



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA CHEIRUBIM

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ANTICORPOS ANTI-K88 E F41**

Londrina
2014

ANA PAULA CHEIRUBIM

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ANTICORPOS ANTI-K88 E F41**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cheirubim, Ana Paula .

Produção e caracterização imunológica da atividade biológica de anticorpos anti-K88 e F41 / Ana Paula Cheirubim. - Londrina, 2014.
71 f. : il.

Orientador: Emerson José Venancio.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Anticorpos IgY - Tese. 2. Colibacilose - Tese. 3. Fímbria K88 - Tese. 4. ETEC - Tese. I. Venancio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

ANA PAULA CHEIRUBIM

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ANTICORPOS ANTI-K88 E F41**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Mário Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de julho de 2014.

*À minha família, que sempre me
ofereceu suporte, fortalecimento e apoio
para a realização deste sonho.
Em especial à minha querida mãe,
Sueli, meu exemplo de determinação,
garra e sabedoria.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela luz e fé que sempre me ampararam.

À minha família, minha mãe Sueli Romanini, meu padrasto Luis Domingos da Silva, meu pai José Antônio Cheirubim, e meus irmãos José Mário Cheirubim e Solange Romanini da Silva, por sempre me incentivarem, por serem a minha base ao longo desta caminhada, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, pelo amor incondicional e por fazer da distância que nos separava um breve esperar para um novo reencontro.

Ao meu orientador, prof. Emerson José Venancio, pela oportunidade cedida em realizar este trabalho, pela paciência e compreensão com as minhas limitações, pela dedicação e orientação, além dos ensinamentos que se estenderam ao campo profissional e pessoal.

Ao pesquisador Wagner Loyola, que juntamente com o Prof. Emerson me cedeu a oportunidade de realizar este trabalho, por sempre estar à disposição com muito bom humor e seriedade para auxiliar e por ter participação fundamental em minha trajetória acadêmica.

Ao Prof. Mário Augusto Ono, por aceitar participar da banca examinadora de defesa, pelas contribuições na etapa final deste trabalho e pelo incentivo profissional no início de meus estudos.

Ao Prof. Luciano A. Penagio, por aceitar o convite para compor a banca examinadora de defesa e por suas valiosas contribuições.

Ao Prof. Gerson Nakazato, por aceitar o convite para compor a banca examinadora de qualificação, pelas orientações e contribuições no desenvolvimento e etapa final deste trabalho.

Aos companheiros e amigos do laboratório de imunologia IV, Eduardo Vignoto Fernandes, Ana Carolina Navarro Ferraro, Sandmary Dechechi Chambó, em especial Denise Turini Gonzales Marioto, Michele Pagliari Montini e Miriele da Silva pela amizade conquistada dentro e fora de laboratório, pelas sugestões de melhoria, pelo fundamental apoio diário e por todos os momentos agradáveis que compartilhamos.

Aos colegas do laboratório de imunologia animal e laboratório de bacteriologia, Isabele Kazahaya, Aline Omori, Rafaela Macagnan, Daniele Araújo, Erick Nishio e Vanessa Koga, pelo auxílio em experimentos, sugestões de melhoria e pela disposição em ajudar.

À Francine S. Tanno, por ter servido de base e conforto nos momentos bons e ruins, e por ter compartilhado e participado integralmente direta ou indiretamente para a concretização de uma etapa tão importante.

À Talita Catarino, pela amizade de longa data, pelo companheirismo e solidariedade nas horas difíceis e pelas comemorações nos momentos de glória.

Às minhas amigas e irmãs de coração, Carina Lucio, Lilian Diniz, Bruna Vieira, Luana Rodrigues, Isabela Montoro, Viviane dos Anjos, em especial Tatiane Mazetto, por se fazerem presentes e por dividirmos não apenas os momentos de alegria, tornando assim a minha caminhada mais fácil, a vida mais leve e com certeza muito mais divertida.

Às “Flores”, Talita Amador, Angélica Lino, Maiara Destro e em especial, Egláia Carvalho, pela amizade de longa data, pelos incentivos, conselhos, carinho e presença constante.

Aos amigos Fábio Goulart de Andrade, Lucimila Luchesi, Romilaine de Souza, Taísa Saragosa e Ilmara Varotto pela amizade, companheirismo, apoio e palavras de incentivo que sempre me impulsionaram a seguir em frente.

À Kelly Fabiana de Castro que segurou minha mão e me fez emergir do fundo, me fazendo lembrar a pessoa que sou dando a sustentação e a compreensão necessária em um processo tão complexo. Dedico o término desta etapa.

A todos que, de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Muito Obrigada!

CHEIRUBIM, Ana Paula. **Produção e caracterização imunoquímica da atividade biológica de anticorpos anti-K88 e F41**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

As doenças infecciosas são a causa de 20% das perdas na produção animal em todo o mundo. Dentre as enfermidades entéricas que levam a perdas na suinocultura, a colibacilose é uma das mais importantes. Em suínos, as *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETECs) associadas a distúrbios entéricos expressam as fímbrias K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41, F42 e F18. Neste estudo, investigamos a produção de anticorpos IgY em galinhas poedeiras *White Leghorn* e anticorpos IgG em coelhos Nova Zelândia contra proteínas de fímbrias K88 e F41 de ETEC. As amostras de ovos e soros de ambas as espécies foram coletadas ao longo do experimento para análise dos seguintes parâmetros: níveis e títulos de anticorpos às proteínas fimbriais e *E. coli*, perfil dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos produzidos e o efeito antibacteriano de IgY do ovo e dos soros sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺. Os resultados obtidos mostraram que galinhas e coelhos responderam de modo semelhante aos antígenos utilizados. Os soros e os anticorpos IgY não imunes parcialmente purificados de ovos têm a capacidade de reconhecer diversos antígenos de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺, inclusive os antígenos fimbriais K88 e F41. Além disso, foi observado um aumento da reatividade às fímbrias K88 e F41 após as imunizações. Já os soros não imunes de coelhos apresentaram um baixo reconhecimento dos antígenos de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺ e as imunizações influenciaram apenas em relação às proteína usadas na indução de resposta. Os soros (não imune e imune) de galinhas foram capazes de interferir no crescimento bacteriano da cepa K88, enquanto os soros de coelhos não mostraram a mesma atividade antimicrobiana. Quanto às propriedades imunoquímicas de anticorpos IgY obtidos das gemas, os resultados mostraram que houve um aumento dos títulos de IgY anti-K88. A avidéz de IgY da gema permaneceu elevada do início ao término do experimento, e assim como no soro, apresentou um reconhecimento prévio das bactérias e após as imunizações foi observado um aumento da resposta somente para o antígeno corresponde à fímbria K88. Em todas as concentrações avaliadas neste trabalho, IgY imune e não imune foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* K88⁺. Em conclusão, os anticorpos de mamíferos e aves apresentarem propriedades imunoquímicas semelhantes. No entanto, apenas anticorpos de aves mostraram a capacidade de reconhecer as fímbrias presentes na ETEC e interferir no crescimento de ETEC K88⁺. Portanto, a inibição bacteriana demonstrada pelos anticorpos IgY sugere que estes anticorpos oferecem aplicabilidade para tratamento e prevenção de doenças entéricas como a colibacilose uma alternativa para a produção de anticorpos policlonais em mamíferos.

Palavras-chave: Aves. Coelhos. Anticorpos IgY. Colibacilose. Fímbrias e imunoterapia. ETEC.

CHEIRUBIM, Ana Paula. **Production and Immunochemical characterization of the biological activity of antibodies against K88 and F41.** 2014. 71 p. Dissertation (Master in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Infectious diseases account for 20% of livestock losses worldwide. Among the enteric diseases among the enteric diseases that cause losses in swine, colibacillosis is one of the most important. In pigs, the ETEC associated with enteric disorders express K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41, F42 and F18 fimbriae. In this study, was investigated the production of IgY antibodies in White Leghorn laying hens and IgG antibodies in New Zealand rabbit against proteins of F4 (K88) and F41 fimbriae of ETEC. Serum and eggs samples of both species were collected during the experiment for analysis of the following parameters: levels and titers of antibodies to fimbrial proteins and *E. coli*, profile of the antigens recognized by the antibodies produced and the antibacterial effect of IgY from the egg and the sera on the growth of *E. coli* K88⁺. The results show that chickens and rabbits responded similarly to the antigens used. The sera and non-immune IgY antibodies partially purified from eggs have the ability to recognize different antigens of *E. coli* K88⁺ and *E. coli* F41⁺, including the fimbrial antigens K88 and F41. However, was observed an increased reactivity to K88 and F41 fimbriae after the immunizations. The non-immune serum from rabbits showed a low recognition of *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺ antigens and immunizations influenced only the proteins used in response induction. Sera (nonimmune and immune) from chickens were able to interfere with bacterial growth of K88 strain, while rabbit sera did not show the same antimicrobial activity. With respect to immunochemical properties of IgY antibodies obtained from the yolks, the results showed that there was an increase in titer of anti-K88 IgY. The avidity of egg yolk IgY remained high from beginning to end of the experiment, and as well as in serum, presented a prior recognition of bacteria and after immunizations there was an increase of response only to the antigen corresponds to K88 fimbriae. At all concentrations evaluated in this study, immune and non-immune IgY were able to inhibit the growth of *E. coli* K88⁺. In conclusion, mammalian and avian antibodies exhibit similar immunochemical properties. However, only chickens antibodies showed the ability to recognize the fimbriae present in ETEC and interfering in the growth of ETEC K88⁺. Therefore, the bacterial inhibition demonstrated by IgY antibodies suggests that these antibodies offer applicability for treatment and prevention of enteric diseases such as colibacillosis and an alternative for the production of polyclonal antibodies in mammals.

Keywords: Poultry. Rabbits. IgY antibody. Colibacillosis. Fimbriae and immunotherapy. ETEC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Avaliação da produção de anticorpos anti proteínas K88 e F41	36
Figura 2:	Aumento da avidéz em anticorpos IgY e IgG de coelho.	38
Figura 3:	Reatividade do soro de galinhas poedeiras e coelhos contra <i>E. coli</i> K88 ⁺ e <i>E. coli</i> F41 ⁺ após imunização com as proteínas K88 e F41	39
Figura 4:	Perfil de reconhecimento de soros anti-k88 ou anti-F41 e soros não imune de galinhas poedeiras e de coelhos de antígenos recombinantes ou nativos de <i>E. coli</i>	41
Figura 5:	Soros específico e inespecífico de galinhas tem efeito inibitório sobre o crescimento de <i>E. coli</i> K88 ⁺	43
Figura 6:	Perfil eletroforético de anticorpos IgY extraídos de gema dos ovos de galinhas imunizadas com K88	55
Figura 7:	Anticorpos IgY da gema apresentam altos índices de avidéz.....	56
Figura 8:	Perfil de reconhecimento de anticorpos IgY não imune e anti-K88 de galinhas poedeiras ao antígeno recombinante ou nativo de <i>E. coli</i>	57
Figura 9:	Anticorpos IgY apresentam efeito antibacteriano sobre <i>E. coli</i> K88 ⁺ em todas as concentrações avaliadas.	59
Figura 10:	IgY tem efeito antibacteriano sobre <i>E. coli</i> Hb101 apenas em alta concentração.59	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Títulos de anticorpos anti proteínas de K88 e F41	37
Tabela 2.	Títulos de anticorpos IgY anti-K88	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
ANOVA	Análise de variância
BALT	Tecido linfóide associado aos brônquios
CALT	Tecido linfóide associado a conjutiva
CFU	Unidades formadoras de colônias
CH	Cadeia pesada
DAB	3,3-diaminobenzidina
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> F41 ⁺	<i>Escherichia coli</i> com fímbria F41
<i>E. coli</i> HB101	<i>Escherichia coli</i> HB101 desprovida de fímbria
<i>E. coli</i> K88 ⁺	<i>Escherichia coli</i> com fímbria K88
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
F41	Proteína fimbrial F41
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
GALT	Tecido linfóide associado ao trato intestinal
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
IL-6	Interleucina 6
K88	Proteína fimbrial K88
kDa	Kilodaltons
MALT	Tecido linfoide associado às mucosas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>

MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PBST	Tampão fosfato salina com 0,05% de Tween 20
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TMBZ	Tetrametilbenzidina
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
U-ELISA	Unidade de ELISA

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Sistema imune de aves	16
2.2	Imunoglobulina Y (IgY)	17
2.3	Comparação IgY de aves e IgG de mamíferos	19
2.4	O uso de IgY em imunoterapia	21
2.5	Colibacilose	23
3.	ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO E AÇÃO BIOLÓGICA DE SOROS ANTI PROTEÍNAS RECOMBINANTES K88 E F41 PRODUZIDOS EM COELHOS E GALINHAS POEDEIRAS	28
3.1	Resumo	28
3.2	Introdução	29
3.3	Material e métodos	31
3.4	Resultados	36
3.5	Discussão	43
4.	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-FÍMBRIA K88: CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E SUA AÇÃO CONTRA <i>E. COLI</i> K88⁺	47
4.1	Resumo	47
4.2	Introdução	48
4.3	Material e métodos	49
4.4	Resultados	54
4.5	Discussão	60
5.	CONCLUSÕES GERAIS	63
	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os anticorpos são glicoproteínas circulantes sintetizadas pelos vertebrados em resposta à exposição a estruturas não próprias conhecidas como antígenos. Eles são os mediadores primários da imunidade humoral contra todas as classes de micro-organismos, apresentando alta especificidade e diversidade em sua capacidade de reconhecimento de estruturas moleculares. Devido a tais características, os anticorpos são excelentes ferramentas para uso em diversas análises imunoquímicas de quantificação e identificação de moléculas de interesse biológico e/ou médico (ABBAS, 2012).

Além de serem ferramentas essenciais das reações imunoquímicas, os anticorpos encontram uma ampla utilização como mediadores de imunidade passiva contra diversas doenças infecciosas. Atualmente, o uso de anticorpos para imunização passiva é uma área de interesse nas pesquisas devido ao rápido desenvolvimento de resistência de muitos micro-organismos a agentes antimicrobianos, principalmente aos antibióticos. Estudos recentes têm mostrado que a imunização passiva pela administração oral de anticorpos específicos a patógenos é uma proposta atrativa para estabelecer uma imunidade protetora, especialmente contra patógenos gastrointestinais, em humanos e animais (CARLANDER, 2000; CHALGHOUMI, 2009; JIN, 1998; MINE & KOVACS-NOLAN, 2002; SITNIK, 2013).

Atualmente, a maioria dos anticorpos disponíveis comercialmente são purificados do sangue de mamíferos a partir de procedimentos invasivos que causam um grande nível de estresse no animal utilizado. Além disso, os anticorpos produzidos em mamíferos podem causar interferência nas reações imunoquímicas devido à interação com outros componentes do soro destes animais. Por isso, a produção de anticorpos em galinhas poedeiras vêm atraindo grande interesse (CARLANDER, 1999; GUIMARÃES, 2008; KARLSSON, 2004; NARAT, 2003; SCHADE, 1996; SCHADE, 2005; SILVA & TAMBOURGI, 2010; SPILLNER, 2012; WARR, 1995).

Contudo, para a aplicação prática de técnicas de imunização passiva, há a necessidade da produção em grande escala de anticorpos a um baixo custo. O uso de galinhas poedeiras como uma fonte de anticorpos policlonais seria ideal para esta finalidade. O desenvolvimento técnico-científico da suinocultura nacional levou o Brasil ao quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína de 2005 a 2013, representando 10% do volume exportado de carne no mundo e com lucros de aproximadamente US\$ 1 bilhão por

ano. Portanto, qualquer evento que possa ocasionar a interrupção temporária ou permanente da produção animal, como doenças de causas infecciosas, desencadeia consequências locais e significativo impacto na economia nacional (ABPA, 2014).

Considerando os fatores de produção, os processos infecciosos entéricos são um dos fatores que mais prejudicam a estabilidade de sistemas produtivos, causando um impacto que excede a 20% de perdas na produção animal. Dentre as enfermidades entéricas preocupantes na suinocultura, está a colibacilose suína. A colibacilose é causada pela bactéria *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), e acomete suínos em períodos neonatais e pós-demame, sendo responsável pela mortalidade de animais desmamados. A capacidade de causar doença das ETECs é dependente da produção de adesinas (fímbrias) e enterotoxinas. Cepas de ETEC são capazes de sintetizar uma variedade de fímbrias que desempenham um papel fundamental na adesão e colonização do epitélio intestinal, o que permite a ação de enterotoxinas. Em suínos, as fímbrias comumente relacionadas com distúrbios entéricos são as fímbrias K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41, F42 e F18.

Visando o desenvolvimento de uma ferramenta alternativa para métodos imunoterapêuticos e profiláticos para a colibacilose, neste trabalho investigamos a produção de anticorpos IgY de galinha e anticorpos IgG de coelho contra proteínas de fímbrias K88 (F4) e F41 de *E. coli* causadora de colibacilose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema imune de aves

O sistema imune está presente em todas as espécies animais protegendo o hospedeiro de diversos microrganismos invasores, células malignas e moléculas não próprias. Em sentido amplo, o sistema imune em aves é semelhante ao sistema imune observado em mamíferos. O sistema imune é composto por um conjunto de mecanismos de defesa que podem ser divididos em dois tipos básicos, um chamado de imunidade inata e outro de imunidade adquirida. A imunidade inata compreende de múltiplos mecanismos e atua como primeira linha de defesa, enquanto a imunidade adaptativa exhibe alta especificidade para um antígeno em particular (CARLANDER, 2002).

