tabela 1). Os TLRs têm um papel crítico na imunidade inata inicial a patógenos invasores sentindo os microrganismos. Estes receptores evolutivamente conservados reconhecem motivos estruturais altamente conservados expressos apenas por patógenos microbianos, designados padrões microbianos associados a patógenos (PAMPs: Invivogen, 2004). A estimulação de TLRs por PAMPs inicia uma cascata de sinalização que envolve várias proteínas, tais como MyD88 e IRAK (Figura 2). Esta cascata de sinalização conduz à activação do factor de transcrição NF- κ B que induz a secreção de citocinas que dirigem a resposta imunitária adaptativa (i.e., mediada por anticorpos). Os TLRs são expressos predominantemente em tecidos envolvidos na função imunitária, tais como o baço e leucócitos do sangue periférico, bem como os expostos ao ambiente externo tais como o pulmão e o tracto gastrointestinal. Dez TLRs humanos e nove de ratinho foram caracterizados, sete dos quais tiveram os seus ligandos identificados. Por exemplo, TLR2 é essencial para o reconhecimento de uma variedade de PAMPs, incluindo lipoproteínas bacterianas, peptidoglicano, e ácidos lipotecóicos. TLR3 está implicado em ARN de cadeia dupla derivado de vírus. TLR4 é predominantemente activado por lipopolissacárido. TLR5 detecta a flagelina bacteriana e TLR9 é necessário para a resposta a ADN CpG não metilado (Tabela 1). Recentemente, mostrou-se que TLR7 e TLR8 reconhecem moléculas antivirais sintéticas. Estes receptores são elementos essenciais na defesa do hospedeiro contra patógenos através da activação da imunidade inata (Invivogen, 2004).

TLRs bovinos. Relativamente poucos estudos sobre PAMPs foram completados com células bovinas. Até agora, foi relatado que as células imunitárias bovinas contêm TLR2 e

TLR4 (Werling *et al.*, 2004). Foram relatados polimorfismos em TLR4 bovino que podem determinar susceptibilidade a doença respiratória bovina e doença de Johne (White *et al.*, 2003).

C3b e C3bi são componentes da cascata do complemento enquanto o receptor de Fc se liga à "região constante" dos anticorpos. Assim, os patogénios que são revestidos com factores do complemento ou anticorpo (*i.e.*, patogénios que são opsonizados) são também reconhecidos por neutrófilos activados e são subseqüentemente fagocitados. Por outras palavras, os neutrófilos activados possuem vários meios através dos quais reconhecem os patogénios (Tabela 1).

Fagocitose e matança. A ligação de neutrófilos, (e outras células fagocíticas) a marcadores da superfície celular dos patogénios através destes receptores, permite então que a célula fagocítica engolfe o patogénio invasor e o "mate" (Figura 3). Actualmente, são conhecidos dois mecanismos para a "matança". Estes incluem: 1) uma explosão oxidativa, onde o fagócito expressa espécies de oxigénio reactivas que destroem o patogénio fagocitado, e 2) fusão do patogénio engolfado com uma estrutura semelhante a lisossoma para formar um "fagossoma". O fagossoma é rico em enzimas digestivas que medeiam a digestão completa dos patogénios.

Infecções comuns. As espécies de mamífero e ave são continuamente confrontadas por patogénios no tracto gastrointestinal e nos pulmões. Estes são locais importantes para neutrófilos residentes onde minimizam a invasão de patogénios. Adicionalmente, a glândula mamária dos mamíferos representa um local para o confronto com patogénios. Em todas as infecções, o sistema imunitário inato tem um papel inicial chave no combate ao confronto imunitário inicial. O sistema inato é essencial para permitir que o sistema adaptativo (mediado por anticorpos) se desenvolva e monte uma resposta imunitária mais específica e dirigida.

Cooperação entre o sistema imunitário inato e adquirido em ruminantes. Os anticorpos que são específicos para um patogénio invasor são vertidos para um local da infecção para otimizar a eliminação de um patogénio. Os indivíduos com um título elevado contra um antigénio específico são capazes de

distribuir estes anticorpos para o local de infecção através de um endotélio permeável (surgindo de uma resposta inflamatória). A chegada de anticorpos reactivos (i.e., IgG₂) aos alvéolos reveste (opsoniza) o patogénio e, tal como observado anteriormente, permite o reconhecimento pelos neutrófilos dos patogénios através de receptores de Fc (Tabela 1) e a fagocitose.

Stress e função imunitária. O stress reduz as capacidades dos indivíduos para combater a doença. Os efeitos negativos do stress no sistema imunitário são mediados pelas hormonas esteróides de stress (cortisol, hidrocortisona e corticosterona). Burton e colegas em Michigan State University (Weber *et al.*, 2001) identificaram o mecanismo através do qual o stress provoca uma redução na função imunitária. Especificamente, documentaram que os glucocorticóides (i.e., cortisol) "têm um pico" próximo do parto (Figura 4) e reduzem a expressão de L-selectina em neutrófilos (Figura 5). Isto compromete um aspecto importante da primeira linha de defesa do indivíduo contra o confronto com o patogénio. Especificamente, um indivíduo stressado, imunossuprimido, tem uma capacidade reduzida para monitorizar o revestimento de células endoteliais quanto a locais de infecção e para atacar e sequestrar patogénios. Isto pode resultar numa infecção (Figura 6).

SUMÁRIO DO INVENTO

O objectivo do presente invento é proporcionar um método novo e anteriormente desconhecido para aumento do sistema imunitário em espécies de mamífero e ave. O invento pode ser aplicado a, mas não se limita a, espécies de mamífero e ave e reduzirá a susceptibilidade de um indivíduo a doenças fúngicas e bacterianas.

Um outro objectivo deste invento é proporcionar um método para aumento da função imunitária e deste modo minimizar ou obviar morbidades e mortalidades causadas por, mas não limitadas a, fungos patogénicos e bactérias com uma preparação compreendendo uma combinação de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -glucano, terra diatomácea,

glucomanano e argila mineral, tal como silicato de alumínio, argila de montmorilonite, bentonite ou zeolite.

Outro objectivo do invento é proporcionar uma composição compreendendo uma combinação de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -glucano, terra diatomácea, argila mineral e glucomanano, que aumenta aditivamente a função imunitária e, deste modo, reduz o potencial de fungos e bactérias patogénicos para causar morbilidades e mortalidades em espécies de mamífero e ave.