Em vertebrados existe um conjunto de órgãos diretamente relacionados com os mecanismos de imunidade e são chamados de órgãos linfóides primários ou secundários. Em aves os órgãos linfóides primários – também chamados de centrais - são representados pela medula óssea, timo e Bursa de Fabricius, enquanto que órgãos linfóides secundários – também chamados de órgãos linfóides periféricos - incluem o baço, glândula de Harder, linfócitos circulantes, e um extenso tecido linfóide associado às mucosas (MALT). O MALT é composto por tecidos linfóides associados ao brônquio (BALT), tecidos linfóides associados ao tecido conjuntivo (CALT) e tecido linfóide associado ao trato intestinal (GALT) (JEURISSEN, 1989; SPILLNER, 2012). Além disso, a GALT de aves inclui uma estrutura linfóide organizada tais como tonsilas cecais, placas de Peyer, divertículo de Meckel e agregados de linfócitos espalhados ao longo da lâmina própria do trato intestinal (LILLEHOJ, 1996). As galinhas, no entanto, não apresentam linfonodos encapsulados como encontrado em mamíferos (JEURISSEN, 1989), sendo o baço o principal órgão a direcionar uma resposta a antígenos administrados sistemicamente, e importante para o processamento de antígeno e posterior produção de anticorpos (JEURISSEN, 1991; SPILLNER, 2012).

Os anticorpos são moléculas produzidas por células B com especificidade para um antígeno em particular. As células B – também chamadas de linfócitos B - são originárias do fígado embrionário, saco vitelino ou medula óssea. Estas células migram para a bursa de Fabricius onde ocorre sua maturação para posterior distribuição em tecidos periféricos como sangue, tonsilas cecais, glândulas de Harder e medula óssea (CHALGHOUMI, 2009).

Os anticorpos são glicoproteínas que têm como propriedade básica a ligação específica ao antígeno, podendo desencadear reações como neutralização, aglutinação, precipitação, opsonização e ativação do sistema complemento (CARLANDER, 1999). Nas aves são encontradas três classes de imunoglobulinas, chamadas de IgA, IgM e IgY, as quais são análogas às imunoglobulinas de mamíferos (CARLANDER, 2001). A transferência de anticorpos IgY de galinhas via gema para a circulação do embrião ocorre de forma semelhante à transmissão de IgG de mamíferos através da placenta (YAMAMOTO, 1975). Dentre os 3 isotipos, a IgY é o anticorpo sérico mais abundante em aves, com concentração de 5 a 15 mg/mL em galinhas poedeiras, enquanto IgM e IgA apresentam uma concentração sérica de 1-3 mg/mL e 0,3 e 0,5 mg/mL, respectivamente (SPILLNER, 2012). Os anticorpos IgA e IgM têm estrutura, peso molecular e mobilidade eletroforética semelhantes às IgA e IgM de mamíferos (CHALGHOUMI, 2009).

A IgM de aves é estruturalmente e funcionalmente homóloga à IgM em mamíferos (LESLIE & CLEM, 1969), uma molécula pentâmera de alto peso molecular presente no soro e o primeiro anticorpo gerado durante a resposta imune primária. Além disso, IgM é a principal classe de imunoglobulina expressa na superfície de células B aviárias (RATCLIFFE, 2006).

A IgA de aves é encontrada no soro e secreções, sendo também homóloga à IgA de mamíferos (RATCLIFFE, 2006). A IgA também pode ser encontrada no ovo com ausência de seu componente secretor (YAMAMOTO, 1975), e juntamente com a IgM em pequenas quantidades na gema e em grande quantidade na clara.

2.2 Imunoglobulina Y (IgY)

IgY é um anticorpo sérico de baixo peso molecular gerado principalmente na resposta imune secundária (RATCLIFFE, 2006). Os anticorpos IgY podem ser encontrados em aves, répteis e anfíbios, enquanto a IgG ocorre apenas em mamíferos (SPILLNER, 2012; WARR, 1995). Inicialmente a IgY foi denominada IgG, por apresentar funções e concentrações séricas semelhantes à IgG de mamífero, porém IgY e IgG apresentam diferenças marcantes em suas estruturas, não sendo IgG um termo adequado ao anticorpo mais abundante das aves (LESLIE & CLEM, 1969). Além disso, análises moleculares indicam que IgY é o ancestral evolutivo dos anticorpos IgG e IgE de mamíferos, e que a IgY estaria mais intimamente relacionada estruturalmente à IgE do que à IgG (SCHADE, 1996; WARR, 1995). O termo IgY foi

proposto e usado pela primeira vez em 1969, referindo-se aos anticorpos encontrados na gema de ovo, devido ao termo inglês *Yolk*, que significa gema (LESLIE & CLEM, 1969).

Assim como anticorpos de mamíferos, a IgY possui a configuração básica de um anticorpo. A IgY tem duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, e um peso molecular de aproximadamente 160 a 180 kDa (LESLIE & CLEM, 1969; SCHADE, 2005; SUN 2001; WARR, 1995).

As cadeias pesadas de IgY são do tipo upsilon (ν) e apresentam um peso molecular de 65 kDa. Cada cadeia pesada é composta por um domínio variável e quatro domínios constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4) (SUN, 2001; WARR, 1995). As cadeias leves de IgY possuem um peso molecular de aproximadamente 19 a 23 kDa (LESLIE & CLEM, 1969). Cada cadeia leve tem uma região variável e uma região constante (SUN, 2001; WARR, 1995).

Comparações das sequências das regiões constantes de IgG e IgY mostram que os domínios CH2 e CH3 de IgG são mais intimamente relacionados aos domínios CH3 e CH4 de IgY, respectivamente, e que o equivalente do domínio CH2 é ausente na cadeia pesada de IgG de mamíferos. O domínio CH2 de IgY provavelmente corresponde à região de dobradiça dos anticorpos IgG (WARR, 1995). A ausência da região de dobradiça faz com que a IgY seja mais rígida do que a IgG de mamíferos em relação à mobilidade da porção Fab, e esta rigidez afeta a capacidade do anticorpo em precipitar ou aglutinar antígenos (CARLANDER, 2002). Essa rigidez limita o uso de IgY em algumas reações de imunodiagnóstico baseadas na precipitação de antígenos, como o teste de imunodifusão. Assim, a região de dobradiça é uma característica unicamente da estrutura de IgG de mamíferos (WARR, 1995).

Como nos anticorpos de mamíferos, a porção Fc de IgY é responsável pelas funções efetoras desses anticorpos (CARLANDER, 2002; SCHADE, 2005). Estas funções incluem precipitação antígeno específica, fixação do complemento e desencadeamento de reações de anafilaxia, esta última uma função atribuída a anticorpos IgE de mamíferos (CARLANDER, 2002; FAITH & CLEM, 1973).

A IgY presente no plasma é passada de mãe para o embrião via gema, em um processo que resulta em altas concentrações do anticorpo na gema do ovo (SCHADE, 2005). A deposição de IgY na gema dura de 3 a 6 dias e se inicia precocemente, e envolve receptores presentes nas membranas de oócitos em desenvolvimento. Esses receptores sequestram grande quantidade do anticorpo presente no plasma e o armazena posteriormente na gema.

Essa transferência ocorre em poucas quantidades nos dias iniciais de desenvolvimento do oócito, aproximadamente 8 mg/mL, e aumenta consideravelmente nos três últimos dias antecedentes da ovulação, atingindo uma concentração de 45 mg/mL de IgY na gema (KOWALCZYK, 1985; WOOLEY, 1995; YAMAMOTO, 1975). A transferência de IgY ocorre de forma seletiva, em um processo que envolve sequências de aminoácidos encontradas nos domínios constantes da cadeia pesada (CH2 e CH3) (MORRISON, 2001). A quantidade de IgY transferida independe do tamanho do ovo e está relacionada com sua concentração plasmática (LI, 1998). Através desta transferência de anticorpos, os anticorpos derivados maternalmente fornecem uma imunidade passiva ao feto em desenvolvimento antes que este seja capaz de gerar sua própria resposta humoral (MORRISON, 2001). Na literatura há controversas em relação às concentrações de IgY sérica e na gema (SCHADE, 2005).

2.3 Comparação IgY de aves e IgG de mamíferos

Atualmente, os mamíferos mais frequentemente utilizados para produção de anticorpos policlonais e monoclonais para fins de pesquisa e diagnóstico são coelhos e camundongos, respectivamente. Por outro lado, para a produção de anticorpos para imunoterapia passiva são utilizados mamíferos de grande porte, como o cavalo, devido à necessidade de obtenção de grandes quantidades de anticorpos. Em relação aos anticorpos policlonais os maiores problemas encontrados são a purificação e processamento de anticorpos produzidos do sangue de mamíferos serem muito laboriosos e o elevado estresse ao qual o animal que está sendo utilizado é submetido (NARAT, 2003). Neste aspecto não é surpreendente que métodos alternativos de produção de anticorpos têm sido investigados.

Nesta perspectiva, a tecnologia de produção de anticorpos IgY em galinhas poedeiras tem uma grande vantagem em relação à produção em mamíferos. Galinhas imunizadas transferem anticorpos específicos à gema de ovo, e estes anticorpos podem ser obtidos por um método não invasivo pela simples coleta de ovos (SPILLNER, 2012).

Além do bem-estar animal, a produção de anticorpos em galinhas poedeiras dispõe de outras vantagens. A produção de uma galinha corresponde à produção de um mamífero de médio/grande porte como ovelha, cabra ou cavalo. Considerando que uma galinha produz em média 6 ovos por semana, contendo 15 mL de gema fornecendo 50-100 mg de IgY

(SCHADE, 1996), esta mesma galinha é capaz de produzir uma faixa de 17 – 35 g de IgY total por ano (SCHADE, 2005).

Devido à distância filogenética entre aves e mamíferos, a produção de anticorpos contra antígenos de mamíferos é maior em aves do que nos próprios mamíferos (SPILLNER, 2012). Além disso, as diferenças estruturais entre os anticorpos de aves e mamíferos fazem com que a IgY ative a cascata do complemento da ave, porém não seja capaz de ativar o sistema complemento de mamíferos (LARSSON, 1992); a IgY não se liga às proteínas A ou G (KRONWALL, 1974); não reage com fatores reumatóides (LARSSON 1988, 1993); e nem com receptores de IgG na superfície de células de mamíferos (ERHARD, 1993).

Quando comparada a estabilidade de anticorpos IgY a anticorpos de diferentes espécies mamíferas sob condições de aquecimento, acidez e desnaturação, em todos os parâmetros avaliados a IgG de coelho apresenta melhor desempenho, sendo esta a mais estável dentre as espécies estudadas. Porém, apesar de o anticorpo IgY não ter a estabilidade semelhante à IgG de coelho, a IgY demonstra ser tão sensível quanto às imunoglobulinas de outras espécies de mamíferos, sugerindo que esta estabilidade não seja uma característica típica de IgG de mamíferos, mas sim uma estabilidade molecular peculiar da IgG de coelho (SHIMIZU, 1993). Os pontos isoelétricos de ambos os anticorpos estão na faixa de 5.7 – 7.6 para IgY, e 6.1 - 8.5 para IgG (DAVALOS-PANTOJA, 2001).

A IgY apresenta maior hidrofobicidade de superfície do que anticorpos IgG. Esta hidrofobicidade está correlacionada à flexibilidade conformacional molecular da proteína, que por sua vez aumenta a taxa de digestão da molécula Ig por proteases, sugerindo que a IgY possui uma conformação geral altamente flexível e mutável (SHIMIZU, 1993). A propriedade hidrofóbica demonstra ter uma finalidade útil para uma adsorção estável em partículas de látex, ligando-se o fragmento Fc fortemente à microesfera e retendo a sua atividade de ligação específica ao antígeno (DAVALOS-PANTOJA, 2000).

Além disso, a IgY pode permanecer estável por meses, mantendo sua atividade por 10 anos a 4°C, após 6 meses em temperatura ambiente ou por um mês a 37°C (NARAT, 2003; RAJ, 2004).

Todas essas características mostram que anticorpos IgY podem ser aplicados em uma variedade de áreas da pesquisa, diagnósticos, médicas e biotecnológicas, servindo de ferramenta útil para reduzir as interferências causadas pelo uso de anticorpos IgG de mamíferos em técnicas imunológicas. No entanto, segundo Schade (1996), apesar das

vantagens oferecidas pelos anticorpos IgY, o método ainda não é amplamente adotado. Uma das dificuldades que limitam o uso de IgY envolve sua extração. A gema do ovo contém uma grande quantidade de lipídios, e este deve ser retirado para não prejudicar a atividade de IgY em imunoenaios (SPILLNER, 2012). O fato de IgY não se ligar à proteína A ou G, método utilizado para isolamento de IgG de mamíferos, representa uma dificuldade uma vez que diversas metodologias de purificação de anticorpos são baseados na ligação do anticorpo às proteínas A/G (SCHADE, 1996). Porém, diversas metodologias simples já foram desenvolvidas para solucionar este problema, alcançando extração de anticorpos com altos graus de pureza, envolvendo a precipitação proteica com sulfato de amônia (AKITA & NAKAI, 1992), ácido caprílico (MCLAREN, 1994) ou polietilenoglicol – PEG (POLSON, 1990), além de separação por técnicas de cromatografia (DONG, 2008; HANSEN, 1998; KURONEN, 1997; TU, 2001) e ultracentrifugação (KIM & NAKAI, 1998).

2.4 O uso de IgY em imunoterapia

A disponibilidade imediata de antibióticos na década de 1950 resultou em sua utilização generalizada e indiscriminada como agente terapêutico ou subterapêutico, e promotor de crescimento para a produção de animais. Desde então, há uma preocupação crescente no uso de antibióticos como promotores de crescimento em relação ao desenvolvimento de populações bacterianas resistentes (FULLER, 1989). A resistência microbiana é uma preocupação mundial e refere-se a cepas de microrganismos que são capazes de multiplicar-se mesmo na presença de altas concentrações de antimicrobianos (WANNMACHER, 2004). Os antimicrobianos, como antibióticos, constituem medicamentos que influenciam não apenas o indivíduo em tratamento, mas todo o ecossistema onde este está inserido, com repercussões potenciais profundas, como por exemplo, o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (AVORN, 2000; WANNMACHER, 2004). Por isso, o uso de antibióticos, como fator de crescimento na alimentação animal, é cada vez mais restrito. Além do problema da resistência aos antimicrobianos, o qual está relacionado à queda em sua eficiência, o uso de fatores de crescimento está associado a outros problemas como a permanência de resíduos não degradáveis nos alimentos, a transmissão de bactérias resistentes ao homem através do consumo de carne e derivados, reações alérgicas em pessoas previamente sensibilizadas e sua toxicidade (SMITH, 1975). Em virtude disto, há três

estratégias básicas que podem ser empregadas para prevenção e controle de doenças infecciosas: (1) medidas de higiene preventiva, (2) vacinação e (3) estratégias nutricionais e aditivos alimentares. Após a proibição do uso de antimicrobianos na ração animal como método subterapêutico na Europa, o uso de aditivos alimentares é cada vez mais aceito como uma valiosa forma de combate a infecções causadas por *Salmonella* e outros microrganismos. Dentre os candidatos para substituição de antibióticos estão os ácidos orgânicos, prebióticos, probióticos, simbióticos, produtos de exclusão competitiva, bacteriófagos, e mais recentemente, o uso de anticorpos (CHALGHOUMI, 2009). A administração de anticorpos específicos a patógenos em hospedeiros é uma alternativa atrativa para estabelecer imunidade protetora, especialmente contra patógenos gastrointestinais, ambos em humanos e animais (CARLANDER, 2002).

A imunidade passiva compreende da transferência de imunidade humoral na forma de anticorpos já produzidos, de um indivíduo ao outro. A imunidade passiva pode ocorrer naturalmente, quando anticorpos maternos são transferidos para o embrião e pode ser induzido artificialmente, quando altos níveis de anticorpos específicos para determinado patógeno ou uma toxina são obtidos de indivíduos imunizados e estes são administrados em indivíduos não imunes. A transferência de anticorpos pode ser realizada via sistêmica, intravenosa ou via oral. Esta última, a via oral, é a via de escolha para tratamento de infecções do trato intestinal (CHALGHOUMI, 2009). O aumento de bactérias resistentes a antibióticos e a necessidade de tratar patógenos que não respondem a antibióticos, como patógenos virais, têm estimulado muitas pesquisas em relação à administração de anticorpos como uma alternativa a antibióticos para tratamento de infecções entéricas (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002). A produção de anticorpos policlonais para finalidades de diagnóstico e imunoterapia exige que o hospedeiro seja capaz de responder a uma variedade de imunógenos com a produção de anticorpos de alta especificidade e avidéz (WOOLLEY, 1995). Além disso, algumas das reais aplicações da imunoterapia de anticorpos para doenças infecciosas em animais e em humanos exigirão grandes quantidades de anticorpos altamente purificados (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002). Neste aspecto o uso de mamíferos para uma produção de anticorpos policlonais em escala industrial é um complicador, uma vez que a produção de anticorpos em mamíferos está associada a um grande estresse animal, além de altos custos para manutenção animal e purificação dos anticorpos específicos. Por isso, a produção em grande escala de anticorpos em gema de ovos é uma alternativa para o desenvolvimento de

novas alternativas na área de imunoterapia passiva e imunoprofilaxia de uma variedade de infecções virais e bacterianas na medicina veterinária e humana (SCHADE, 2005).

Recentemente diversos estudos tem investigado a ação de anticorpos IgY contra bactérias (CHAKRAVARTHI, 2010; CHALGHOUMI, 2009; CHANG, 1999; GUIMARÃES, 2009; HERMANS, 2014; HIRAI, 2010; KASSIM, 2012; LEE, 2000; LEE, 2002; LI, 2012; LI, 2014; MAHDAVI, 2010; MARQUARDT, 1999; SHIN, 2002; SONG, 2007; SONG, 2009), vírus (GARDER, 1982; ROLLIER, 2000; WEN, 2012), parasita (LEE, 2009) e antígenos proteicos (FENG, 2013; YOU, 2014).

2.5 Colibacilose

Escherichia coli (*E. coli*) é uma bactéria gram-negativa e anaeróbica facultativa predominante na flora do cólon humano e animal. *E. coli* geralmente permanece confinada ao lúmen intestinal, no entanto, em hospedeiros debilitados e imunossuprimidos, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, mesmo cepas normalmente não-patogênicas de *E. coli* podem causar infecção (NATARO, 1998).

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) está associada à diarreia e representa um dos principais problemas de saúde em humanos e animais (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002). Cepas de ETEC são reconhecidas como causa de doenças diarreicas em leitões, na qual esta doença é uma causa de infecção letal em animais neonatos (Nataro, 1998). A importância da diarreia está associada com custos significativos do tratamento e perda de peso do animal, aumentando a susceptibilidade a outras doenças e baixo número de animais para a produção (SITNIK, 2013).