Objectivos adicionais, vantagens e novas características do invento serão expostos, em parte, na descrição que se segue e tornar-se-ão, em parte, aparentes aos peritos na arte após examinação do seguinte ou podem ser aprendidos com a prática do invento. Para alcançar os objectivos anteriores e outros, e de acordo com os fins do presente invento tal como aqui descrito, é descrito um novo método para o aumento da função imunitária de espécies de mamífero e ave. Em particular, este invento aumenta a expressão de L-selectina e interleucina-1 β de neutrófilos e deste modo minimiza ou elimina a colonização das superfícies epiteliais e tecidos parenquimatosos subjacentes por fungos e bactérias patogénicos, reduz as populações de organismos patogénicos no sangue e deste modo minimiza ou elimina patologias directamente causadas por e indirectamente causadas por esta colonização. O invento compreende uma mistura de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -glucano, terra diatomácea, argila mineral, e glucomanano. A terra diatomácea é de grau comercial padrão disponível numa variedade de fontes. A β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase é produzida a partir de fermentação submersa de uma estirpe de *Trichoderma longibrachiatum*. O β -1,3(4)glucano e glucomanano são derivados de um produto comercial e são uma extracção de qualquer uma de várias leveduras. O produto argila mineral tem um grau comercial padrão (exemplos incluem, mas não se limitam a, argila montmorilonite, bentonite e zeolite). As extracções e produções de terra diatomácea, extracto de parede celular de levedura e argila mineral são bem conhecidas na arte e estão comercialmente disponíveis.

As composições que são proporcionadas pelo invento podem ser alimentadas a qualquer espécie de mamífero ou ave incluindo, mas não se limitando a, espécies bovinas, equinas, ovinas, caprinas e avícolas. Quando misturado com a ração ou o alimento ou dado como suplemento, o invento aumenta a função imunitária reduzindo deste modo a colonização por patogénios. O invento também minimiza ou elimina a invasão do compartimento sanguíneo por fungos e bactérias patogénicos. O invento deste modo minimiza ou elimina as manifestações das patologias tipicamente associadas a infecções fúngicas e bacterianas epiteliais e sistémicas. A administração do produto pode ser utilizada como profilático (i.e., para prevenir a colonização e o crescimento de espécies fúngicas e bacterianas patogénicas em espécies de mamífero ou ave), como aditivo de rações ou alimentos infectados com fungos ou bactérias patogénicos ou como método preferido para tratar e deste modo minimizar ou eliminar uma infecção fúngica ou bacteriana existente, diagnosticada ou não diagnosticada. A aplicação do invento tal como aqui descrita e através dos mecanismos específicos e novos aqui descritos minimizará e possivelmente eliminará manifestações de infecções fúngicas e bacterianas. A aplicação do invento tal como aqui descrita também minimizará ou possivelmente eliminará manifestações associadas à presença de organismos fúngicos e bacterianos patogénicos, tal como identificados acima, em alimentos ou rações de espécies de mamífero e ave.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos e fotografias anexos que são incorporados na seguinte "Descrição Detalhada do Invento" fazem parte do fascículo e ilustram vários aspectos do presente invento e, em conjunto com a Descrição Detalhada, servem para explicar os detalhes do invento. Na secção seguinte são apresentadas cinco figuras.

Figura 7. Efeito de cinco tratamentos experimentais em concentrações de L-selectina de neutrófilos. Foi conduzida uma experiência com 60 ovelhas. Doze ovelhas foram alocadas a cada tratamento. Os tratamentos consistiram em:

1. Controlo

2. Imunossuprimido (injecções diárias de Azium [Dexametasona], 0,1 mg/kg duas vezes/dia).

3. Imunossuprimido mais produto experimental alimentado a 0,5% de toma diária de matéria seca.

4. Imunossuprimido mais ração bolorenta (adição de trigo moído infectado com *Aspergillus fumigatus*; 1,5 lbs/cabeça/dia).

5. Imunossuprimido mais ração bolorenta (como no Tratamento 4) mais o produto de ração experimental tal como delineado no Tratamento 3.

A duração do ensaio foi de 28 dias. No Dia 28, sangue foi tomado de seis ovelhas por tratamento e os neutrófilos foram recuperados através de centrifugação em gradiente de Percoll. As concentrações de L-selectina foram determinadas através de análise *Western blot* utilizando um anticorpo específico para L-selectina. Concentrações relativas de L-selectina entre os cinco grupos de tratamento são mostradas na Figura 8.

Figura 8. Densitometria de varrimento dos dados mostrados na Figura 7.

Figura 9. Análise de interleucina-1 β de neutrófilos nas mesmas amostras de neutrófilos de ovelha apresentadas na Figura 7.

Figura 10. Densitometria de varrimento dos dados mostrados na Figura 9.

Figura 11. Concentrações de *Aspergillus fumigatus* em amostras de sangue tomadas de ovelhas no Dia 28 do estudo acima. Os níveis de ADN de *A. fumigatus* foram avaliados utilizando um ensaio baseado em PCR quantitativo Sybr-Green específico para *A. fumigatus*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento baseia-se na nova descoberta de que uma combinação de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -1,3(4)glucano, terra diatomácea, argila mineral e glucomanano

efectivamente aumenta a função imunitária e reduz a colonização de tecidos e sangue por um patogénio.

A β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase é de uma fonte comercial e é produzida a partir de fermentação submersa de uma estirpe de *Trichoderma longibrachiatum*.

A terra diatomácea é preparada através de métodos vulgarmente conhecidos na arte. Está disponível como um produto lavado com ácido comercialmente disponível com sílica (SiO_2) a 95% e com os seus restantes componentes não ensaiados mas consistindo principalmente em cinza (minerais) tal como definido pela Association of Analytical Chemists (AOAC, 2002).

O extracto de parede celular de levedura é preparado através de um método vulgarmente conhecido na arte. É uma fonte comercial de β -1,3(4)glucano e glucomanano derivados de levedura primária inactivada (*Saccharomyces cerevisiae*) com a seguinte composição química:

Humidade	2-3%
Matéria seca	97-98%
Proteínas	14-17%
Gorduras	20-22%
Fósforo	1-2%
Mananos	22-24%
β -1,3(4)glucano	24-26%
Cinza	3-5%

As argilas minerais (aluminossilicatos) utilizadas neste invento podem ser preenchidas por qualquer uma de uma variedade de argilas comercialmente disponíveis incluindo, mas não se limitando a, argila montmorilonite, bentonite e zeolite.

Numa concretização preferida do invento, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea, extracto de parede celular de levedura e argila mineral são combinados a 0,05-3%, 1-40%, 1-20% e 40-92%, respectivamente. Numa composição preferida, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea, extracto de parede celular de levedura e argila mineral são

combinados a 0,1-3%, 5-40%, 2-10% e 40-80%, respectivamente. Numa concretização especialmente preferida do invento, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea, extracto de parede celular de levedura e argila mineral são combinados a 0,2-3%, 30-40%, 4-6% e 50-65%, respectivamente. A forma física preferida do invento é um pó seco e solto que seja adequado para inclusão directa numa ração, produto alimentar ou como suplemento a uma ração ou dieta mista completa.