Diarreia pós-desmame, também denominada de colibacilose entérica pós-desmame, é uma importante causa de morte em suínos desmamados em todo o mundo (FAIRBROTHER, 2005). A ETEC é a causa mais comum de colibacilose entérica encontrada em bezerros recém-nascidos, leitões e crianças em países em desenvolvimento (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002). Infecção por *E. coli* em suínos desmamados pode se manifestar com diarreia na qual ocorre durante a primeira semana de pós-desmame e frequentemente resulta em redução de peso. Diversos fatores, como estresse do desmame, ausência de anticorpos provenientes do colostro da mãe e alterações alimentares contribuem para a gravidade desta doença (FAIRBROTHER, 2005). Leitões neonatos ingerem a ETEC presente em seu

ambiente, especialmente nas glândulas mamárias da mãe, provenientes das fezes com ETEC de porcas e leitões com diarreia, ou de leitões portadores assintomáticos (GYLES & PRESCOTT, 2010), e após estabelecimento da bactéria no intestino, esta se prolifera rapidamente atingindo um número massivo na ordem de 10^9 CFU por grama de tecido no jejuno e íleo (FAIRBROTHER, 2005).

A diarreia é o resultado da combinação de dois importantes fatores de virulência de cepas ETEC, a capacidade de aderência e a produção de enterotoxinas. As adesinas ou fímbrias medeiam a adesão bacteriana aos enterócitos do hospedeiro para iniciar a colonização da *E. coli*, enquanto as enterotoxinas são responsáveis por perturbar a homeostasia de fluídos no intestino delgado do hospedeiro e causar a hiper secreção de fluídos, resultando na diarreia (ZHANG, 2009). A adesão da bactéria ao tecido do hospedeiro no local de infecção desempenha papel chave na patogênese, sendo de suma importância para muitos micro-organismos patogênicos, uma vez que estes têm que competir com micro-organismos comensais para uma colonização bem sucedida na superfície epitelial do hospedeiro, além de atuar na resistência à ação de lavagem do peristaltismo intestinal (BROEK, 2000; GAASTRA, 1982).

As adesinas, também denominadas fímbrias, são apêndices fibrilares presentes na superfície das bactérias. Cada unidade fimbrial consiste de centenas de cópias de uma subunidade principal que compõe a estrutura e confere a especificidade antigênica da fímbria, além de também possuir diversas cópias de subunidades menores, uma das quais pode ser uma adesina com propriedade de ligação específica (BROECK, 2000; GYLES & PRECOTT, 2010).

Baseado em suas propriedades hemaglutinantes, as fímbrias são geralmente classificadas como manose-sensíveis ou fímbria do tipo 1 e manose-resistente (BROECK, 2000), uma vez que a presença de manose inibe a ligação da fímbria ao seu receptor, impedindo a hemaglutinação.

Em suínos, as adesinas fimbriais de ETEC mais comumente encontradas são as fímbrias K88 (também denominada de F4), K99 (ou F5), 987P (ou F6), F41 e F18 (GYLES & PRESCOTT, 2010). A ETEC portadora das fímbrias K99 (F5), 987P (F6) e F41 colonizam principalmente o jejuno e íleo posterior, enquanto ETEC com fímbria K88 (F4) tende a colonizar a região de jejuno-íleo anterior, além de ser espécie-específico, ocorrendo principalmente em suínos (FAIRBROTHER, 2005; GYLES & PRESCOTT, 2010).

Fímbrias K88 (F4) são flexíveis e ocorrem em 3 variantes, F4ab, F4ac e F4ad. Entre estas variantes, F4 ac é o tipo mais expresso em cepas ETEC isoladas de diarreia em suínos (GONZALEZ, 1995). A região antigênica „a“ é a região conservada entre as variantes, enquanto a segunda região antigênica apresenta variação e são designadas „b“, „c“ ou „d“ (FAIRBROTHER, 2005). A fímbria K88 permite a bactéria proliferar no intestino delgado do suíno, pela adesão oferecida por esta estrutura pilosa na primeira fase da infecção (SELLWOOD, 1980). As manifestações de diarreia associada à *E. coli* com morte súbita ou diarreia severa frequentemente são associadas com a *E. coli* portadora de fímbria F4 (K88) (FAIRBROTHER, 2005). A ligação da fímbria K88 a enterócitos suínos necessita de receptores específicos, os quais são encontrados nas bordas em escovas do intestino do suíno com um fenótipo positivo para que esta adesão ocorra, enquanto suínos que não possuem estes receptores, apresentam um fenótipo negativo, não havendo adesão do micro-organismo e consequentemente a infecção (SELLWOOD, 2002).

As fímbrias F41 são amplamente expressas juntamente com a fímbria K99 em ETEC, embora algumas cepas, principalmente em suínos, possam expressar apenas F41. A colonização mediada por ETEC portadora da fímbria F41 é observada no intestino delgado posterior em suínos, bezerros e cordeiros neonatais, resultando em diarreia com a presença ou ausência da fímbria K99 (GYLES & PRESCOTT, 2010).

Com a atual consciência dos problemas associados com o uso excessivo de antibióticos, alternativas para a prevenção da diarreia em suínos têm sido necessárias. Segundo Huang (2003), vacinas contendo fímbrias K88 purificadas, ETEC inativada ou *E. coli* modificada expressando fímbria K88 têm sido utilizadas em suínos em gestação, para transferência passiva através da amamentação fornecendo aos leitões proteção contra ETEC. Porém, embora estas vacinas comprovem sua eficácia para a prevenção da doença, continua limitante o uso generalizado pelo fato que bactérias não podem ser totalmente inativadas e aos altos custos de produção e armazenamento destas vacinas. A indução de uma resposta imune em animais jovens, doentes e/ou infectados através de vacinação ativa, apresenta uma estratégia insatisfatória, uma vez que a resposta imune ativa leva dias para se desenvolver (FAIRBROTHER, 2005). Já a imunoterapia passiva não necessita da ativação do sistema imune para controlar o patógeno e consequentemente a infecção. O efeito protetor de IgY anti-ETEC contra colibacilose em suínos tem sido previamente estudado (XIAO-YU, 2009; JIN, 1998; LI, 2009; KOVACS-NOLAN & MINE, 2005, 2012; MARQUARDT, 1999;

RIBEIRO, 2005; SUNWOO, 2010; YOKOYAMA, 1992). IgY pode ser uma alternativa de fonte de imunoglobulinas na prevenção de infecções por ETEC, e seu efeito inibidor sobre a ligação de *E. coli* à mucosa intestinal vem sendo comprovado (JIN, 1998). A administração oral de anticorpos anti-fímbrias ETEC à leitões tem demonstrado causar um efeito protetor, oferecendo uma estratégia profilática e terapêutica em potencial para o controle de diarreia induzida por ETEC (MARQUARDT, 1999).

Portanto, devido à atual preocupação em relação ao aumento do número de microrganismos resistentes a antibióticos e a crescente procura de alternativas para combater agentes patogênicos como ETEC causadora de colibacilose em suínos, na perspectiva da utilização de anticorpos IgY patógeno específicos de gema de ovos de galinhas em métodos subterapêuticos e terapêuticos, este trabalho visa avaliar a produção e caracterização de anticorpos IgY de aves em comparação com IgG de coelho contra proteínas recombinantes de fímbrias K88 e F41, investigando o efeito antibacteriano de anticorpos IgY anti-K88 presentes na gema de ovos sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a produção de anticorpos contra proteínas de fímbrias K88 e F41 de *E. coli* em galinhas poedeiras e em coelhos Nova Zelândia e a ação antibacteriana de anticorpos IgY anti-K88 sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de anticorpos IgY anti-K88 e F41 em galinhas poedeiras;
- Avaliar a produção de IgG anti-K88 e F41 em coelhos;
- Estimar a avidéz de anticorpos IgY de galinhas poedeiras e IgG de coelho anti-K88 e F41 ao longo do período experimental;
- Estimar a avidéz de anticorpos IgY anti-K88 de galinhas poedeiras presentes na gema dos ovos;
- Caracterizar o perfil de antígenos de cepas de ETEC K88⁺ e F41⁺ reconhecidos por soros de galinhas poedeiras e coelho anti proteínas K88 ou F41;
- Caracterizar o perfil de antígenos de cepas de ETEC K88⁺ reconhecidos por anticorpos IgY anti-K88 presentes na gema dos ovos;
- Investigar a eficácia *in vitro* de soros de galinha e coelho anti-K88 contra cepa de *E. coli* K88⁺;
- Investigar a eficácia *in vitro* de anticorpos IgY anti-K88 presentes na gema dos ovos contra cepa de *E. coli* K88⁺.

3. ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO E AÇÃO BIOLÓGICA DE SOROS ANTI PROTEÍNAS K88 E F41 PRODUZIDOS EM COELHOS E GALINHAS POEDEIRAS

3.1 Resumo

A colibacilose é causada por cepas de bactérias *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e acomete suínos em períodos neonatais e pós-demame. Em suínos, as fimbrias relacionadas a distúrbios entéricos são F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18, F41 e F42. De um modo geral a colibacilose pode ser controlada com o uso de antibiótico. Recentemente anticorpos IgY da gema de ovos de galinhas têm atraído muito interesse como uma alternativa ao uso de antibióticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de anticorpos de coelho e galinhas poedeiras específicos contra proteínas recombinantes de fimbrias K88 e F41 e investigar seu efeito antibacteriano sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺. Os animais foram inoculados com as proteínas K88 e F41 nos dias 0, 15, 30, 45, 60 e 105. As amostras de soros de ambas as espécies foram coletadas ao longo do experimento para análise dos seguintes parâmetros: níveis e títulos de anticorpos às proteínas recombinantes, níveis de anticorpos contra *E. coli*, perfil de reconhecimento antigênico e o efeito antibacteriano de antissoros sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺. Os resultados obtidos mostraram que galinhas e coelhos apresentaram, de forma geral, níveis, títulos e avides de anticorpos semelhantes contra as proteínas K88 e F41. As galinhas poedeiras exibiram o reconhecimento de diversos antígenos de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺ antes da imunização com as fimbrias, e ainda foi observado um aumento da reatividade às fimbrias K88 e F41 após as imunizações. Já os soros não imunes de coelhos apresentaram um fraco reconhecimento dos antígenos das bactérias, e as imunizações não influenciaram neste perfil, diferindo das galinhas neste aspecto. Além disso, os antissoros de galinhas foram capazes de interferir no crescimento bacteriano da cepa K88, enquanto os antissoros de coelhos não mostraram a mesma atividade antimicrobiana. Em conclusão, apesar de os anticorpos de mamíferos e aves apresentarem atividade biológica semelhantes, apenas os antissoros de galinhas foram capazes de interferir no crescimento bacteriano. Portanto, a galinha poedeira oferece uma alternativa para a produção de anticorpos policlonais em mamíferos.

Palavras-chave: Aves, coelhos, anticorpos IgY, fimbrias, inibição de crescimento, soroterapia.

3.2 Introdução

A soroterapia consiste da administração de soluções purificadas de anticorpos obtidos a partir de animais imunizados para a prevenção ou tratamento de doenças infecciosas. A terapia à base de anticorpos séricos está disponível para doenças causadas por bactéria como *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, entre outros (GUIMARÃES, 2009). A produção de anticorpos policlonais para imunoterapia exige que o hospedeiro seja capaz de responder a uma variedade de imunógenos com a produção de antissoros de alta especificidade e alta avidéz (WOOLLEY, 1995). Mamíferos são tradicionalmente a fonte mais comum de anticorpos, uma vez que de forma geral atendem tais requisitos. Atualmente, os mamíferos mais usados para a produção de anticorpos policlonais para imunoterapia são cavalos (NARAT, 2003). Contudo, o uso de animais para a produção de anticorpos em mamíferos está associado a problemas éticos devido aos esquemas de imunização usados e a forma de obtenção de soro necessário para a purificação de anticorpos (BOLLEN, 1996).

Estudos recentes têm mostrado a possibilidade da utilização de anticorpos produzidos em galinhas poedeiras para fins de imunoterapia passiva. Em aves são encontradas três classes de anticorpos, IgA, IgM e IgY. IgA e IgM de aves são semelhantes à IgA e IgM de mamíferos em relação a estrutura, massa molecular e mobilidade eletroforética (LESLIE & CLEM, 1969). IgY é considerada o anticorpo de ave equivalente a IgG de mamífero, uma vez que IgY predomina a resposta imune secundária de aves e desempenha algumas funções atribuídas à IgG de mamíferos. Anticorpos IgY presente no soro de aves são incorporados à gema de ovos para conferir imunidade passiva ao embrião antes que este possa gerar sua própria resposta imune humoral (KOWALCZYK, 1985). Estima-se que uma gema de ovo tenha entre 100 a 150 mg de IgY. Assim, grandes quantidades de anticorpos IgY específicos podem ser obtidos pela imunização de galinhas com antígenos específicos, (CARLANDER, 2000; CHALGHUMI, 2009; FENG, 2013; KASSIM, 2011; SPILLNER, 2012). Com a crescente preocupação em relação ao aumento de microrganismos resistentes a antibióticos e seus efeitos residuais, anticorpos IgY tem atraído interesse como uma alternativa ao uso de antibióticos e inúmeros estudos têm demonstrado os efeitos de IgY a uma grande variedade de patógenos, especialmente gastrointestinais (CHALGHUMI, 2009; MINE & KOVACS-NOLAN, 2002). Um exemplo da utilização de anticorpos IgY é a produção de anticorpos em

galinhas poedeiras contra colibacilose causada por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas - ETEC.

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) está associada à diarreia e representa um dos principais problemas de saúde em humanos e animais (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002). Diarreia pós-desmame, também denominada de colibacilose entérica pós-desmame, é uma importante causa de morte em suínos desmamados em todo o mundo (FAIRBROTHER, 2005). A adesão da bactéria ao tecido do hospedeiro por meio de fímbrias no local de infecção desempenha papel chave na patogênese da ETEC. Em suínos, as adesinas fimbriais de ETEC mais comumente encontradas são as fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 e F41 (GYLES & PRESCOTT, 2010), sendo que cepas de ETEC contendo fímbria K88 as mais isoladas de diarreia em suínos. O efeito protetor de IgY anti-ETEC contra colibacilose em suínos tem sido previamente estudado (XIAO-YU, 2009; JIN, 1998; LI, 2009; KOVACS-NOLAN & MINE, 2005, 2012; MARQUARDT, 1999; RIBEIRO, 2005; SUNWOO, 2010; YOKOYAMA, 1992). A administração oral de anticorpos anti-fímbrias ETEC à leitões têm demonstrado causar um efeito protetor, oferecendo uma estratégia profilática e terapêutica em potencial para o controle de diarreia induzida por ETEC (MARQUARDT, 1999).

Portanto, este trabalho teve por objetivo analisar a produção e as características imunológicas de anticorpos IgY e anticorpos IgG contra proteínas K88 e F41, avaliando suas propriedades de interação com as bactérias portadora das fímbrias nativas, além do efeito antibacteriano dos antissoros sobre *E. coli* K88⁺.

3.3 Material e métodos

Proteínas fimbriais

As proteínas K88 e F41 foram cedidas gentilmente pela EMBRAPA – Suínos e Aves. As amostras das proteínas foram diluídas a 1 mg/mL em tampão fosfato salina (PBS) e estocadas à – 20°C até o momento do uso.

Os animais

Foram utilizadas seis galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn* (*Gallus gallus domesticus*) com 28 semanas de vida para produção de anticorpos IgY, e quatro (4) coelhos da linhagem Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com 10 semanas de vida para obtenção de anticorpos IgG de mamíferos. As galinhas foram mantidas em gaiolas individuais na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, enquanto os coelhos foram mantidos na Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá. Ambos os animais foram acondicionados em temperatura ambiente com acesso à água e ração *ad libitum*, e deixados adaptar-se ao ambiente por 2 semanas antes do início das imunizações.

Cepas bacterianas

As cepas de *E. coli* K88⁺ (S02, VIDOTTO, 1986), *E. coli* F41⁺ (B41, MORRIS, 1982) e *E. coli* Hb101 (BOYER & ROULLAND-DUSSOIX, 1969) utilizadas no presente estudo foram cedidas pelo Prof. Dr. Gerson Nakasato do laboratório de bacteriologia, departamento de microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina. As bactérias foram isoladas de suínos com diarreia, analisadas para confirmação de tais fímbrias, mantidas em ágar estoque e cultivadas em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*, Himedia Laboratories) ou MHB (*Mueller-Hinton Broth*, Bio-Rad) para posterior semeadura em meio sólido ágar-glicose (*E. coli* K88⁺), minca (*E. coli* F41⁺) e Ágar MHA (Mueller-Hinton, Bio-Rad) (*E. coli* Hb101) a 37°C.

Imunizações dos animais

Os animais de cada espécie foram divididos em dois grupos, onde um grupo foi inoculado com a proteína K88 e o outro grupo com a proteína F41. As proteínas foram homogeneizadas com volume igual de Adjuvante Completo de Freund (ACF, Sigma) para a primeira inoculação, e Adjuvante Incompleto de Freund (AIF, Santa Cruz Biotechnology) para as doses de reforço. As galinhas poedeiras foram inoculadas com 20 µg/animal do imunógeno via intramuscular enquanto os coelhos receberam 50 µg/animal via subcutânea. Todos os animais foram inoculados nos dias 0, 15, 30, 45, 60 e 105 do experimento. Coletas de sangue foram realizadas antes da primeira inoculação (dia 0) e sete (7) dias após cada imunização, portanto nos dias 0, 7, 22, 37, 52, 67 e 112 do experimento.