As composições proporcionadas pelo presente invento podem ser incorporadas directamente em rações ou produtos alimentares comercialmente disponíveis ou alimentadas como suplementos a rações ou produtos alimentares comercialmente disponíveis. A composição contida no presente invento pode ser alimentada a qualquer espécie de mamífero ou ave. Os métodos do invento compreendem o aumento da função imunitária em espécies de mamífero e ave. Quando incorporado directamente em rações, o presente invento pode ser adicionado às rações em quantidades variando de 0,1 a 5 kg por tonelada de ração. Numa composição especialmente preferida, o invento pode ser adicionado a rações em quantidades variando de 1-2 kg por tonelada de ração.

A composição contida no presente invento pode ser adicionada a produtos alimentares ou a alimentos animais em quantidades variando de 0,0125% a 2% em peso de ração. Numa concretização preferida, a composição é adicionada a produtos alimentares animais ou a alimento em quantidades de 0,0625% a 1% em peso de ração. Numa concretização especialmente preferida, o invento é adicionado em quantidades de 0,125% a 0,5% em peso de ração.

Alternativamente, a composição contida no presente invento pode ser alimentada directamente a espécies de mamífero ou ave como um suplemento em quantidades de 0,016 gramas/kg a 0,37 gramas/kg de peso corporal vivo por dia. Numa concretização especialmente preferida, o invento pode ser proporcionado a espécies de mamífero e ave em quantidades de 0,10 gramas/kg a 0,20 gramas/kg de peso corporal por dia. Um perito na arte pode apreciar que a quantidade do invento alimentada pode variar dependendo da espécie animal, do

tamanho do animal e do tipo de produto alimentar ao qual o invento é adicionado.

Os novos métodos deste invento compreendem a capacidade de uma combinação de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea, extracto de parede celular de levedura e argila para aumentar a função imunitária. Os benefícios resultantes da aplicação do invento a espécies de mamífero incluem, mas não se limitam a, reduzidas perdas por morte, reduzida incidência de aborto micótico, reduzida incidência de síndrome de hemorragia do jejuno (síndrome de morte intestinal), reduzida incidência de purga (diarreia), melhor velocidade de crescimento, melhor eficiência de crescimento, melhor produção de leite, melhor eficiência da produção de leite e reduzidas contagens de células somáticas em produtos lácteos (animais leiteiros). Os benefícios da aplicação do invento a espécies de ave incluem, mas não se limitam a, reduzidas perdas por morte, melhor crescimento e produção de ovos, melhor fertilidade, e reduzida incidência e doenças entéricas.

Pretende-se que os seguintes sejam ilustrativos do invento, e não devem ser considerados restritivos do âmbito do invento como de outro modo aqui descrito.

Exemplo 1

Foi conduzida uma experiência utilizando 60 ovinos machos e fêmeas em crescimento. As ovelhas foram alocadas a um dos cinco tratamentos (sete fêmeas e cinco machos por tratamento):

1. Controlo.
2. Imunossuprimido (injecções diárias de Azium [Dexametasona], 0,1 mg/kg duas vezes/dia).
3. Imunossuprimido mais o invento alimentado a 0,5% de toma de matéria seca diária.
4. Imunossuprimido mais ração bolorenta (adição de trigo moído infectado com *Aspergillus fumigatus*; 1,5 lbs/cabeça/dia).
5. Imunossuprimido mais ração bolorenta (tal como no Tratamento 4) mais o invento tal como delineado no Tratamento 3.

Os animais foram alimentados com uma dieta de tipo láctea durante um período de 28 dias. A imunossupressão foi mediada nos Tratamento 2, 3, 4 e 5 por injeção diária de Azium utilizando uma dose elevada (um modelo de stress extremo: Weber *et al.*, 2001). As ovelhas nos Tratamentos 4 e 5 foram confrontadas com um bolor patogénico alimentando-as com trigo moído que tinha sido contaminado com um bolor patogénico (*Aspergillus fumigatus*). As ovelhas nos Tratamentos 3 e 5 foram suplementadas com o invento a uma taxa de 0,5% da sua toma de matéria seca diária. Após 28 dias, amostras de sangue foram tomadas através de punção jugular e as fracções de neutrófilos foram isoladas utilizando centrifugação em gradiente de densidade de Percoll. Após isto, as amostras de proteína de neutrófilos foram processadas utilizando electroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida e *Western blotting* utilizando anticorpos que são específicos para L-selectina e interleucina-1 β . As concentrações relativas de L-selectina e interleucina-1 β foram avaliadas utilizando densitometria de varrimento.

As Figuras 7 e 8 demonstram efeitos dos cinco tratamentos experimentais em L-selectina de neutrófilos. A injeção com Azium causou uma marcada redução ($P < 0,05$) na L-selectina e proporciona uma prova de que a injeção de Azium foi, de facto, imunossupressora. A adição de bolor às dietas não teve qualquer efeito ($P > 0,05$) nas concentrações de L-selectina. De interesse, a adição do invento à ração (Tratamentos 3 e 5) causou o restauro (aumento: $P < 0,05$) da L-selectina.

Interpretação: O novo invento restaurou com sucesso (aumentou) os níveis normais de L-selectina de neutrófilos. O restauro de L-selectina à superfície de neutrófilos restabelecerá a sua capacidade para monitorizar o forro endotelial quanto a patogénios.

As Figuras 9 e 10 demonstram efeitos dos cinco tratamentos experimentais nas concentrações de interleucina-1 β de neutrófilos. O tratamento de Azium causou uma marcada redução ($P < 0,05$) na concentração de interleucina-1 β de

neutrófilos. Isto demonstra que Azium foi imunossupressor. O novo invento não teve efeito ($P > 0,05$) na interleucina- 1β de neutrófilos na ausência de um confronto com o patogénio (i.e., Tratamento 3 versus Tratamento 2); no entanto, o invento causou um marcado aumento ($P < 0,05$) em interleucina- 1β de neutrófilos na presença de um confronto com o patogénio (i.e., Tratamento 5 versus Tratamento 4).

Interpretação. A interleucina- 1β é uma importante citocina pró-inflamatória que permite que o neutrófilo desempenhe o seu papel como fagócito. A capacidade do produto da ração para restaurar a interleucina- 1β na presença de um patogénio (*A. fumigatus*) demonstra que os patogénios potenciam os efeitos do invento na função imunitária.

A Figura 11 mostra os efeitos dos cinco tratamentos experimentais nas concentrações sanguíneas de *A. fumigatus*. As concentrações de *A. fumigatus* foram determinadas utilizando um ensaio de reacção em cadeia da polimerase (PCR) quantitativo em tempo real Sybr-Green desenvolvido no nosso laboratório. Os resultados demonstram que o invento reduziu ($P < 0,05$) a concentração de *A. fumigatus* no sangue.

Interpretação. O restauro da função dos neutrófilos, mostrado nas Figuras 7-10 manifesta-se a si mesmo através da redução da carga de patogénio detectada no compartimento sanguíneo. O invento reduz a carga de patogénio.

Estes resultados mostram que a composição do invento (i.e., argila mineral, extracto de parede celular de levedura, terra diatomácea e β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase) é capaz de um efeito anteriormente não descrito de aumento da função imunitária. O invento restaura especificamente os níveis de L-selectina e interleucina- 1β em neutrófilos restaurando deste modo a capacidade dos neutrófilos para monitorizar a presença de patogénios invasores.

A combinação de produtos aumenta a imunidade em espécies de mamífero e ave domésticas e previne deste modo a invasão e colonização do compartimento sanguíneo. Representa uma mistura que é dispersável e facilmente incorporada em produtos de ração e produtos alimentares. O presente invento

foi eficaz a alcançar os seus efeitos imunoestimuladores sob condições de crescimento que podem ser verificadas em sistemas digestivos de mamífero e ave onde nutrientes, humidade, oxigénio e temperaturas elevadas são proporcionados pelo hospedeiro.

A descrição anterior da concretização preferida do invento foi apresentada para fins de ilustração e descrição. Não se pretende que seja exaustiva ou limite o invento à forma precisa divulgada. Modificações ou variações óbvias são possíveis à luz das ilustrações acima. A concretização foi escolhida e descrita para proporcionar a melhor ilustração dos princípios do invento e a sua aplicação prática permite deste modo que um vulgar perito na arte utilize o invento em várias concretizações e com modificações conforme adequado para a utilização particular contemplada. Todas estas modificações e variações estão dentro do âmbito do invento conforme determinado pelas reivindicações anexas quando interpretadas de acordo com o alcance a que justamente, legalmente e equitativamente têm direito.

Tabela 1. Resumo dos mecanismos através dos quais os neutrófilos podem reconhecer/ligar-se ao patogénio antes da fagocitose.

Receptor do neutrófilo	PAMP¹ ou Ligando	Comentário
CD14	lipopolissacárido	ligação directa ao patogénio
CD18	lipopolissacárido,	ligação directa ao patogénio
TLR2	lipoproteína, peptidoglicano, ácido lipotecóico	ligação directa ao patogénio
TLR3	ARN de cadeia dupla derivado de vírus	ligação directa ao patogénio
TLR4	lipopolissacárido	ligação directa ao patogénio
TLR5	Flagelina	ligação directa ao patogénio
TLR7/8	Pequenas moléculas sintéticas anti-virais	ligação directa ao patogénio
TLR9	ADN CpG não metilado	ligação directa ao patogénio
C3b/C3bi	Factores do complemento	liga-se ao patogénio opsonizado
Fc	"região constante" de anticorpos	liga-se ao patogénio opsonizado

1-PAMP: Padrão molecular associado ao padrão

Lisboa, 2011-06-21

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo uma combinação de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea calcinada, e uma argila mineral; para utilização em aumento da função imunitária inata em espécies animais não humanas e reduzindo deste modo a susceptibilidade a uma infecção.

2. Composição da Reivindicação 1, em que o sistema imunitário inato é aumentado em espécies de mamífero e ave, de preferência em espécies de mamífero e ave imunossuprimidas.

3. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1 ou 2, em que a administração da composição resulta em alteração dos índices da função imunitária inata seleccionados a partir do grupo consistindo num aumento da função dos neutrófilos, um aumento nos níveis de expressão da L-selectina de neutrófilos, um aumento nos níveis de expressão de interleucina-1 β , e uma redução na carga de patogénio e combinações destes.

4. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1-3, misturada em alimentos ou produtos alimentares das espécies animais não humanas.

5. Composição da Reivindicação 1, em que a combinação de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea calcinada, e uma argila mineral, é para utilização em inibição do crescimento fúngico na digestão das espécies animais não humanas.

6. Composição de qualquer uma das Reivindicações 2-5, em que a espécie de mamífero inclui todos os animais ruminantes, de preferência incluindo gado leiteiro, bovinos ou ovinos de carne e/ou as espécies de ave incluem espécies de aves de capoeira utilizadas na produção de criação comercial.

7. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1-6, em que a argila mineral é argilas de montmorilonite, bentonite, aluminossilicato, zeolite, ou misturas destas.

8. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1-7, em que a β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase é produzida a partir de fermentação submersa de *Trichoderma longibrachiatum*.

9. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1-8, em que o β -glucano e glucomanano são derivados de fervura e autólise enzimática de paredes de células de levedura gram-positivas dos géneros de *Saccharomyces*, de preferência o β -glucano e o glucomanano são derivados de fervura e autólise enzimática de paredes celulares de leveduras gram-positivas de *Saccharomyces cerevisiae*.

10. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1-9, em que a terra diatomácea é calcinada a uma temperatura mínima de 900°C.

11. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1-10, em que a composição compreende entre 15% e 40% de terra diatomácea, entre 50% e 81% de argila mineral, entre 1,0% e 5,0% de β -glucano, entre 0,05% e 3,0% de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase e entre 1% e 8% de glucomanano.

12. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1-11, em que a composição compreende entre 20% e 30% de terra diatomácea, entre 60 e 75% de argila mineral, entre 1,0% e 3,5% de β -glucano, entre 0,1% e 3,0% de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase e entre 1,0% e 6,0% de glucomanano.

13. Composição compreendendo uma combinação de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea calcinada, e uma argila mineral para utilização no aumento da função imunitária ou para utilização no tratamento do crescimento de bolores patogénicos num animal não humano seleccionado a partir de espécies de mamífero ou ave aumentando deste modo a função imunitária para reduzir a susceptibilidade a uma infecção no animal ou inibindo deste modo o crescimento do bolor na digestão que passa através do

animal para reduzir a susceptibilidade a uma colonização micótica do tracto digestivo ou a micoses invasivas.

14. Composição da reivindicação 13, em que a quantidade da composição incorporada na dieta do animal compreende entre 0,0125% e 5% em peso da toma diária do animal.

15. Composição da reivindicação 13 ou 14, em que a espécie de bolor infectante inclui pelo menos uma de *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rachiborskiomyces* e outros géneros que estão compreendidos na classificação taxonómica de fungos.

16. Composição de qualquer uma das Reivindicações 13-15, em que as espécies de mamífero incluem todos os animais ruminantes, de preferência incluindo gado leiteiro, bovinos ou ovinos de carne e/ou as espécies de ave incluem espécies de aves de capoeira utilizadas em produção de criação comercial.

17. Composição de qualquer uma das Reivindicações 13-16, em que a argila mineral é argilas de montmorilonite, bentonite, aluminossilicato, zeolite, ou misturas destas.

18. Composição de qualquer uma das Reivindicações 13-17, em que a β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase é produzida a partir de fermentação submersa de *Trichoderma longibrachiatum*.

19. Composição de qualquer uma das Reivindicações 13-18, em que o β -glucano e o glucomanano são derivados de fervura e autólise enzimática de paredes celulares de leveduras gram-positivas dos géneros de *Saccharomyces*, de preferência o β -glucano e o glucomanano são derivados de fervura e autólise enzimática de paredes celulares de leveduras gram-positivas de *Saccharomyces cerevisiae*.