Avaliação da produção de anticorpos anti proteínas fimbriais K88 e F41

Os níveis de anticorpos específicos às proteínas fimbriais foram determinados através da técnica de ELISA indireto. Placas de 96 poços (*High Binding*, Costar 3590) foram sensibilizadas com 100 ng/poço da proteína K88 ou F41 em tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6, e incubadas *overnight* a 4°C. Após lavagem com PBS pH 7,4 a placa foi bloqueada por 2 horas com PBS pH 7,4 contendo 5% de leite desnatado (Leite Molico, Nestlé) à 37°C e então lavada com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST, Vetec Química Fina). Em seguida, as amostras dos soros de galinhas (1:500) ou de coelhos (1:100) diluídas em PBS pH 7,4 contendo 1% de leite desnatado foram aplicadas e incubadas por 1 hora a 37°C. A placa com foi lavada e imediatamente incubada por 1 hora a 37°C com anti-IgY peroxidase (Bethyl Laboratories) a 1:40.000 ou anti-IgG de coelho a 1:5.000 (Sigma Chemical) diluídos em PBS-leite desnatado a 1%. Após lavagem com PBST, a reação foi revelada por 15 minutos com a adição de solução de subtrato em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,2 contendo 0,1 mg de tetrametilbenzidina (TMBZ, Acrós Organics) e 0,005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%, FMaia). A reação foi interrompida com o acréscimo de ácido sulfúrico (Vetec Química Fina) 2N, seguida da leitura das densidades ópticas (D.O.) em leitor de microplacas automático (iMarkTM, Bio-Rad) a 450 nm.

Determinação dos títulos de anticorpos anti proteínas fimbriais K88 e F41

Os títulos dos antissoros foram determinados por ELISA indireto a partir de amostras de antissoros diluídas seriadamente de 1:100 a 1:12.800 utilizando um fator de diluição 2. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para a determinação da menor diluição necessária para a obtenção de uma absorbância de 0,1. O recíproco da menor diluição foi considerado como o número de unidades de ELISA (U-ELISA) necessária para a obtenção de uma absorbância de 0,1 a 450 nm. O cálculo da diluição necessária para a obtenção de uma absorbância de 0,1 foi feito com o auxílio do programa Curve Expert 1.4 (ALMEIDA, 2008).

Determinação da avidéz de anticorpos anti proteínas fimbriais K88 e F41

A avidéz dos anticorpos séricos de galinhas e coelhos foi determinada conforme descrito por De Andrade et al. (2013), com algumas modificações. Resumidamente, microplacas foram sensibilizadas como descrito anteriormente. Após incubação de 1 hora a 37°C das amostras séricas de galinha a 1:200 e de coelhos a 1:100, a microplaca foi incubada por 30 minutos a 37°C com solução de Cloreto de Magnésio (MgCl₂, Biotec) 2 M. Para obter o resultado de amostras não tratadas, foi usado PBS pH 7,4 como controle. Após lavagem com PBST, foram adicionados IgG cabra anti-IgY peroxidase (Bethyl, Laboratories) ou anti-IgG de coelho (Sigma Chemical) e as etapas decorrentes foram realizadas conforme descrito anteriormente. O índice de avidéz dos anticorpos foi estimado pela relação entre as absorbâncias obtidas de amostras na ausência (PBS) ou presença de MgCl₂ 2 M. O índice relativo de avidéz obtido foi multiplicado por 100, e os índices entre 40 e 60 % foram considerados avidéz moderada, enquanto que índices acima de 60 % foram considerados de alta avidéz (ALMANZAR, 2013).

Reatividade de soros anti-K88 e anti-F41 contra ETEC K88⁺ e F41⁺

Para avaliar o reconhecimento de cepas de *E. coli* K88⁺ e F41⁺ por soros de galinhas poedeiras e de coelhos imunizados com as proteínas K88 e F41 à *E. coli* nativa, cepas de ETEC K88⁺ ou F41⁺ foram cultivadas em meios específicos, meio ágar-glicose e meio minca, respectivamente. Uma suspensão bacteriana de $1,2 \times 10^9$, na escala 4 de McFarland, foi

preparada em PBS pH 7,4. A suspensão bacteriana foi diluída a 1:625 em tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6, resultando em uma concentração de $1,92 \times 10^6$, e então adicionada à microplaca para ser incubada *overnight* a 4°C e posterior realização de ELISA indireto como descrito anteriormente.

Perfil de reconhecimento de ETEC K88⁺ e F41⁺ por anticorpos anti proteínas K88 e F41 por Western Blotting

Para avaliar o perfil de antígenos de *E. coli* reconhecidos por soros de galinhas poedeiras e coelhos anti proteínas K88 e F41, cepas de *E. coli* K88⁺, *E. coli* F41⁺ e *E. coli* Hb101 foram cultivadas por 24 horas a 37°C em 4 mL de meio caldo-glicose, minca e TSB, respectivamente. A suspensão bacteriana foi centrifugada por 15 minutos a 3.000g, o meio descartado e o precipitado celular foi lavado sucessivamente por 3 vezes com PBS pH 7,4. Após nova centrifugação, o PBS foi descartado e o precipitado celular foi ressuspenso em tampão de amostra (0,5 mL de Tris-SDS pH 6,8; 0,2 g de SDS; 1,5 mL de glicerol; 0,25 mL de 2-mercaptoetanol; 0,0004 g de azul de bromofenol; 1 mL de água destilada) em condições redutoras. As amostras bacterianas foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% em tampão tris-glicina pH 8,8 e transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore) a 150 mA *overnight* a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com PBS contendo 5% leite em pó desnatado (Leite Mólico, Nestlé) por 2 horas. A membrana foi incubada por 1 hora com amostras de soros de galinhas a 1:200 e amostras de soros de coelhos a 1:50 diluídas em PBS-leite 1%. Após lavagem com PBST, a membrana foi incubada com anti-IgY peroxidase (Bethyl Laboratories) ou anti-IgG peroxidase (Sigma Chemical) diluídos a 1:5.000 em PBS-leite 1%, por 1 hora e 2 horas, respectivamente. A membrana foi lavada com PBST e revelada com PBS pH 7,4 contendo 0,1 mg de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical) e 0,02 % de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%, FMaia). A reação foi interrompida com adição de água destilada. Todas as etapas de incubação foram realizadas em temperatura ambiente sob agitação.

Teste de inibição de crescimento bacteriano in vitro

A atividade inibitória de anticorpos produzidos em galinhas poedeiras e coelho sobre o crescimento de cepas *E. coli* K88⁺ e *E. coli* Hb101 em meio líquido foi realizado por meio da técnica de curva de crescimento e morte. Cepas bacterianas foram cultivadas em meio sólido de ágar glicose (*E. coli* K88⁺) e MHA (*E. coli* Hb101) a 37°C por 18 a 24 horas, as colônias então suspensas em PBS pH 7,4 estéril e a concentração bacteriana ajustada para uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland, correspondente à $0,5 \times 10^8$ CFU/mL. A seguir foi feita uma diluição 1:100 da suspensão bacteriana em meio líquido de caldo-glicose ou MHB. Todos os soros utilizados foram incubados à 56°C por 30 minutos para inativação do sistema complemento e assepticamente filtrados usando filtro 0,22 µm (Millipore).

Em uma placa de 96 poços, 100 µL da suspensão bacteriana ($0,5 \times 10^5$ CFU) preparada acima foi misturada com volume igual de soro inespecífico ou soro anti-K88 nas diluições de 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000, e incubados a 37°C. Como controle negativo do crescimento bacteriano foi utilizado 100 µL contendo 0,1 mg/mL de gentamicina (Invitrogen) e como controle positivo foi utilizado 100 µL de meio de cultura. A absorbância da cultura a 600 nm foi mensurada a cada 1 hora por 8 horas, seguida de uma nova leitura após 24 horas em leitora de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments) utilizando o software Gen5. A curva de crescimento foi representada graficamente através da relação entre o tempo 0 e os tempos subsequentes de crescimento, para determinar se houve a inibição de crescimento.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad-Prism 5.0. Os dados de teste de inibição de crescimento bacteriano e comparação entre as espécies foram realizadas por ANOVA Two-Way seguido de teste de Bonferroni, e os dados individuais de galinhas e coelhos foram analisados por ANOVA One-Way seguido de teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn's. Os resultados foram representados por erro padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando $P > 0,05$.

3.4 Resultados

Avaliação da produção de anticorpos anti proteínas K88 e F41

Os resultados obtidos mostram aumento dos níveis de anticorpos específicos produzidos contra as proteínas K88 e F41 (Figura 1). No soro das galinhas poedeiras foi observado um aumento significativo dos níveis de anticorpos específicos no 22º dia do experimento (após a primeira dose de reforço) e estes níveis mantiveram-se elevados até o final do experimento. Por outro lado, no soro de coelhos foi observado um aumento significativo dos anticorpos anti-K88 e anti-F41 com queda dos níveis de anticorpos de coelhos anti-F41 ao final do experimento (Fig. 1 B). Em relação à proteína K88, as galinhas poedeiras responderam com maiores níveis de anticorpos quando comparadas aos coelhos, nos dias 37, 52 e 112, aos quais correspondem após a quarta, quinta e sexta imunizações, respectivamente. Quanto à proteína F41, não foi observado o mesmo perfil de resposta contra K88, tanto galinhas quanto coelhos responderam com baixos níveis de anticorpos. Porém, ainda assim, os coelhos apresentaram maiores níveis de anticorpos em relação às galinhas poedeiras nos dias 37 e 67. No entanto, no dia 112 estes níveis de anticorpos declinam consideravelmente em relação aos níveis apresentados pelas galinhas.

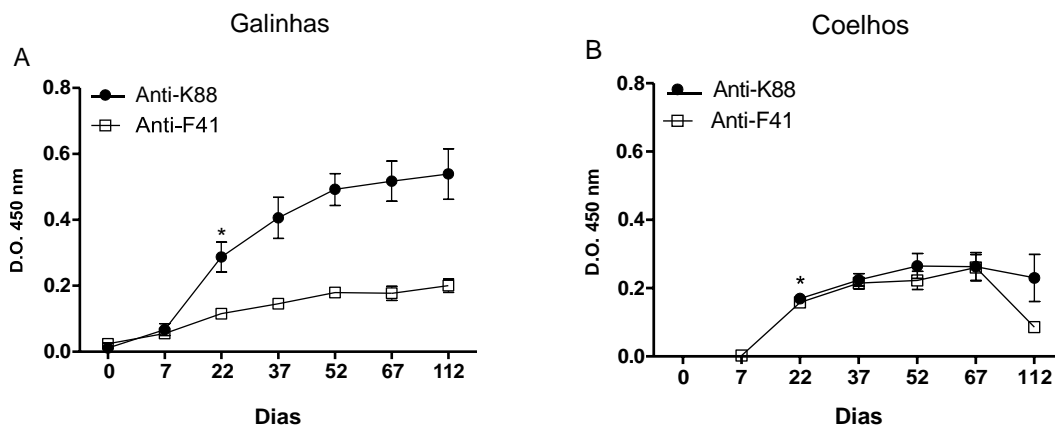


Figura 1: Avaliação da produção de anticorpos anti proteínas K88 e F41. Galinhas (A) e coelhos (B) responderam com o aumento de níveis de anticorpos significativos após a segunda imunização (dia 22). Galinhas poedeiras demonstram maiores níveis de anticorpos contra a proteína K88 e menores níveis com a proteína F41. As barras são representadas por erro padrão da média ($P < 0,05$). O símbolo (*) indica diferença significativa do dia 22 em relação ao dia 0 para ambos os animais.

Títulos de anticorpos contra proteínas K88 e F41

De um modo geral, os resultados obtidos mostram um aumento nos títulos de anticorpos específicos contra K88 e F41 ao longo do experimento (Tabela 1). Uma exceção foi observada com relação à resposta ao antígeno F41 entre os dias 52 e 112, quando foi observado uma redução dos títulos de anticorpos específicos. Assim como observado em relação aos níveis de anticorpos os títulos de anticorpos contra K88 foram maiores do que contra o antígeno F41, tanto em galinhas quanto em coelhos.

Tabela 1. Títulos de anticorpos anti proteínas de K88 e F41

Dias	K88				F41			
	Galinhas		Coelhos		Galinhas		Coelhos	
	U-ELISA	DP	U-ELISA	DP	U-ELISA	DP	U-ELISA	DP
22	1227	±669	1843	±1813	310	±109	422	±41
52	4985	±1196	5122	±3297	487	±157	585	±216
112	12030	±3439	4704	±2710	918	±235	202	±135

Aumento de anticorpos anti proteínas K88 e F41 ao longo do procedimento de imunizações. IgY sérica foi quantificada pelo método de ELISA indireto e os títulos referidos como U-ELISA. Cada resultado é representativo da média de três repetições em duplicata. DP - Desvio Padrão.

Avidez de anticorpos IgY e IgG

Tanto em galinha quanto em coelhos inoculados com as proteínas K88 e F41, um aumento significativo de avidéz de anticorpos específicos foi observado após a sexta inoculação (dia 112) (Fig. 2). Além disso, diferenças significativas nos índices de avidéz dos anticorpos anti-K88 produzidos por galinha e coelho foram observadas após a segunda (dia 22) e quarta inoculações (dia 52). É interessante observar que não há diferença significativa entre esses anticorpos após a 6ª inoculação (dia 112). Com relação à proteína F41 não foram observadas diferenças significativas nos índices de avidéz dos anticorpos específicos produzidos por galinhas e coelhos.

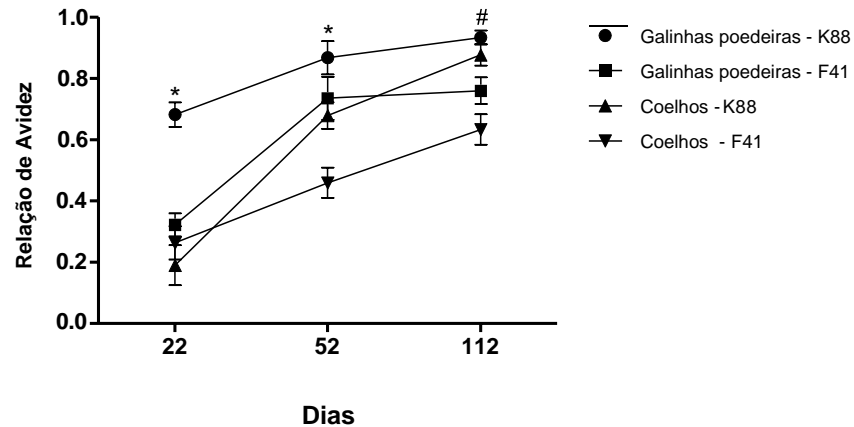


Figura 2: Aumento da avidéz em anticorpos IgY e IgG de coelho. Galinhas e coelhos imunizados com 20 e 50 μg , respectivamente, das proteínas fimbriais recombinantes K88 e F41 apresentaram aumento no índice de avidéz. A avidéz de ambos os anticorpos tem diferenças significativas quando os animais foram inoculados com a proteína K88, e índices semelhantes quando inoculados com a proteína F41. As barras são representadas por erro padrão da média ($P < 0,05$). O símbolo (#) indica diferença significativa do dia 112 em relação ao dia 22 para galinhas e coelhos e ambas as proteínas. O símbolo (*) indica os pontos com diferenças significativas entre galinhas e coelhos em relação à proteína K88. Não foram observadas diferenças no índice de avidéz em galinhas e coelhos em relação à proteína F41.

Reatividade de anticorpos a *E. coli* nativa

Para investigar a reatividade dos antissoros anti-K88 e anti-F41 contra os antígenos das bactérias nativas, foi realizado um ELISA utilizando como antígeno células de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺. O resultado deste ELISA está demonstrado na Fig. 3. Apesar de um pequeno aumento nos níveis de anticorpos IgY contra a *E. coli* K88⁺ após múltiplas inoculações, esse aumento não foi considerado significativo. O mesmo resultado foi observado para anticorpos IgG de coelho (Fig. 3 A). Porém quando comparados os soros de galinha e coelho contra o antígeno K88, as galinhas poedeiras apresentaram maiores níveis de anticorpos que coelhos nos dias 22 e 112, após segunda e última imunização, respectivamente (Fig. 3 A). Já quando analisado os níveis de anticorpos contra *E. coli* F41⁺, tanto IgY quanto IgG não apresentaram alteração diante das imunizações com a proteína, não sendo observado diferença significativa entre os níveis entre galinhas e coelhos (Fig. 3 B).

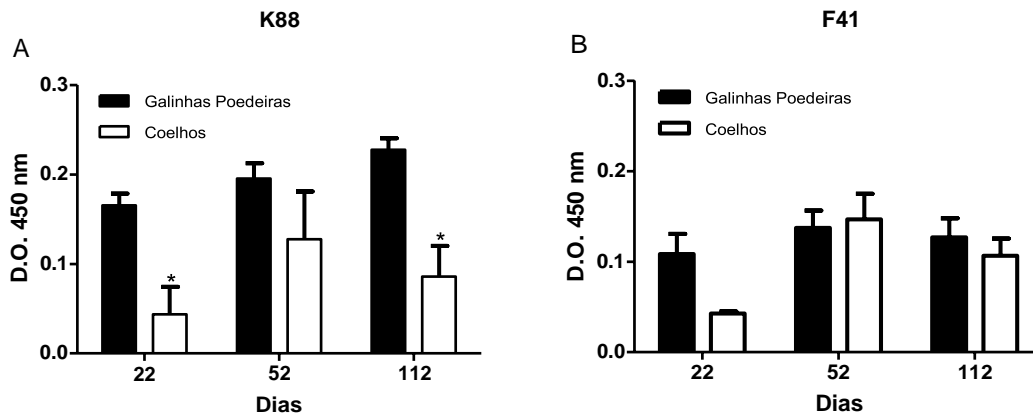


Figura 3: Reatividade do soro de galinhas poedeiras e coelhos contra *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺ após imunização com as proteínas K88 e F41. Após imunização com proteínas recombinantes K88 (A) e F41 (B), foram avaliados os níveis de anticorpos dos soros específicos às bactérias nativas. Ambos os animais demonstraram baixos níveis de anticorpos contra *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺, aparentando que as imunizações pouco influenciou neste perfil. As barras são representadas por erro padrão da média ($P < 0,05$). O símbolo (*) indica os pontos com diferenças significativas entre galinhas e coelhos.