20. Composição de qualquer uma das Reivindicações 13-19, em que a terra diatomácea é calcinada a uma temperatura mínima de 900°C.

21. Composição de qualquer uma das Reivindicações 13-20, em que a composição compreende entre 15% e 40% de terra diatomácea, entre 50% e 81% de argila mineral, entre 1,0% e 5,0% de β -glucano, entre 0,05% e 3,0% de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase e entre 1% e 8% de glucomanano.

22. Composição de qualquer uma das Reivindicações 13-21, em que a composição compreende entre 20% e 30% de terra diatomácea, entre 60 e 75% de argila mineral, entre 1,0% e 3,5% de β -glucano, entre 0,1% e 3,0% de β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase e entre 1,0% e 6,0% de glucomanano.

23. Método para preparação de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12 ou 13-22.

24. Utilização de uma composição compreendendo uma combinação de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea calcinada, e argila mineral em alimentos e rações animais.

25. Alimentos e rações animais compreendendo uma combinação de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea calcinada e argila mineral.

Lisboa, 2011-06-21

Figura 1. Movimento de neutrófilos através de um vaso sanguíneo. A L-selectina (CD62L) é mostrada como círculos à superfície do neutrófilo. Isto permite a atracagem do neutrófilo ao endotélio. Observe-se o derrame de L-selectina e a migração do neutrófilo para o tecido periférico em direcção a um local de infecção (F). Fonte: Burton e Erskine, 2003.

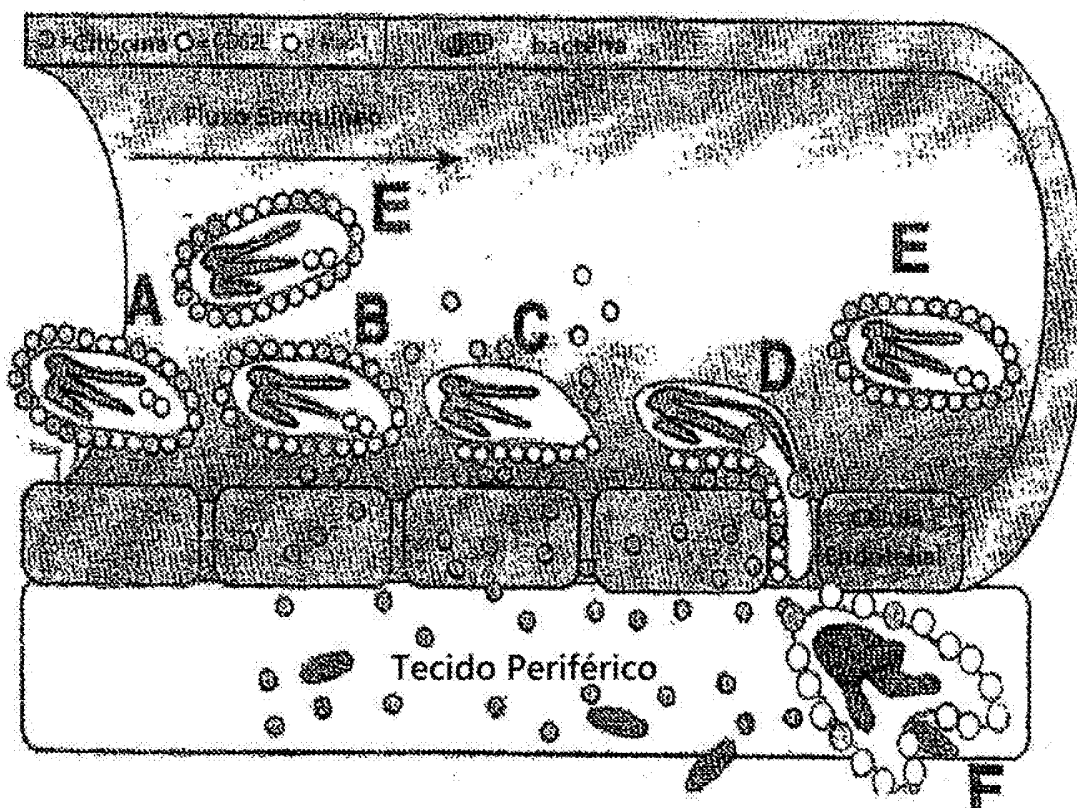


Figura 2. Receptores semelhantes a Toll à superfície de uma célula imunitária e transdução de sinal após ligação dos TLRs aos PAMPs microbianos. (Fonte: M. Adib. Conquy, C. Fitting, 2002).

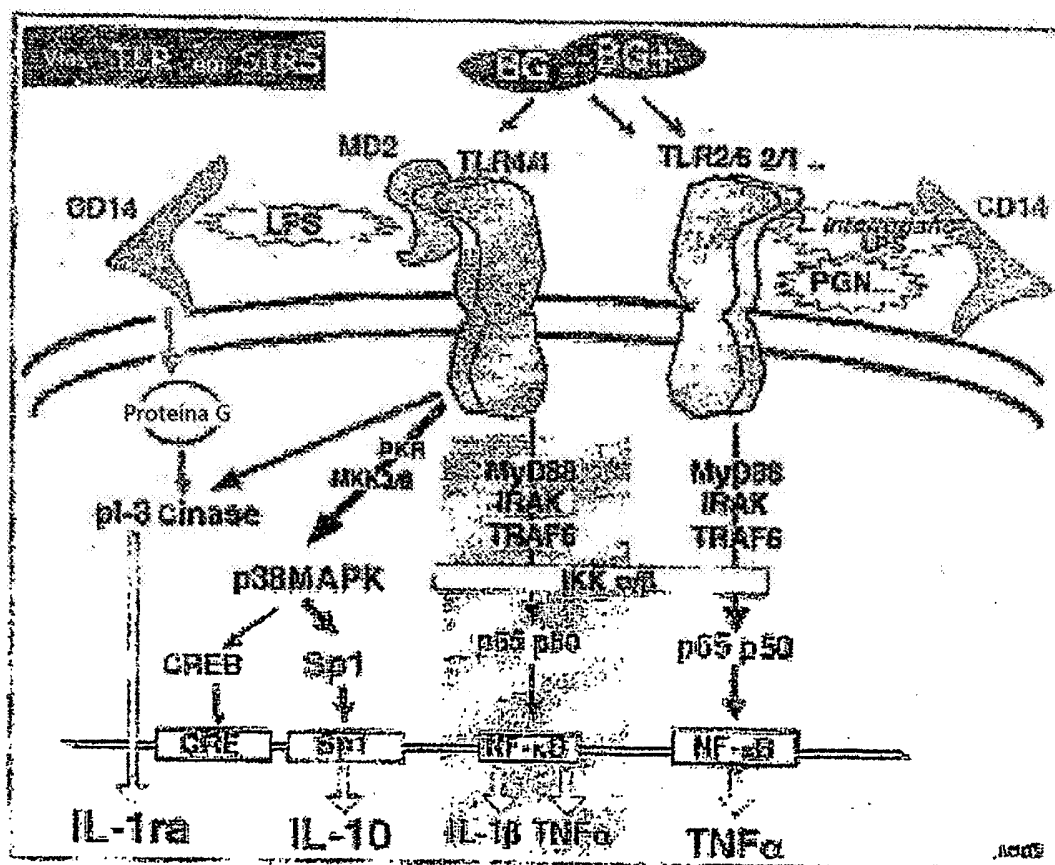


Figura 3. Num processo designado fagocitose, este macrófago engolfa uma bactéria. Os receptores semelhantes a Toll e outros dirigem a fagocitose para reconhecer micróbios. Observe-se as projecções pseudopodiais rodeando a bactéria. Fonte: Travis, 2002.