Perfil de antígenos reconhecidos por antissoros anti-K88 e F41

O perfil de antígenos de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺ reconhecidos pelos soros de galinha ou coelho anti-K88 e anti-F41 foi determinado por *Western-blot*. Inicialmente, investigamos o perfil de antígenos de *E. coli* reconhecidos pelos soros não imunes de coelho e galinhas (Fig. 4 A). Como esperado, tanto os soros não imunes das galinhas quanto de coelhos não reconhecem as proteínas K88 e F41 antes das inoculações. Também é possível observar que os soros de galinhas não reconhecem antígenos da bactéria *E. coli* Hb101. Por outro lado, esses soros não imunes reconhecem diversos antígenos de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺. E mais ainda, o perfil de antígenos reconhecidos é basicamente o mesmo, o que sugere que as galinhas poedeiras estão em contato com diversos antígenos presentes em *E. coli* e que estes antígenos são provavelmente imunodominantes. Um perfil semelhante de reconhecimento foi observado com soros não imunes de coelhos, porém com menor diversidade quando comparado ao perfil de reconhecimento de galinhas. Uma diferença significativa foi o intenso reconhecimento de um antígeno de aproximadamente 40 kDa de *E. coli* Hb101 pelo soro não imune de coelho. Este antígeno não é reconhecido pelo soro não imune de galinha.

Com relação ao reconhecimento do antígeno K88, como esperado, após as imunizações com a proteína K88, os antissoros específicos de ambas as espécies animais exibiram um intenso reconhecimento da proteína K88 (Fig. 4 B). Além disso, os soros anti

K88 reconhecem um antígeno de aproximadamente 30 kDa presente em extrato de *E. coli* K88⁺. Possivelmente este antígeno corresponda à fímbria nativa presente na *E. coli*, uma vez que a proteína nativa tem um tamanho estimado de 30 kDa. Além disso, a imunização induziu uma resposta imune principalmente contra um antígeno não identificado de tamanho entre 50 e 60 kDa de *E. coli* HB101. Em relação aos antissoros de coelho anti-K88, foi observado uma fraca interação com os antígenos de *E. coli* K88⁺ (30 kDa e 50 kDa) e *E. coli* HB101 (50 kDa). Provavelmente os antígenos reconhecidos de *E. coli* K88⁺ não correspondem à fímbria K88. Quanto aos antissoros anti-F41, assim como no grupo inoculado com K88, um intenso reconhecimento da proteína recombinante foi observado (Fig. 4 C). Além disso, anticorpos de galinhas anti-F41 reconhecem antígenos de *E. coli* Hb101 de aproximadamente 80 kDa, 60 kDa, 50 kDa e 25 kDa. Em relação à *E. coli* F41⁺, além dos diversos antígenos já reconhecidos inicialmente por soros não imunes (Fig. 4 A), aparentemente 3 antígenos de tamanho aproximado de 40 kDa, 30 kDa e abaixo de 25 kDa, se destacam com maior intensidade após a imunização das galinhas. O antígeno de tamanho aproximado de 30 kDa, provavelmente corresponde à fímbria nativa de F41. Já os soros específicos de coelhos, reproduziram o mesmo perfil observado em soros anti-K88, reconhecendo alguns antígenos com baixa intensidade de tamanhos aproximados de 60 kDa, 40 kDa e 25 kDa na *E. coli* Hb101, e um antígeno mais intenso de 60 kDa em *E. coli* F41⁺. O antígeno reconhecido em *E. coli* F41⁺ não corresponde à fímbria nativa presente na bactéria, uma vez que esta tem um tamanho estimado de 30 kDa.

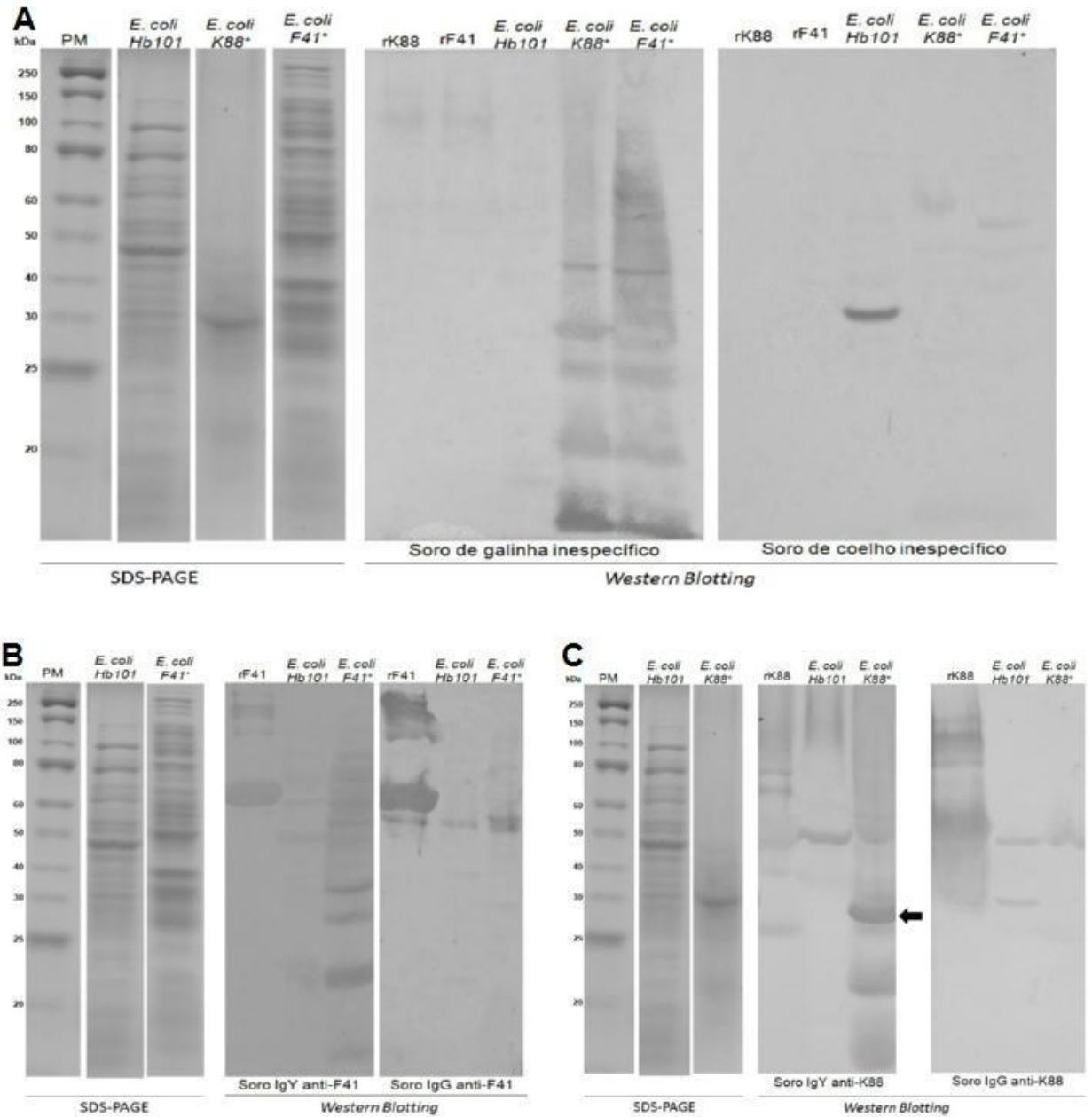


Figura 4: Perfil de reconhecimento de soros anti-k88 ou anti-F41 e soros não imune de galinhas poedeiras e de coelhos de antígenos recombinantes ou nativos de *E. coli*. Galinhas poedeiras apresentam anticorpos naturais contra diversos antígenos de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺ (A), elevando a intensidade da resposta a um antígeno de ~30 kDa (seta) após imunização, o que corresponde ao tamanho da fímbria de K88 e F41 (B e C). Já os coelhos não demonstram anticorpos com altos níveis de reconhecimento das bactérias *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺, não alterando este perfil após as imunizações.

Teste de inibição de crescimento bacteriano

O efeito antibacteriano dos antissoros anti fímbrias de galinhas e coelhos sobre a bactéria *E. coli* K88⁺ foi avaliado pela técnica de curva de crescimento e morte. Antissoros específicos e soros inespecíficos de galinhas e coelhos foram incubados com a bactéria e avaliados por 24 horas. Tanto antissoro específico quanto soro inespecífico de galinhas na diluição de 1:10 causou um efeito inibitório sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺ (Fig. 5 A). Esta inibição se torna mais evidente em 8 e 24 horas. Já os soros específico e inespecífico de coelhos obtiveram níveis de crescimento bacteriano comparados ao controle de *E. coli* K88⁺, não afetando seu crescimento. Porém quando avaliadas diluições maiores dos soros para ambos os animais, o efeito inibitório é ausente em anticorpos de galinhas e coelhos, demonstrando níveis de crescimento bacteriano semelhante ao controle de *E. coli* K88⁺ (Dados não mostrados).

Para comprovar se o efeito antibacteriano dos antissoros é um efeito específico sobre a *E. coli* K88⁺, devido ao reconhecimento de antígenos desta bactéria, uma *E. coli* negativa para K88 e desprovida de outras fímbrias, *E. coli* Hb101, foi utilizada para o teste de inibição. Em quaisquer diluições analisadas, os soros de galinhas e coelhos, específicos e inespecíficos, não demonstraram qualquer efeito sobre o crescimento de *E. coli* Hb101 (Fig. 5 B). Estes resultados sugerem que os soros que reconhecem antígenos de *E. coli* K88⁺ apresentam efeito antibacteriano específico à *E. coli* K88⁺.

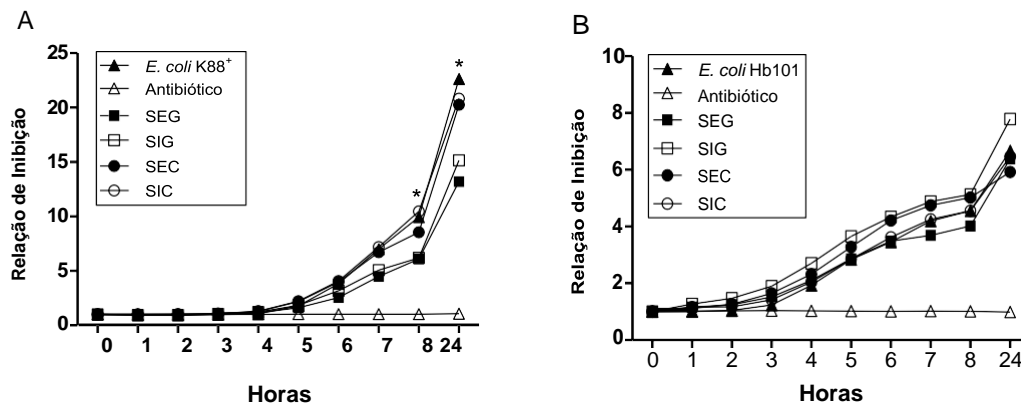


Figura 5: Soros específico e inespecífico de galinhas tem efeito inibitório sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺. Por meio da técnica de curva de crescimento e morte, soros de galinhas diluídos a 1:10 demonstram efeito inibitório sobre *E. coli* K88⁺, o que não foi observado por anticorpos IgG de coelho (A). Soros de galinhas e coelhos não apresentam efeito inibitório sobre *E. coli* Hb101 (B). Estes resultados são representativos de 3 experimentos independentes, executados em triplicata. O símbolo (*) indica diferença significativa no crescimento bacteriano com soros de galinhas. SEG: soro específico de galinha; SIG: soro inespecífico de galinhas; SEC: soro específico de coelho; SIC: soro inespecífico de coelho.

3.5 Discussão

A imunização em mamíferos induz o sistema imune a produzir uma resposta imune primária, seguida de uma resposta imune secundária após uma segunda inoculação do mesmo antígeno. Uma resposta semelhante é observada em aves. Anticorpos IgY aparecem no soro de galinhas 4 dias após a imunização com o antígeno, alcança o nível máximo nos dias 6 a 8, e em seguida declina (SCHADE, 2005). No presente estudo, os níveis de anticorpos de ambos os animais, galinhas e coelhos, alcançaram o nível máximo no 22º dia do experimento. Em coelhos, a resposta observada em relação às proteínas K88 e F41 se mantiveram estáveis até o 67º dia do experimento com redução dos níveis no dia 112. As galinhas, após a elevação dos níveis no 22º dia em resposta às proteínas K88 e F41, os níveis permaneceram estáveis até término do experimento no dia 112. Este aumento dos níveis após segunda imunização e estabilidade ao longo do experimento também é observado em outros estudos (MAHDAVI, 2010, SUNWOO, 2002). Utilizando IgG humana como antígeno, galinhas e coelhos responderam rapidamente nas primeiras semanas, onde em galinhas foi observada uma resposta contínua, e os níveis dos coelhos apresentaram flutuações com queda de resposta (BOLLEN, 1996), como observado neste estudo. Comparada com K88, a proteína F41 apresentou uma menor imunogenicidade, induzindo baixos títulos de anticorpos em galinhas e

coelhos. Porém ambas as proteínas provocaram um aumento da avidéz de anticorpos IgY e IgG de coelho, apesar de F41 induzir menores índices de avidéz quando comparada com K88.

A avidéz em anticorpos se eleva ao longo do tempo conforme o animal é exposto sucessivamente a determinado antígeno. Este fenômeno ocorre devido à maturação da resposta, onde anticorpos de baixa avidéz são produzidos na fase inicial da resposta imune e anticorpos de alta avidéz são produzidos com a evolução da resposta (INOUYE, 1984). A alta avidéz de anticorpos IgY mostrou estar relacionada à alta capacidade de neutralização em estudos com venenos ofídicos (DE ANDRADE, 2013). Os poucos estudos que têm comparando anticorpos de galinhas com outras espécies de mamíferos, indicam que a especificidade e avidéz de IgY são equivalentes àquelas produzidas por mamíferos como coelhos e carneiros (BOLLEN, 1996; WOOLLEY, 1996). Neste trabalho, apesar de encontrar algumas variações entre as atividades de anticorpos de galinhas e coelhos, a reatividade à *E. coli* e a avidéz de anticorpos produzidos por galinhas e coelhos são semelhantes, uma vez que ambos os animais demonstraram níveis semelhantes de anticorpos às bactérias sem alterações mediante às imunizações e a avidéz destes anticorpos de ambas as espécies mostrou ser equivalente ao final do período experimental, embora anticorpos IgY tenham apresentado altos índices de avidéz do início ao término do experimento com a imunização de ambas as proteínas. Porém com o curso do experimento, os coelhos alcançaram índices de avidéz semelhante aos encontrados em galinhas. Este alto índice e constância da avidéz no início da resposta às imunizações, também foi observada em s galinhas imunizadas com IL-6 recombinante em um estudo de comparação entre galinhas e carneiros (WOOLLEY, 1995).

Nas análises de *western blotting* pode-se observar que as imunizações com proteínas K88 e F41 induziram uma resposta específica a estas proteínas em galinhas e coelhos, e ainda conferiram em galinhas uma resposta de maior intensidade aos antígenos de aproximadamente 30 kDa, correspondentes às fímbrias K88 e F41, apesar de as aves já apresentarem um perfil de reconhecimento prévio às imunizações. Já em coelhos, as imunizações com as proteínas recombinantes não influenciaram na resposta imune contra as bactérias *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺, mantendo o perfil de reconhecimento de soros não imunes.

Quando analisados os resultados de teste de inibição bacteriano com soros de galinhas e coelhos, os soros de galinhas imunes e não imunes (inespecíficos) desempenharam um efeito inibidor sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺, enquanto que soros imunes e não imunes (inespecíficos) de coelhos não afetaram o crescimento bacteriano. Este perfil de

inibição não surpreende, uma vez que as galinhas apresentavam altos níveis de anticorpos naturais contra *E. coli* K88⁺ em soros não imune antes das imunizações, e coelhos não exibiram um perfil de reconhecimento bacteriano nem mesmo após a indução de resposta imune com a inoculação da proteína recombinante K88. No entanto, os soros de ambos os animais foram testados com *E. coli* desprovida da fímbria K88, *E. coli* Hb101, e esta apresentou um perfil de crescimento semelhante ao controle bacteriano em todas condições avaliadas, concluindo que soros imunes e não imunes não atuaram sobre o crescimento de *E. coli* Hb101. Este resultado sugere que os anticorpos naturais presentes no soro não imune quanto os anticorpos específicos presentes no soro imune, apresentam uma resposta específica à *E. coli* K88⁺. Em estudos utilizando o anticorpo IgY extraído de gema de galinhas imunizadas, também foi observado o efeito antibacteriano de IgY não imune sobre *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium (CHALMOGHOUMI, 2009), *E. coli* O78:K80 (MAHDAVI, 2010) e *E. coli* O157:H7 (SUNWOO, 2002), onde IgY específica e não imune apenas apresentaram diferenças na ação sobre a bactéria quando avaliadas em concentrações acima de 100 mg/mL (MAHDAVI, 2010; SUNWOO, 2002).

O fato de o efeito antibacteriano de soros imunes e não imunes sobre *E. coli* K88⁺ ser observado apenas quando em alta concentração, remete à necessidade da grande quantidade de anticorpos para induzir uma resposta protetora contra patógenos em tratamento de imunoterapia. Por esta razão e pela questão do aumento de microrganismos resistentes a antibióticos, IgY atrai interesse como alternativa à soroterapia e ao uso de antibióticos para doenças gastrointestinais por fornecer grande quantidade de anticorpos que podem ser facilmente obtidos de ovos e por reduzir o sofrimento de animais envolvidos na produção de anticorpos para fins de imunoterapia. Assim, diversos estudos relatam o efeito protetor de IgY para uma grande variedade de patógenos gastrointestinais (CHALGHOULMI, 2009; MINE & KOVACS-NOLAN, 2002, 2012), inclusive pela administração oral a animais desafiados com ETEC (XIAO-YU, 2009; JIN, 1998; LI, 2009; KOVACS-NOLAN & MINE, 2005, 2012; MARQUARDT, 1999; RIBEIRO, 2005; SUNWOO, 2010; YOKOYAMA, 1992), sugerindo que anticorpos IgY podem reagir com microrganismos patogênicos, neutralizando ou inibindo a atividade de patógenos relacionados a doenças infecciosas.

Em conclusão, apesar de mamíferos e aves apresentarem resposta, afinidade e avidéz de anticorpos semelhantes para determinados antígenos, galinhas e coelhos não apresentaram o mesmo perfil de reconhecimento à *E. coli* com fímbria nativa após as imunizações, o que

influenciou nos resultados de inibição do crescimento de *E. coli* K88⁺. O uso de grande quantidade de soros imunes também reflete no sucesso da inibição do crescimento bacteriano, o que leva à necessidade da produção de grande quantidade de anticorpos para proporcionar um efeito protetor. Desta maneira, galinhas poedeiras representam uma alternativa para produção de anticorpos policlonais em grande escala, uma vez que a IgY apresenta similaridades com anticorpos de mamíferos e pode ser extraída a partir da gema de ovos. Além disso, encontra-se consolidado na literatura o uso de IgY em práticas imunológicas de diagnóstico (SCHADE, 2005; SPILLNER, 2012), de prevenção e tratamento de inúmeras doenças infecciosas entéricas (CHALGHOUMI, 2009; MINE & KOVACS-NOLAN, 2002; 2012), além de ter disponível metodologias de simples manuseio desenvolvidas para extração de anticorpos IgY (AKITA & NAKAI, 1992; POLSON, 1990).

4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI FÍMBRIA K88: CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E SUA AÇÃO CONTRA *E. COLI* K88⁺

4.1 Resumo

ETEC é o principal microrganismo associado à diarreia e representa um dos principais problemas de saúde em humanos e animais. Dentre as diferentes ETEC, aquelas que expressam o antígeno fimbrial K88 são a causa mais comum de infecção entérica em suínos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de anticorpos IgY de gema contra proteína recombinante de fímbria K88 e investigar seu efeito antibacteriano sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺. Galinhas poedeiras White Leghorn foram imunizadas nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 105 e 150. Amostras de gema foram coletadas ao longo do período experimental, para análise de produção de anticorpos IgY. Os anticorpos IgY foram extraídos da gema e submetidos à análise eletroforética, avaliação de títulos e avides, além do perfil de reconhecimento antigênico à *E. coli* K88⁺ e efeito antibacteriano sobre *E. coli* K88⁺. Os resultados mostraram que houve um aumento dos títulos de IgY anti-K88 com posterior queda. Os animais exibiram altos índices de avides do início ao término do experimento. Os anticorpos IgY apresentaram um reconhecimento prévio da ETEC, e após as imunizações foi observado um reconhecimento de maior intensidade para o antígeno correspondente à fímbria K88. Em todas as concentrações avaliadas neste trabalho, IgY imune e não imune foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* K88⁺. A inibição bacteriana demonstrou ser específica à *E. coli* K88⁺, uma vez que IgY inibiu o crescimento de *E. coli* Hb101 apenas na concentração de 10 mg/mL. A inibição bacteriana demonstrada pelos anticorpos IgY sugere que estes anticorpos oferecem aplicabilidade para tratamento e prevenção de doenças entéricas como a colibacilose.

Palavras-chave: Aves, anticorpos IgY, fímbrias, inibição de crescimento, imunoterapia.

4.2 Introdução

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é o principal micro-organismo associado à diarreia pós-desmame em suínos e representa um dos principais problemas de saúde em humanos e animais (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002). A importância da diarreia na suinocultura está associada aos custos significativos do tratamento e a perda de peso do animal e ao aumentando a susceptibilidade a outras doenças (SITNIK, 2013). Diarreia pós-desmame causada por *E. coli*, também denominada de colibacilose entérica pós-desmame, é uma importante causa de morte em suínos desmamados em todo o mundo (FAIRBROTHER, 2005). A adesão da bactéria no tecido do hospedeiro é mediada por adesinas e é uma etapa chave na patogênese da ETEC, uma vez que estes têm que competir com micro-organismos comensais para uma colonização bem sucedida na superfície epitelial do hospedeiro, além de atuar na resistência à ação de lavagem do peristaltismo intestinal (BROEK, 2000; GAASTRA, 1982). Em suínos, as adesinas fimbriais de ETEC mais comumente encontradas são as fímbrias K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41 e F18 (GYLES & PRESCOTT, 2010). Os casos de diarreia com morte súbita ou diarreia severa frequentemente estão associadas com a *E. coli* F4 (K88) (FAIRBROTHER, 2005). Com a atual consciência dos problemas associados com o uso excessivo de antibióticos, alternativas para a prevenção da diarreia em suínos têm sido necessárias (AVORN, 2000; FULLER, 1989; SMITH, 1975; WANNACHER, 2004).

Algumas das reais e potenciais aplicações de anticorpos para o tratamento de doenças infecciosas em animais e humanos exigem grandes quantidades de anticorpos altamente purificados (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002), o que é uma dificuldade para produção de anticorpos policlonais em grande escala em mamíferos, uma vez que a produção do antissoro causa transtorno e estresse ao animal.

Além disso, recentemente, anticorpos presentes na gema de ovos de galinhas e denominados de IgY têm atraído interesse como uma alternativa eficiente e de custo-benefício favorável comparado aos antimicrobianos no controle e prevenção de doenças infecciosas. IgY é um anticorpo sérico de baixo peso molecular gerado principalmente na reposta imune secundária em aves (RATCLIFFE, 2006), e pode ser encontrada em aves, répteis e anfíbios (SPILLNER, 2012). A IgY sérica é passada de mãe para o embrião via gema, em um processo que resulta em altas concentrações do anticorpo na gema do ovo (SCHADE, 2005).

O uso de IgY apresenta uma alternativa atrativa para a produção de grandes quantidades de anticorpos policlonais, uma vez que permite a redução do número de animais para a produção de grandes quantidades de anticorpos, a utilização de métodos não invasivos para sua obtenção. Todas estas características têm favorecido o seu uso de anticorpos IgY para fins de imunoterapia e imunoprofilaxia de uma variedade de infecções virais e bacterianas, especialmente gastrointestinais, na medicina veterinária e humana (CARLANDER, 2002; SCHADE, 2005). O efeito protetor de IgY anti-ETEC contra colibacilose em suínos tem sido documentado na literatura (XIAO-YU, 2009; JIN, 1998; LI, 2009; KOVACS-NOLAN & MINE, 2005, 2012; MARQUARDT, 1999; RIBEIRO, 2005; SUNWOO, 2010; YOKOYAMA, 1992).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi induzir a produção de anticorpos IgY em galinhas poedeiras pela imunização de proteínas de fímbrias K88, avaliar as propriedades imunoquímicas da IgY produzida, além de investigar o efeito antibacteriano de IgY sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺.

4.3 Material e métodos

Proteínas fimbriais

A solução de proteína K88 foi cedida gentilmente pela EMBRAPA – Suínos e Aves. A amostra foi diluída a 1 mg/mL em tampão fosfato salina (PBS) e estocada à – 20°C até o momento de seu uso.

Os animais

Foram utilizadas três galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn* (*Gallus gallus domesticus*) com 28 semanas de vida para produção de anticorpos IgY. As galinhas foram mantidas em gaiolas individuais na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina em temperatura ambiente com acesso à água e ração *ad libitum*, e deixadas adaptar-se ao ambiente por 2 semanas antes do início das imunizações.

Cepas bacterianas

As cepas de *E. coli* K88⁺ (S02, VIDOTTO, 1986) e *E. coli* Hb101 (BOYER & ROULLAND-DUSSOIX, 1969) utilizadas no presente estudo foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Gerson Nakazato do laboratório de microbiologia, departamento de microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. As bactérias foram mantidas em ágar estoque e cultivadas em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*, Himedia Laboratories) ou MHB (*Mueller-Hinton Broth*, Bio-Rad) para posterior semeadura em meio sólido ágar-glicose (*E. coli* K88⁺) e Ágar MHA (*Mueller-Hinton Agar*, Bio-Rad) (*E. coli* Hb101) a 37°C.

Imunizações dos animais

A solução de proteína K88 foi misturada com volume igual de Adjuvante Completo de Freund (ACF, Sigma) para a primeira inoculação, e Adjuvante Incompleto de Freund (AIF, Santa Cruz Biotechnology) para as doses restantes. As galinhas poedeiras foram inoculadas com 400 µl (20 µg) do imunógeno em quatro pontos do músculo peitoral nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 105 e 150 do experimento. Coletas de sangue e ovos foram realizadas antes da primeira inoculação (dia 0) e sete (7) dias após cada inoculação, portanto nos dias 0, 7, 22, 37, 52, 67, 112 e 157 do experimento.

Extração e quantificação de anticorpos IgY

Para extração de anticorpos IgY da gema dos ovos de galinhas poedeiras foi utilizado o protocolo de precipitação por sulfato de amônia, descrito por Akita & Nakai (1992) com modificações. Resumidamente, a gema foi separada da clara e teve a sua película protetora retirada. A seguir as amostras de gema foram estocadas à - 20°C até o momento do uso. Após descongelamento, a gema foi diluída sete vezes (1:7) em água destilada (pH 2,5). A solução de gema diluída foi incubada *overnight* à 4°C. A seguir a solução foi filtrada em papel filtro Whatmann nº 1, e ao filtrado foi adicionada solução de sulfato de amônia saturada (Vetec Química Fina) para que a concentração final fosse de 33%. Após 30 min sob agitação em temperatura ambiente (TA), a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3.000xg e o precipitado dissolvido em sulfato de sódio (Synth) 18%. A solução obtida foi incubada por 20

minutos em TA e novamente centrifugada (3000xg / 15 min). O precipitado obtido foi dissolvido em solução de sulfato de sódio (Synth) 14%. A seguir a solução foi incubada em TA por 20 minutos e centrifugada (3.000Xg/15min). O precipitado foi dissolvido em PBS 1X pH 7,4 e estocado em -20°C. A concentração da solução de IgY extraída da gema foi determinada por Bradford (1976), e sua pureza analisada através de eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%, corado com comassie blue (Vetec Química Fina) (LAEMMLI, 1970).

Determinação dos títulos de anticorpos IgY anti-K88

Para determinação dos títulos de anticorpos IgY às proteínas fimbriais foi utilizado o método de ELISA indireto. Placas de 96 poços (High Binding, Costar 3590) foram sensibilizadas com concentração determinada experimentalmente de 100 ng (dados não mostrados) da proteína K88 em tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6, e incubadas *overnight* a 4°C. A placa foi bloqueada por 2 horas com PBS 1X pH 7,4 contendo 5% de leite desnatado (Leite Molico, Nestlé) à 37°C e então lavada com PBS contendo Tween 20 (Vetec Química Fina) a 0,05% (PBST). Amostras de solução de anticorpos IgY anti-k88 diluídas seriadamente em PBS-leite a 1% com fator de diluição 2, a partir de 500 µg/mL, foram adicionadas e incubadas por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada com PBST, e então IgG de cabra anti-IgY peroxidase (Bethyl Laboratories) a 1:40.000 diluído em PBS-leite a 1% foi aplicado para incubação por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem com PBST, a reação foi revelada em ausência de luz por 15 minutos com a adição de solução de substrato em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,2 contendo 0,1 mg de tetrametilbenzidina (TMBZ, Acrós Organics) e 0,005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%, FMaia). A reação foi interrompida com o acréscimo de ácido sulfúrico (Vetec Química Fina) 2N, seguida da leitura das densidades ópticas (D.O.) em leitor de microplacas automático (iMarkTM, Bio-Rad) a 450 nm. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para a determinação da menor diluição necessária para a obtenção de uma absorbância de 0,1. O recíproco da menor diluição foi considerado como o número de unidades de ELISA (U-ELISA) necessária para a obtenção de uma absorbância de 0,1 a 450 nm. O cálculo da diluição necessária para a obtenção de uma absorbância de 0,1 foi feito com o auxílio do programa CurveExpert 1.4 (ALMEIDA, 2008).

Determinação da avidéz de anticorpos anti-K88

A avidéz dos anticorpos IgY foi determinada conforme descrito por De Andrade et al. (2013), com algumas modificações. Resumidamente, microplacas foram sensibilizadas como citado na seção anterior. Após incubação de 1 hora a 37°C da solução de anticorpos IgY anti-k88 na concentração de 250 µg/mL, a microplaca foi incubada por 30 minutos a 37°C com solução de cloreto de magnésio (MgCl₂, Biotec) 2 M. Para obter o resultado de amostras não tratadas, foi usado PBS 1X pH 7,4 como controle. Após lavagem com PBST, foram adicionados IgG cabra anti-IgY peroxidase (Bethyl, Laboratories) e as etapas decorrentes foram realizadas conforme descrito anteriormente. O índice de avidéz dos anticorpos IgY foi estimada pela relação entre as absorbâncias obtidas de amostras na ausência (PBS) ou presença de MgCl₂ 2 M. O índice relativo de avidéz obtido foi multiplicado por 100, e as soluções de anticorpos com índices entre 40 e 60% foram considerados com avidéz moderada, enquanto que índices acima de 60% foram considerados de alta avidéz (ALMANZAR, 2013).

Perfil de reconhecimento de ETEC K88 por anticorpos IgY anti K88 e por Western Blotting

Para avaliar o perfil de antígenos de *E. coli* reconhecidos por anticorpos IgY de galinhas poedeiras anti proteínas K88, cepas de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* Hb101 foram cultivadas por 24 horas a 37°C em 4 mL de meio líquido de caldo-glicose e TSB, respectivamente. A suspensão bacteriana foi centrifugada por 15 minutos a 3.000 x g, o meio descartado e o precipitado celular foi lavado sucessivamente por 3 vezes com PBS 1X pH 7,4. Após nova centrifugação, o PBS foi descartado e o precipitado celular ressuspensão em tampão de amostra (0,5 mL de Tris-SDS pH 6,8; 0,2 g de SDS; 1,5 mL de glicerol; 0,25 mL de 2-mercaptoetanol; 0,0004 g de azul de bromofenol; 1 mL de água destilada) em condições redutoras. As amostras bacterianas foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % em tampão tris-glicina pH 8,8. As proteínas bacterianas separadas por eletroforese foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore) em uma cuba de transferência a 150 mA *overnight* a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (Leite Molico, Nestlé) por 2 horas. A membrana foi incubada por 1 hora com amostras de IgY pré-imune ou IgY anti K88 a 500 µg/mL diluídas em PBS-leite 1%. Após lavagem com PBST, a membrana foi incubada com anti-IgY

peroxidase (Bethyl Laboratories) diluído a 1:5.000 em PBS-leite 1% por 1 hora. A membrana foi novamente lavada com PBST e revelada com PBS 1X pH 7,4 contendo 0,1 mg de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical) e 0,02 % de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%, FMaia). A reação foi interrompida com adição de água destilada. Todas as etapas de incubação da técnica de *Western Blotting* foram realizadas em temperatura ambiente sob agitação.

Teste de inibição de crescimento bacteriano in vitro

A atividade inibitória de IgY produzida em galinhas poedeiras sobre o crescimento de cepas *E. coli* K88⁺ e *E. coli* Hb101 em meio líquido foi realizado por meio da técnica de curva de crescimento e morte. Cepas bacterianas foram cultivadas em meio sólido a 37°C por 18 a 24 horas, as colônias então suspensas em PBS 1X pH 7,4 estéril e a concentração bacteriana ajustada para uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland, correspondente à 0,5 x 10⁸ CFU/mL. Em meio líquido de caldo-glicose ou Muller- Hinton adicionou-se a suspensão bacteriana na proporção de 1:100. Os anticorpos IgY foram incubados à 56°C por 30 minutos e a seguir foram submetidos a filtração com membrana 0,22 µm (Millipore).

Em uma placa de 96 poços, 100 µL da suspensão bacteriana preparada acima foi misturada com volume igual de anticorpo IgY não imune ou IgY anti K88 nas concentrações finais de 10, 5, 2,5 ou 1 mg/mL, e incubados a 37°C. Um tratamento adicional com 0,1 mg/mL de gentamicina (Invitrogen) foi adicionado para servir como controle positivo de inibição, enquanto a curva de crescimento de *E. coli* sem adição de anticorpo ou antibiótico foi considerado o controle negativo de inibição e como comparativo para cultura contendo tratamento com anticorpos ou antibiótico. A absorbância da cultura foi avaliada a cada 1 hora por 8 horas a 600 nm por leitora de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments) utilizando o software Gen5. A curva de crescimento representa a relação entre a absorbância no tempo 0 e as absorbâncias nos tempos subsequentes de crescimento.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad-Prism 5.0. Os dados de teste de inibição de crescimento bacteriano e comparação entre resultados obtidos de soro e

gema foram analisados por ANOVA Two-Way seguido de teste de Bonferroni, e os dados de avidéz e resposta à *E. coli* foram analisados por ANOVA One-Way seguido de teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn's. Os resultados foram representados por erro padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando $p > 0,05$.

4.4 Resultados

Extração de anticorpos IgY

Para avaliação da produção de anticorpos IgY anti-K88 ao longo do período experimental, anticorpos IgY foram extraídos de gemas referentes aos dias 37, 67 e 57, correspondendo a 7 dias após a terceira, quinta e sétima imunização respectivamente, e submetidos a gel de eletroforese SDS-PAGE para análise do resultado da extração (Fig. 6). Os resultados obtidos mostram que proteínas com tamanho de 65 kDa e 23 kDa, correspondentes às cadeias pesadas e leves de IgY, respectivamente, são abundantes nas soluções de anticorpos IgY extraídos. Porém, também foram observadas outras proteínas de tamanhos aproximados de 50 kDa, 40 kDa e 30 kDa.

Determinação dos títulos das soluções de anticorpos IgY anti-K88

As soluções de anticorpos IgY obtidos foram analisados por ELISA indireto para a determinação dos de títulos de anticorpos anti-à K88. Na tabela 2 estão mostrados os títulos e as respectivas concentrações das soluções de anticorpos IgY anti-K88 obtidos nos dias 37, 67 e 157. As soluções de IgY anti-K88 apresentaram inicialmente um título de 547 U-ELISA (0,91 µg/mL) no dia 37, após a terceira imunização, um título de 909 U-ELISA (0,55 µg/mL) no dia 67, e um título de 577 U-ELISA (0,86 µg/mL) no dia 157, após a última imunização.