Figura 4. Níveis de cortisol em gado leiteiro relativamente ao dia do parto. Observe-se que o cortisol atinge um pico no dia do parto. Fonte: Weber et al., 2001.

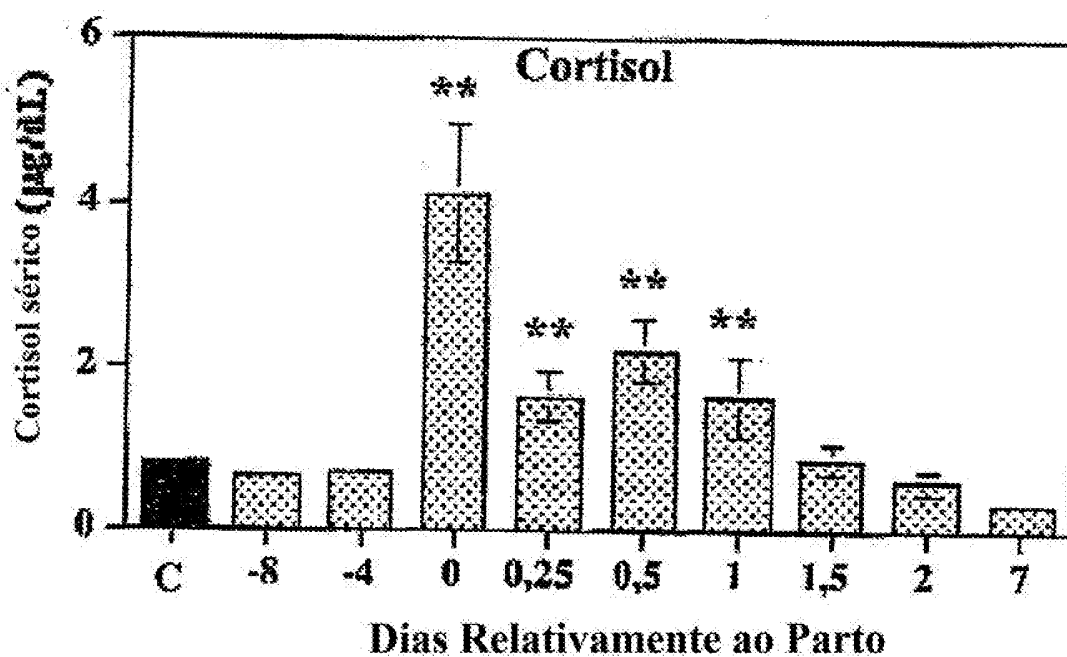


Figura 5. As barras representam a concentração de L-selectina de neutrófilos de vaca relativamente ao dia do parto. Fonte: Weber et al., 2001.

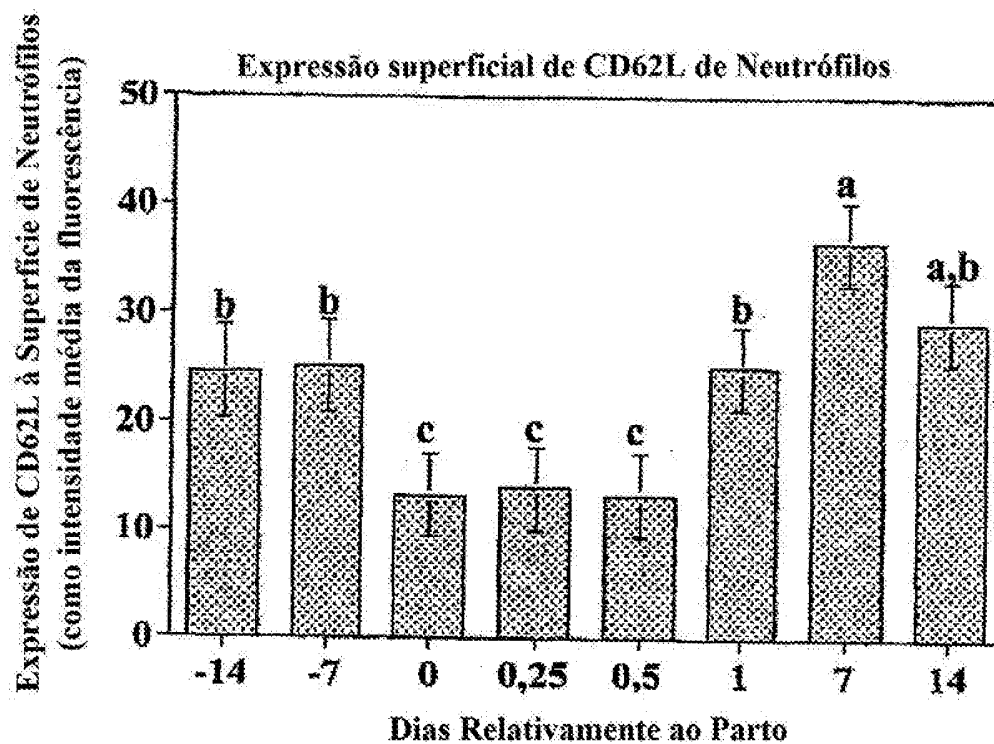


Figura 6. Neutrófilos sem expressão de L-selectina (CD62L) numa vaca leiteira sujeita a stress (Fonte: Burton e Erskine, 2003).