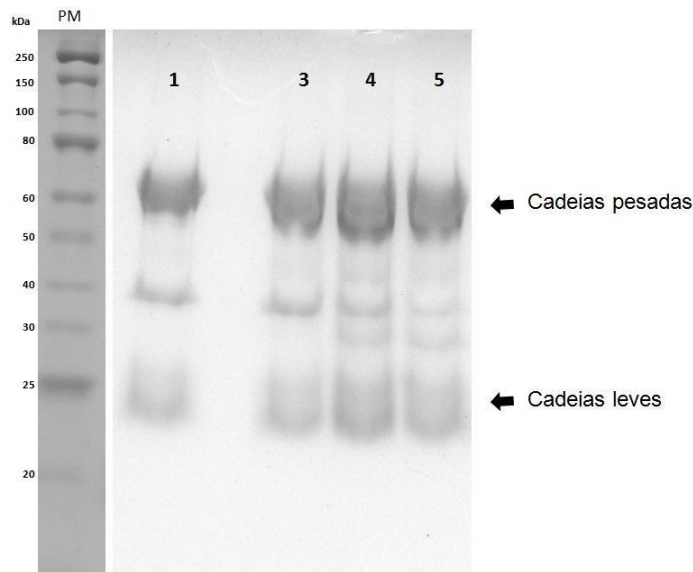


Figura 6: Perfil eletroforético de anticorpos IgY extraídos de gema dos ovos de galinhas imunizadas com K88. IgY não imune (1) e IgY anti-K88 nos dias 37 (3), 67 (4) e 157 (5). Os dias 37, 67 e 157 são correspondentes a anticorpos produzidos 7 dias após a terceira, quinta e sétima imunização, respectivamente.

Tabela 2. Títulos de anticorpos IgY anti-K88

Dia do experimento	U-ELISA	Desvio Padrão	Concentração
37	547	± 358	0,91 µg/mL
67	909	± 199	0,55 µg/mL
157	577	± 255	0,86 µg/mL

Aumento de anticorpos IgY anti proteína K88 em gemas de ovos ao longo do período de imunizações. Após extração de anticorpos IgY de gema, estes foram quantificados através do método de Bradford e a solução de IgY anti-K88 foi ajustada à concentração de 0,5 mg/mL. Com o ajuste de concentração, foi efetuada a diluição seriada de fator 2 e as amostras de IgY incubadas com a proteína K88 em placa de ELISA. IgY anti-K88 foi quantificada pelo método de ELISA indireto e os títulos referidos como U-ELISA. Cada resultado é representativo da média de três repetições em duplicata. Além de U-ELISA dos anticorpos, na tabela consta a concentração correspondente a cada título.

Determinação de avides de anticorpos IgY anti K88

A avides de anticorpos presentes em gemas foi avaliada por ELISA de avides conforme descrito em material e métodos. É possível observar que anticorpos purificados das galinhas poedeiras imunizadas com a proteína K88 já apresentam alta avides (84%) nos dias iniciais de experimento (37), e esta avides se manteve estável ao longo do período experimental, não possuindo diferenças nos períodos aqui avaliados, os dias 37 (84%), 67 (83%) e 157 (75%) (Fig. 7).

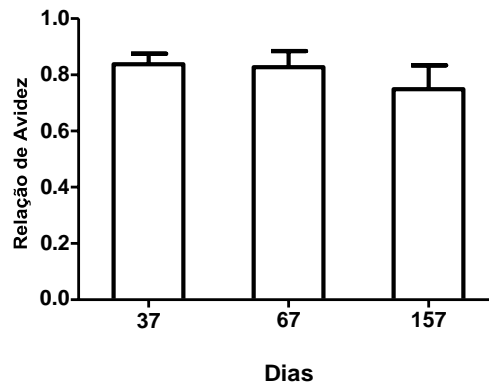


Figura 7: Anticorpos IgY da gema apresentam altos índices de avidéz. Por meio da técnica de ELISA de avidéz foi possível observar que IgY purificada da gema anti-K88 demonstrou alta avidéz do início ao final do experimento, além de não exibirem diferenças no índice de avidéz. As barras são representadas por erro padrão da média ($P < 0,05$).

*Perfil de reconhecimento *E. coli* K88⁺ por anticorpos IgY purificados da gema*

O perfil de antígenos reconhecidos em *E. coli* K88⁺ por anticorpos IgY anti-K88 foi avaliado por *Western Blotting* (Fig. 8). Para isso, anticorpos IgY purificados de ovos não imune e IgY anti-K88 foram utilizados para detecção de antígenos somáticos de *E. coli*. Os resultados obtidos mostram que antes da inoculação do antígeno K88 há a presença de anticorpos IgY específicos para *E. coli* K88⁺ e mesmo para *E. coli* HB101, porém como esperado, não houve o reconhecimento da proteína K88 (Fig. 8). Após a imunização das galinhas, os anticorpos IgY purificados da gema dos ovos dessas galinhas passaram a reconhecer a proteína K88, além de obter um intenso reconhecimento do antígeno de aproximadamente 30 kDa (Fig. 8, seta). A massa molecular do antígeno de aproximadamente 30 kDa, provavelmente corresponde à fímbria K88. Os anticorpos IgY não imune reconheceram com baixa intensidade diversos antígenos da *E. coli* Hb101, bactéria negativa para fímbria K88, e ainda a imunização dos animais induziu uma intensa resposta de IgY anti-K88 a um antígeno de aproximadamente 60 kDa em *E. coli* Hb101.

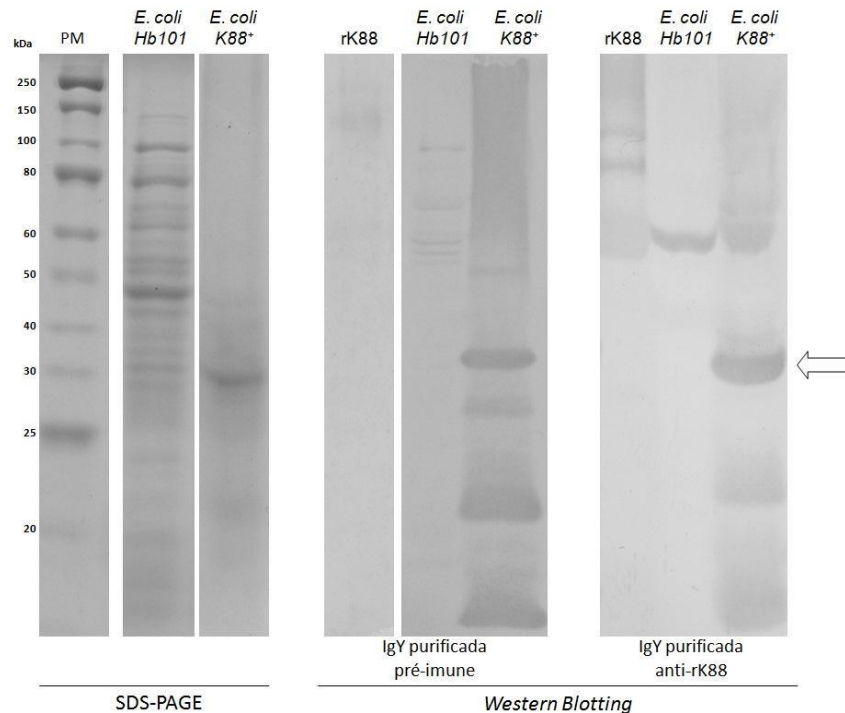


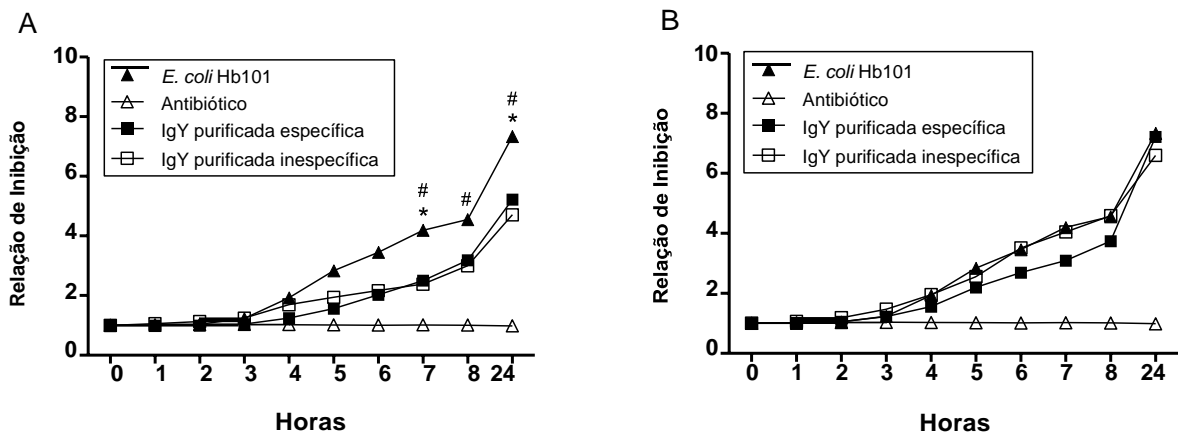
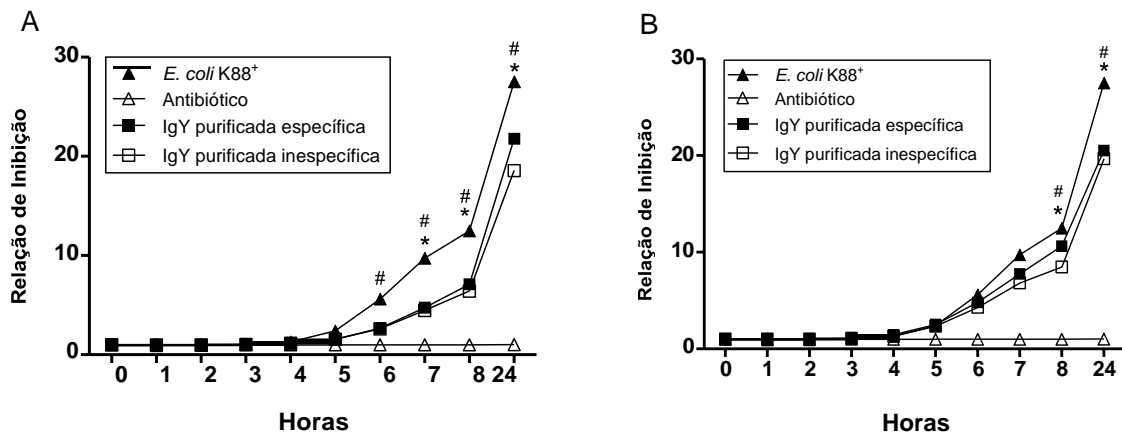
Figura 8: Perfil de reconhecimento de anticorpos IgY não imune e anti-K88 de galinhas poedeiras ao antígeno recombinante ou nativo de *E. coli*. Galinhas poedeiras apresentam anticorpos naturais contra diversos antígenos de *E. coli* K88⁺ e *E. coli* Hb101, elevando a intensidade da resposta a um antígeno de ~30 kDa em *E. coli* k88⁺, o qual corresponde à massa molecular da fímbria de K88, e de ~60 kDa em *E. coli* Hb101, após imunização.

Teste de inibição de crescimento bacteriano in vitro

Anticorpos IgY purificados, não imune e anti-K88 têm ação antibacteriana sobre *E. coli* K88⁺ até mesmo nas menores concentrações analisadas neste trabalho (Fig. 9). Quando avaliado o efeito inibitório de IgY na concentração de 10 mg/mL, a IgY anti-K88 inibiu significativamente o crescimento de *E. coli* K88⁺ em 7, 8 e 24 horas do experimento (Fig. 9 A). Curiosamente, IgY não imune exibiu melhor desempenho no teste, inibindo o crescimento bacteriano em 6, 7, 8 e 24 horas, e diferindo da IgY anti-K88 apenas após 24 horas de avaliação. Quando analisado menor concentração de anticorpo, 5 mg/mL (Fig. 9 B), IgY não imune e anti-K88 reduzem o efeito antibacteriano, inibindo em 24 horas a IgY específica, e 8 a 24 horas, a IgY não imune. Com 1 mg/mL, ambos os anticorpos IgY, não imune e anti-K88, inibem o crescimento de *E. coli* K88⁺ apenas em 24 horas (dados não mostrados). Diferenças significativas entre anticorpos IgY não imune e anti-K88 foram apenas demonstradas na concentração de 10 mg/mL.

Para avaliar a especificidade dos anticorpos IgY em relação à *E. coli* K88⁺, foi utilizada uma *E. coli* negativa para K88, a *E. coli* Hb101 em teste de inibição nas mesmas

condições avaliadas para *E. coli* K88⁺ (Fig. 10). Utilizando IgY não imune e anti-K88 a 10 mg/mL, os anticorpos exibiram efeito antibacteriano sobre *E. coli* Hb101, com inibição significativa em 7 e 24 horas para IgY anti-K88, e 7, 8 e 24 horas para IgY não imune (Fig. 10 A). Embora os anticorpos tenham efeito sobre o crescimento de *E. coli* Hb101, quando utilizados concentração menor de 5 mg/mL, este perfil é revertido e é demonstrado crescimento semelhante ou igual ao controle bacteriano com *E. coli* Hb101 (Fig. 10 B). O que não acontece com *E. coli* K88⁺, onde os anticorpos apresentam inibição do crescimento até mesmo em menor concentração de 1 mg/mL. Em nenhuma das condições avaliadas foi observada diferença significativa entre anticorpos não imune e anti-K88.



4.5 Discussão

O uso de anticorpos de galinhas para a produção de anticorpos policlonais fornece diversas vantagens sobre outros métodos de produção de anticorpos em mamíferos. Por esta razão, IgY tem atraído muito interesse para prevenção e tratamento de doenças infecciosas intestinais (MINE & KOVACS-NOLAN, 2002). Neste estudo produzimos anticorpos IgY específicos para a fímbria K88 presente em cepas de ETEC.

A análise da purificação parcial de anticorpos da gema de ovo das galinhas imunizadas e não imunizadas (não imune) resultou na detecção de duas bandas principais de 65 kDa e 23 kDa, além de algumas proteínas menores. As proteínas de 65 kDa e 23 kDa são consideradas as cadeias pesadas e leves de IgY, respectivamente. Em outros estudos, análises por SDS-PAGE em condições redutoras mostraram a presença de um perfil semelhante ao encontrado neste trabalho, constando de duas proteínas principais, correspondentes às cadeias leves e pesadas de IgY, e proteínas menores em relação ao peso total de IgY (180 kDa), com tamanhos aproximados de 50 kDa, 40 kDa e 30 kDa (GUIMARÃES, 2009; KASSIM, 2011, 2012; LEE, 2000; LI, 2014; LIU, 2010; TAN, 2012).

Os títulos de IgY anti-K88 aumentaram consideravelmente após a inoculação da proteína K88, alcançando título máximo após a quinta imunização e posterior queda após a sétima e última inoculação. Além dos títulos de anticorpos produzidos pelas galinhas contra K88, também foi investigada a avidéz destes anticorpos. A avidéz em anticorpos se eleva ao longo do tempo conforme o animal é exposto sucessivamente a determinado antígeno. Este fenômeno ocorre devido à maturação da resposta, onde anticorpos de baixa avidéz são produzidos na fase inicial da resposta imune e anticorpos de alta avidéz são produzidos com a evolução da resposta (INOUE, 1984). Em estudo com venenos ofídicos, a alta avidéz de anticorpos IgY mostrou estar relacionada à capacidade de neutralização dos venenos (DE ANDRADE, 2013). Neste trabalho, galinhas constantemente estimuladas com a proteína K88, apresentaram o fenômeno da maturação da resposta, obtendo elevados índices de avidéz do início ao término do experimento. Assim como neste trabalho, em um estudo utilizando a citocina IL-6 na forma recombinante para imunizações de galinhas, também foram observados em algumas aves altos índices e constância na avidéz desde o início da resposta às imunizações (WOOLLEY, 1995).

A solução de anticorpos IgY anti-K88 extraída da gema mostrou conter altos níveis de anticorpos específicos contra *E. coli* K88⁺. Além disso, a solução de anticorpos IgY não

imune também demonstrou conter níveis de anticorpos naturais contra *E. coli* K88⁺ e o mesmo perfil de reconhecimento que IgY anti-K88. No entanto, a imunização das aves com a proteína K88 induziu uma intensificação de reconhecimento da proteína de 30 kDa em *E. coli* K88⁺, provavelmente correspondendo a fimbria K88 nativa. Além disso, houve a indução de uma intensa resposta à uma proteína de aproximadamente 60 kDa em *E. coli* HB 101.

Diversos estudos relatam o efeito protetor de IgY por administração oral em animais desafiados com ETEC (XIAO-YU, 2009; JIN, 1998; LI, 2009; KOVACS-NOLAN & MINE, 2005, 2012; MARQUARDT, 1999; RIBEIRO, 2005; SUNWOO, 2010; YOKOYAMA, 1992), sugerindo que anticorpos IgY podem reagir com microrganismos patogênicos, neutralizando ou inibindo a atividade de patógenos relacionados a doenças infecciosas. Um dos mecanismos pelos quais anticorpos podem ter uma ação contra patógenos é pela inibição da adesão do microrganismo às células do hospedeiro. Um número de estudos tem demonstrado que IgY pode impedir a aderência *in vitro* de microrganismos (CHALGHOUMI, 2009). Outro possível mecanismo pelo qual anticorpos IgY podem interferir na patogênese de doenças infecciosas é pela sua capacidade de aglutinar agentes patogênicos, uma vez que a aglutinação é reconhecida por interferir no crescimento de bactérias (TSUBOKURA, 1997). Por outro lado, alguns estudos sugerem que anticorpos IgY podem ter um efeito mais direto sobre o patógeno. Estudos *in vitro*, sugerem que IgY liga-se a moléculas superficiais bacterianas, as quais são essenciais para o crescimento bacteriano, o que leva à incapacidade funcional de tais componentes (CHALGHOUMI, 2009). Além disso, alterações morfológicas foram observadas em *E. coli* O157:H7 na presença de IgY específica, sugerindo que IgY causa distúrbios em seus processos celulares, levando a uma redução do crescimento bacteriano (SUNWOO, 2002). Por outro lado, outros estudos falham em mostrar a presença de alterações morfológicas sobre *Solobacterium moorei* causadas por IgY específicas, o que sugere que o mecanismo de supressão do crescimento bacteriano utilizado por IgY não decorre de alterações estruturais na bactéria (LI, 2012).

No presente estudo, as soluções de IgY não imune e IgY preparada de gema de ovos de galinhas imunizadas com a proteína recombinante K88, inibiram igualmente o crescimento de *E. coli* K88⁺ em cultura. A influência de IgY não imune sobre o crescimento de *E. coli* K88⁺ não surpreende, uma vez que a solução destes anticorpos demonstrou conter altos níveis de anticorpos específicos a antígenos da ETEC e um perfil de reconhecimento semelhante aos anticorpo IgY anti-K88. O efeito antibacteriano de IgY não imune também foi observado contra *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium (Chalmoghumi, 2009), *E. coli* O78:K80

(MAHDAVI, 2010) e *E. coli* O157:H7 (SUNWOO, 2002), onde IgY específica e não imune apenas apresentaram diferenças na ação sobre a bactéria quando em altas concentrações de 150 ou 180 mg/mL (MAHDAVI, 2010; SUNWOO, 2002). Neste trabalho não foi observada diferenças entre IgY específica e não imune na inibição de *E. coli* K88⁺, uma vez que a concentração máxima para avaliar ambos os anticorpos, foi a concentração de 10 mg/mL. Por outro lado, estudos mostram que IgY pode inibir o crescimento bacteriano em concentrações tão pequenas quanto 1 mg/mL (GUIMARÃES, 2009; CHALGHOUUMI, 2009). No entanto, tanto IgY anti-K88 quanto IgY não imune apresentaram inibição específica do crescimento de *E. coli* K88⁺, devido esta mesma eficácia não ser observada contra *E. coli* HB101, uma vez que o crescimento bacteriano foi inibido apenas na presença da maior concentração de ambos os anticorpos, imune e não imune. Este efeito antibacteriano específico sobre *E. coli* K88⁺, provavelmente, se deve às galinhas poedeiras apresentarem anticorpos específicos para *E. coli* K88⁺ até mesmo antes das imunizações, o que não ocorre para *E. coli* HB101.

O efeito antibacteriano de IgY sobre *E. coli* K88⁺ com padrão dose-dependente foi observado neste estudo e é observado em outros estudos com *E. coli* (SUNWOO, 2002, 2010), *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (CHALGHOUUMI, 2009), *Staphyococcus aureus* (GUIMARÃES, 2009), *Vibrio vulnificus* (KASSIM, 2012) e *Solobacterium moorei* (LI, 2012).

Em conclusão, anticorpos IgY produzidos em galinhas poedeiras demonstram bons títulos e altos índices de avidéz, além de exibirem um perfil de reconhecimento aos antígenos de *E. coli* antes e após as imunizações com a proteína recombinante, o que influenciou nos resultados de inibição do crescimento bacteriano. A IgY demonstrou possuir um efeito inibitório significativo no crescimento de *E. coli* K88⁺ até mesmo em baixas concentrações. Portanto, com base nos resultados de inibição do crescimento bacteriano *in vitro* obtidos neste estudo juntamente com relatos na literatura em relação ao efeito protetor que IgY proporciona *in vivo* a suínos desafiados com ETEC (XIAO-YU, 2009; JIN, 1998; LI, 2009; KOVACS-NOLAN & MINE, 2005, 2012; MARQUARDT, 1999; RIBEIRO, 2005; SUNWOO, 2010; YOKOYAMA, 1992), anticorpos IgY podem ser utilizados como uma ferramenta alternativa ao uso de antibióticos ou como um agente imunoterapêutico oral contra ETEC associada aos distúrbios entéricos de colibacilose.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir:

- Anticorpos séricos IgY de galinhas e IgG de coelhos, apresentam resposta imune humoral e índices de avidéz semelhantes contra as proteínas recombinantes utilizadas para a imunização de ambas as espécies.
- A imunização com as proteínas recombinantes K88 e F41 induziu uma resposta humoral em galinhas e coelhos, porém esta imunização não foi suficiente para que coelhos desenvolvessem uma resposta voltada à *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺, em especial às fímbrias presentes nas respectivas bactérias.
- Após as imunizações de galinhas com proteínas recombinantes, anticorpos séricos e da gema reconheceram com maior intensidade o antígeno de K88.
- Galinhas poedeiras apresentam níveis de anticorpos naturais séricos à *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺, demonstrando perfil de reconhecimento semelhante ao soro imune. Estes anticorpos naturais à *E. coli* K88⁺ e *E. coli* F41⁺, e anticorpos específicos à proteína recombinante K88 são transferidos do soro à gema, observando perfil de resposta e reconhecimento semelhantes em IgY de soros e gemas.
- Devido à ausência de resposta à *E. coli* K88⁺, soros de coelhos não influenciaram no crescimento bacteriano, enquanto tanto soro imune quanto soro não imune de galinhas inibiram o crescimento de *E. coli* K88⁺. No entanto, os soros de galinhas demonstraram efeito antibacteriano apenas quando na concentração de 10 mg/mL.
- Anticorpos IgY provenientes da gema de galinhas imunizadas e anticorpos IgY não imune (inespecífica), demonstraram inibir o crescimento de *E. coli* K88⁺ mesmo na concentração de 1 mg/mL.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ALMANZAR, G.; OTTENSMEIER, B.; PRELOG, M. Assessment of IgG avidity against pertussis toxin and filamentous hemagglutinin via an adapted enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using ammonium thiocyanate. **Journal of Immunological Methods**, v. 387, p. 36-42, 2013.
- ALMEIDA, C. M. C.; SILVA, C. L.; COUTO, H. P. et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 293-301, 2008.
- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from Egg-Yolk - Isolation and Purification. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 629-634, 1992.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório Anual, ABPA. 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>. Acesso em: 27/06/2014.
- AVORN, J.; SOLOMON, D. H. Cultural and Economic Factors That (Mis) Shape Antibiotic Use: The Nonpharmacologic Basis of Therapeutics. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, p. 128-135, 2000.
- BOLLEN, L. S. et al. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG: A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **Journal of immunological Methods**, v. 191, p. I I3- I20, 1996.
- BOYER, H.W. & ROULLAND-DUSSOIX, D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **Journal Molecular Biology**, v. 41, p. 459-472, 1969.
- BROECK, W. V. et al. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 223-244, 2000.
- CARLANDER, D. et al. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Upsala journal of medical sciences**, v. 104, p. 179-89, 1999.
- CARLANDER, D. Avian IgY antibody: in vitro and in vivo. **Upsala: Acta Universitatis Upsaliensis**, 2002.
- CARLANDER, D. et al. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunologic Research**, v. 21, p. 1-6, 2000.
- CARLANDER, D.; Larsson, A. Avian antibodies can eliminate interference due to complement activation in ELISA. **Upsala Journal of Medical Science**, v. 106, p. 189-195, 2001.

- CHALGHOUMI, R. et al. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enteric serovars Enteritidis and Typhimurium* in vitro. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 593-604, 2009.
- CHALGHOUMI, R. et al. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 13, p. 295-308, 2009.
- CHANG, H. M. et al. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 61-66, 1999.
- DÁVALOS-PANTOJA, L. et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **Journal of Biomaterial Sciences and Polymer Edition**, v. 11, p. 657-673, 2000.
- DÁVALOS-PANTOJA, L. et al. Colloidal stability of IgG- and IgY-coated latex microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 20, p. 165-175, 2001.
- DE ANDRADE, F. G. et al. The production and characterization of anti-botheric and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. **Toxicon**, v. 66, p. 18-24, 2013.
- DONG, D. et al. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) with a stable synthetic ligand. **Journal of Chromatography B**, v. 870, p. 51-54, 2008.
- FAIRBROTHER, J. M.; Nadeau, E.; Gyles, C. L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, v. 6; p. 17-39, 2005.
- FAITH, R. E.; Clem, L. W., Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population, **Immunology**, v. 25, p. 151, 1973.
- FENG, Y.; Liu, W.; Shi, D. Effectiveness of egg yolk antibody against shiga toxin II variant toxicity in vitro and in vivo. **Current Microbiology**, v. 67, p. 448-453, 2013.
- SMITH, H. W. Clinical problems of preventive medicine. **World's Poultry Science Journal**, v. 31, p. 104-15, 1975.
- FENG, Y.; Liu, W.; Shi, D. Effectiveness of egg yolk antibody against shiga toxin II variant toxicity in vitro and in vivo. **Current Microbiology**, v. 67, p. 448-453, 2013.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals: A Review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- GAASTRA, W.; GRAAF, F. K. Host-Specific Fimbrial Adhesins of Noninvasive Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. **Microbiological Reviews**, v. 46, p. 129-161, 1982.

GARDNER, P.S.; KAYEEGG, S. Globulins in rapid virus diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 4, p. 251- 262, 1982.

GASSMANN, M. et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, p. 2528-32, 1990.

GONZALEZ, E. A. et al. Isolation of K88 antigen variants (ab, ac, ad) from porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* belonging to different serotypes. **Microbiology and Immunology**. v. 39, p. 937–942, 1995.

GUIMARÃES, M. C. C. et al. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas on line**, v. 2, p. 122-29, 2008.

GUIMARÃES, M. C. C. et al. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. **Archives of Immunology and Experimental Therapy**, v. 57, p. 377–382, 2009.

GYLES C. L.; Prescott, J. F. Themes in Bacterial Pathogenic Mechanisms. In: GYLES, C. L. et al. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, **Wiley-Blackwell Publishing**, 4 ed., p. 3-11, 2010.

HANSEN, P. et al. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v. 215, p. 1-7, 1998.

HERMANS, D. et al. Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. **Veterinary Research**, v. 45, p. 1-12, 2014.

HIRAI, K. et al. Passive Oral Immunization by Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* Effectively Prevents Cholera. **Acta Medica Okayama**, v. 64, p. 163-170, 2010.

HUANG, Y. et al. Production of FaeG, the major subunit of K88 fimbriae, in transgenic tobacco plants and its immunogenicity in mice. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5436–5439, 2003.

INOUYE, S. ET al. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, p. 525-529, 1984.

JEURISSEN, S.H.M. Structure and function of the chicken spleen. 38th **Forum in Immunology: Research in immunology**, v. 142, p. 352-355, 1991.

JIN, L. Z. et al. In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 313-321, 1998.

KARLSSON, M.; Kollberg, H.; Larsson, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2004.

- KASSIM, N. et al. The In vitro and in vivo efficacy of hen IgY against vibrio parahaemolyticus and *Vibrio vulnificus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1423–1431, 2012.
- KIM, H.; Nakai, S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 485–490, 1998.
- KLEMPERER F. Über natürliche Immunität und ihre Verwertung für die Immunisierungstherapie. **Archives of experimental Pathology and Pharmacology**, v. 3, p. 356-82, 1893.
- KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. **Journal of Immunological Methods**, v. 296, p. 199-209, 2005.
- KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. **Annual Review Food Science Technology**, v. 3, p. 163-182, 2012.
- KOWALCZYK, K.; DAISS, J.; HELPERN, I.; ROTH, T.F. Quantitation of maternal–fetal IgG transport in the chicken. **Immunology**, v. 54, p. 755, 1985.
- KURONEN, I.; KOKKO, H.; MANONEN, I.; PARVIAINEN, M. Hen egg yolk antibodies purified by antigenaffinity under highly alkaline conditions provide new tools for diagnostics. Human intact parathyrin as a model antigen. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 435–440, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARSSON, A.; SJÖQUIST. J. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 108, p. 205-208, 1988.
- LARSSON, A.; KARISSON-PARRA, A.; Sjöquist. J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 411-414, 1991.
- LARSSON, A.; MELLSTEDT, H. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by human anti-mouse antibodies in ELISA after In vivo treatment with murine monoclonal antibodies. **Hybridoma**, v. 11, 1992.
- LEE, S. B.; MINE, Y. STEVENSON, R. M. W. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 110-115, 2000.
- LEE, E. N.; SUNWOO, H. H. MENNINEN, K.; SIM, J. S. In Vitro Studies of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Immunology and Molecular Biology**, v. 81, p. 632–641, 2002.

- LEE, S. H. et al. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. **Poultry Science**, v. 88, p. 562–566, 2009.
- LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of experimental medicine**, v. 130, n. 6, p. 1337-52, 1969.
- LI, X. et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. **Poultry Science**, v. 77, p. 266-70, 1998.
- LI, X. et al. Chicken egg yolk antibody (IgY) controls *Solobacterium moorei* under in vitro and in vivo conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1448–1458, 2012.
- LI, C. H. et al. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Vibrio anguillarum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 37, p. 108-114, 2014.
- LILLEHOJ, H.; TROUT, J. M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 349–360, 1996.
- LIU, J. et al. A new membrane based process to isolate immunoglobulin from chicken egg yolk. **Food Chemistry**, v. 122, p. 747–752, 2010.
- MAHDAVI, A. H. et al. Chicken egg yolk antibody (IgY) powder against *Escherichia coli* 078: K80. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, p. 366-373, 2010.
- MARQUARDT, R. R. et al. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 23, p. 283-288, 1999.
- MCLAREN, R.D. et al. The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunized with ovine α -lactalbumin. **Journal of Immunological Methods**, v. 177, 175-184, 1994.
- MICHAEL, A. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, p. 468-474, 2010.
- MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. **Journal of medicinal food**, v. 5, n. 3, p. 159-69, 2002.
- MORRIS, J. A.; THORNS, C.; SCOTT, A.C.; SOJKA, W. J.; WELLS, G. A. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. **Infection and Immunity**, v. 36, p. 1146-1153, 1982.

- MORRISON, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular immunology**, v. 38, p. 619-25, 2001.
- NARAT, M. Production of antibodies in chickens. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 259–267, 2003.
- NATARO, J. P; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.
- POLSON, A.; Von Wechmar, M.B.; Regenmortel, M.H.V.V. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Investigations**, v. 9, 475-493, 1980.
- RAJ, G. D. et al. Production, characterization and application of monoclonal antibodies against chicken IgY. **Veterinary Arquivos**, v. 74, 189-199, 2004.
- RATCLIFFE, M.J.H. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. **Dev. Comp. Immunol.** v. 30, p. 101–118, 2006.
- RIBEIRO, A. M. L. et al. Uso de Gemas de Ovos de Aves Hiperimunizadas Contra *Escherichia coli* Suína no Controle da Diarréia Neonatal de Leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38. p. 1234-1239, 2005.
- ROLLIER, C. et al. Maternally transferred antibodies from DNA-immunized avians protect offspring against Hepadnavirus infection. **Journal of Virology**, v. 74, p. 4908–4911, 2000.
- SCHADE, R. ET al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. **ATLA**, v. 24 p. 925–934, 1996.
- SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 33, n. 2, p. 129-54, 2005.
- SELLWOOD R. The interaction of the K88 antigen with porcine intestinal epithelial cell brush borders. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 632, p. 326–35, 1980.
- SELLWOORD, R. et al. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 8, p. 405-411, 1975.
- SHIMIZU, M. et al. Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106, p. 255-261, 1993.
- SHIN, J. H. et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 1061–1066, 2002.
- SILVA, W. D.; Tambourgi, D. V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in Immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 173–180, 2010.

SIM, J.S., SUNWOO, H.H. & LEE, E.N. Ovoglobulin Y. In: Naidu A.S., ed. **Natural food antimicrobial systems**. New York, USA: CRC Press, p. 227-252, 2000.

SITNIK, O. et al. Production and characterization of egg yolk antibodies against bovine alimentary tract pathogens. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, V. 16, p., 283–29, 2013.

SPILLNER, E. et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostic and therapy. **Biologicals**, v. 40, p. 313-322, 2012.

SONG, J. H. et al. *In vitro* effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 419–425, 2007.

SONG, S. M. et al. Growth inhibition of *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores using chicken immunoglobulin Y. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 511–520, 2009.

SPILLNER, E. et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostic and therapy. **Biologicals**, v. 40, p. 313-322, 2012.

SUN, S.; MO, M.; JI, Y.; LIU, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 15, p. 708-712, 2001.

SUNWOO, H. H. et al. Growth Inhibitory Effect of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Science**, v. 67, 2002.

SUNWOO, H. H. et al. Growth inhibition of *Escherichia coli* 987P by neutralizing IgY Antibodies. **The Open Immunology Journal**, v.3, p. 1-8, 2010.

SUZAN H.M. JEURISSEN, S. H. M. et al. Post-natal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. **Cell Tissue Research**, v. 258, p. 119-124, 1989.

TAN, S. H. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **Journal of Immunological Methods**, v. 380, p. 73–76, 2012.

TSUBOKURA, K. et al. Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 108, p. 451-455, 1997.

TU, Y. Y.; CHENG, C. C.; CHANG, H. M. Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. **Food Research International**, v. 34, p. 783-789.

VIDOTTO, M.C.; MULLER, E.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A. Estudo genético de fatores de patogenicidade em *Escherichia coli* isoladas de suínos na região de Londrina, PR. **Semina**, v. 7, p. 38-46, 1986.

- WARR, G. W. et al. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, n. 8, p. 392-8, 1995.
- WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso Racional de Medicamentos: Temas relacionados**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.
- WEN, J. et al. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B vírus. **Antiviral Research**, v. 93, p. 154–159, 2012.
- WOOLLEY, J.A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. **Journal of Immunological Methods**, v. 178, p. 253-265, 1995.
- X.-Y., L. et al. Chitosan–alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): In vivo evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 132–136, 2009.
- 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, p. 860–868, 2011.
- YAMAMOTO, H.; WATANABE, H.; SATO, G.; MIKAMI, T. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. **Japanese Veterinary Research**, v. 23, n. 4, p. 131-140, 1975.
- YOKOYAMA, H. et al. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 998-1007, 1992.
- YOU, J. et al. Chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) developed against fusion protein LTB-STa-STb neutralizes the toxicity of *E. coli* heat-stable enterotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, Online version, 2014.
- ZHANG, W.; FANG, Y.; FRANCIS, D. H. Characterization of the binding specificity of K88ac and K88ad fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* by constructing K88ac/K88ad chimeric FaeG major subunits. **Infection and Immunity**, v. 77 p. 699–706, 2009.