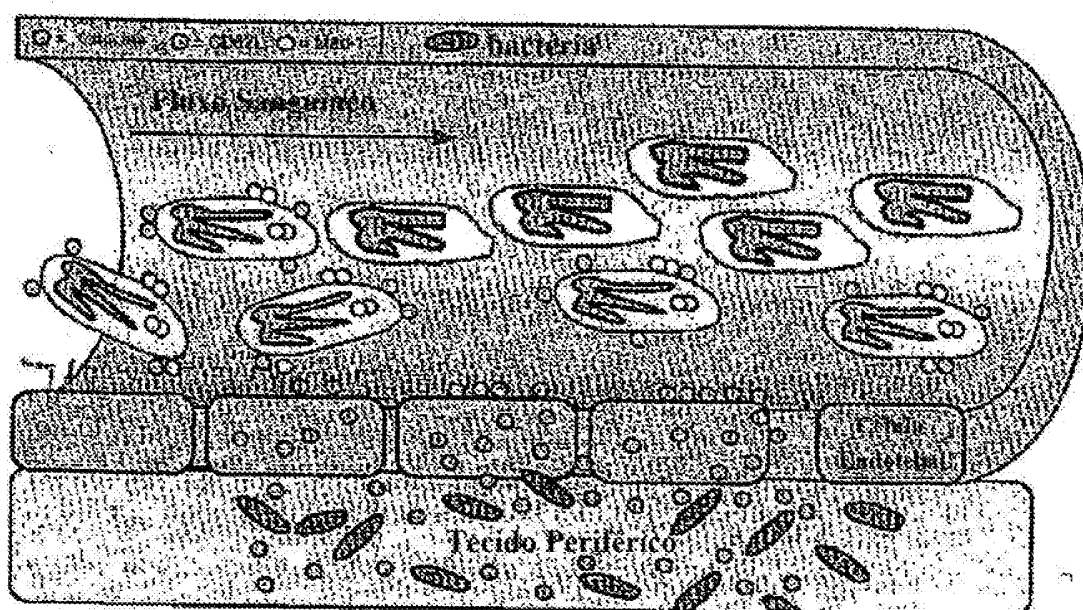


Figura 7. Efeito de cinco tratamentos experimentais nas concentrações de L-selectina de neutrófilos. Puntenney e Forsberg.

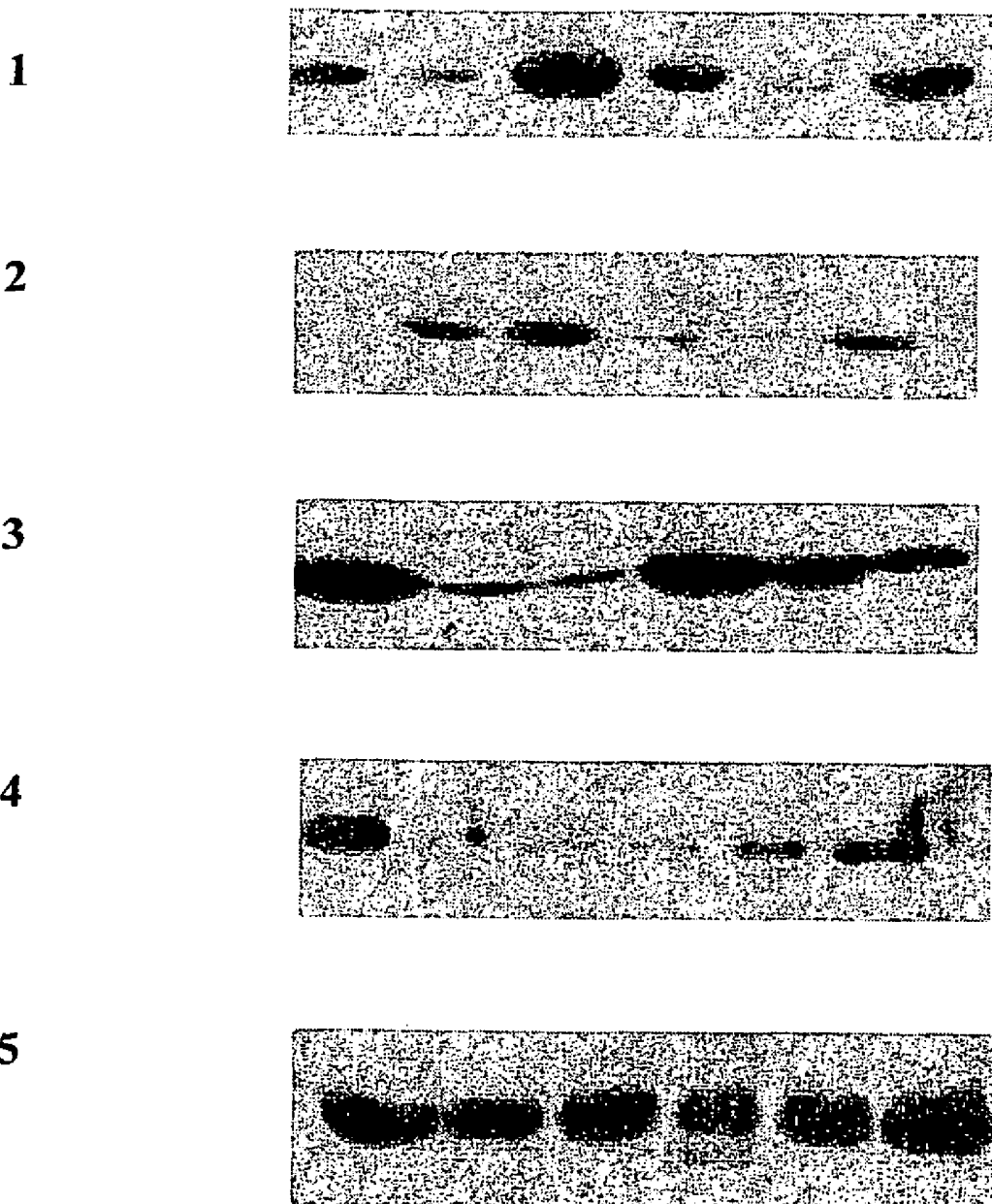


Figura 8. Densitometria de varrimento dos dados mostrados na Figura 7. Puntenney e Forsberg.

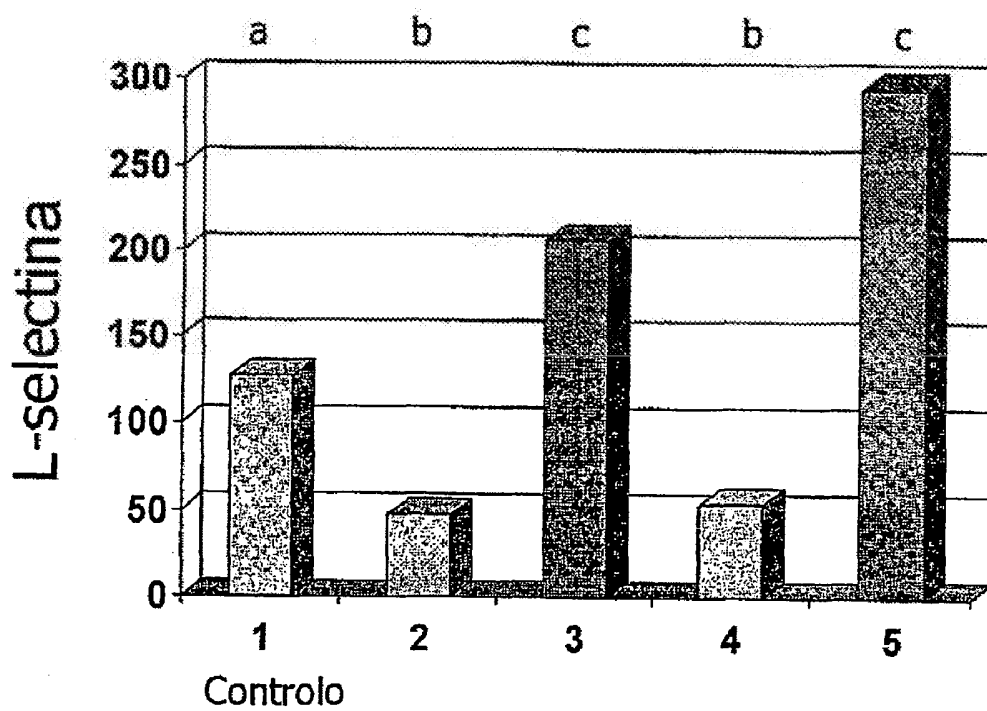


Figura 9. Análise da interleucina-1 β de neutrófilos, nas mesmas amostras de neutrófilos de ovelha apresentadas na Figura 7. Puntenney e Forsberg.

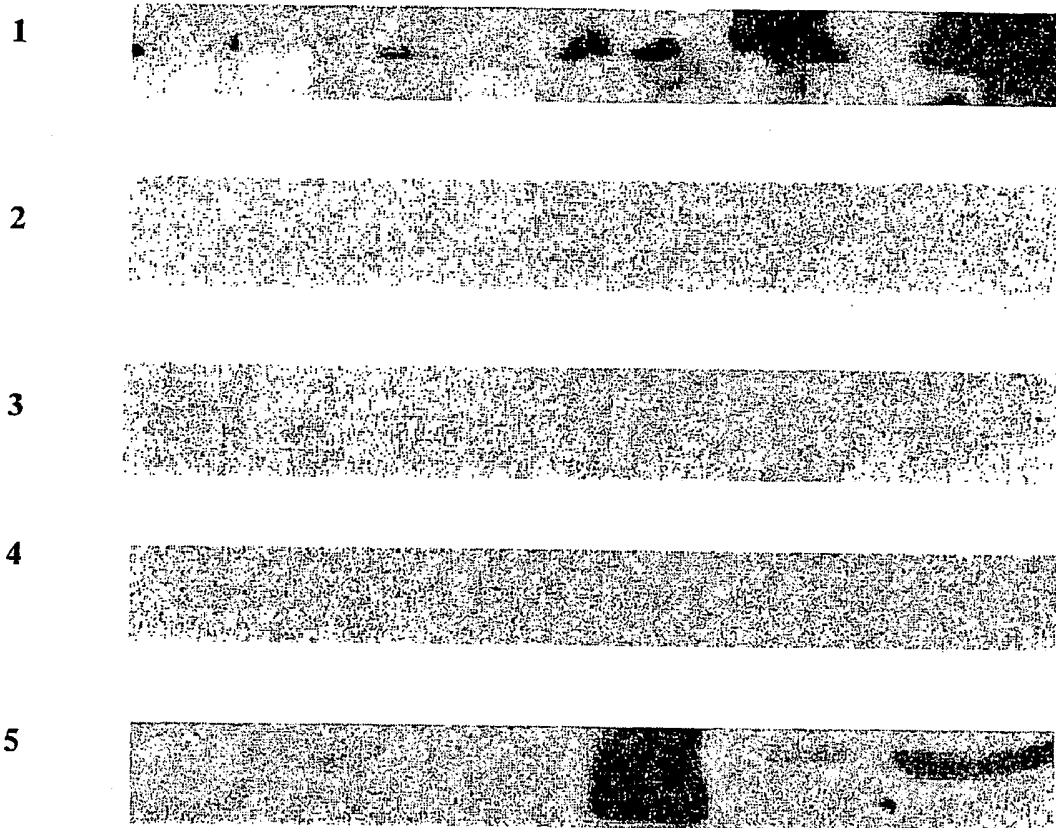


Figura 10. Densitometria de varrimento dos dados mostrados na Figura 9. Puntteney e Forsberg.

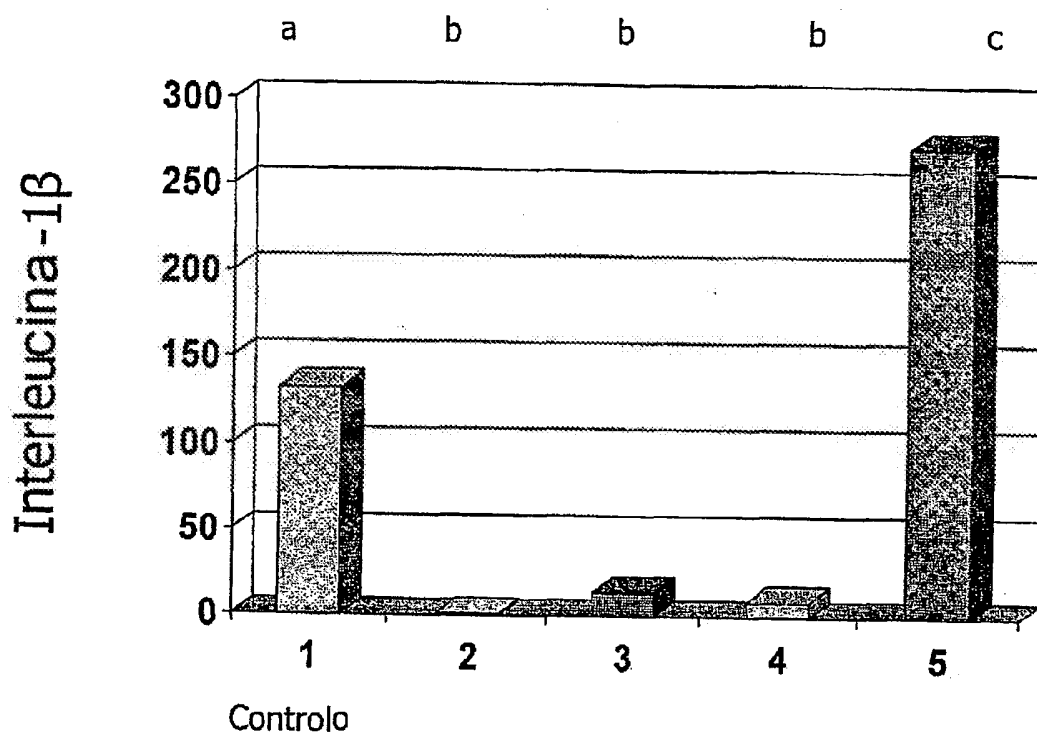


Figura 11. Concentrações de *Aspergillus fumigatus* em amostras de sangue tomadas de ovelhas no Dia 28. Puntenney e Forsberg.

