FÁBIO GOULART DE ANDRADE

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgY E DAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA DE GALINHAS POEDEIRAS INOCULADAS COM VENENOS DE SERPENTES

Londrina
2011

FÁBIO GOULART DE ANDRADE

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgY E DAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA DE GALINHAS POEDEIRAS INOCULADAS COM VENENOS DE SERPENTES

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

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2011

Catalogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A553a Andrade, Fábio Goulart de.
Análise da produção de anticorpos IgY e das características histológicas do baço e da medula óssea de galinhas poedeiras inoculadas com venenos de serpentes/ Fábio Goulart de Andrade. – Londrina, 2011.
94 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, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Imunoglobulinas – Teses. 2. Aves – Teses. 3. Órgãos – Teses. 4. Linfóides secundários – Teses. 5. Acidentes ofídicos – Teses. 6. Imunooterapia. Teses. I. Venancio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação emPatologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

FÁBIO GOULART DE ANDRADE

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgY E DAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA DE GALINHAS POEDEIRAS INOCULADAS COM VENENOS DE SERPENTES

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

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Emerson José Venancio
UEL – Londrina - PR

_____
Prof. Dr. Wagner Loyola
EMBRAPA – Concórdia - SC

_____
Profa. Dra. Solange de Paula Ramos
UEL – Londrina - PR

_____
Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
UEL – Londrina - PR

_____
Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
UEL – Londrina - PR

Londrina, 14 de julho de 2011.

A Deus, que torna tudo possível.
Aos meus pais, que ensinaram no passado a sempre pensar no futuro.
Aos meus amigos, que fazem do presente algo tão bonito e tão intenso.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Emerson José Venancio*, por ser um exemplo de profissional e grande modelo de pesquisador, por ter acreditado, por todo o direcionamento, pelos conselhos e orientações, pela paciência e pela amizade, construída ao longo destes quase 4 anos de convivência.

Aos membros da comissão examinadora na sessão de qualificação, Profa. Dra. *Solange de Paula Ramos* e Prof. Dr. *Mário Augusto Ono* e à comissão examinadora na sessão de defesa, Prof. Dr. *Wagner Loyola*, Profa. Dra. *Solange de Paula Ramos*, Profa. Dra. *Eiko Nakagawa Itano*, Prof. Dr. *Wander Rogério Pavanelli*, pelas valiosas contribuições e correções, que melhoraram e enriqueceram o conteúdo deste trabalho.

À Profa. Dra. *Solange de Paula Ramos*, por ser a principal mentora deste processo, pela parceria, pelo apoio constante, pela presença, pela grande amizade e por representar um marco na minha vida profissional e pessoal.

À minha ex-orientadora, Profa. Dra. *Ângela Maria Ferreira Falleiros*, pelos ensinamentos, pelo incentivo e por ter fornecido uma base sólida para minha vida acadêmica e profissional.

À Profa. Ms. *Neila Recanello Arrebola* e ao Prof. Dr. *Osny Ferrari*, com quem aprendi muito, dentro e fora de sala de aula; por serem as pessoas nas quais me espelho cada vez que me proponho a ensinar.

À Profa. Dra. *Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade*, por ter sido o primeiro “anjo da guarda”, no início de minha vida acadêmica, quando eu nem imaginava que poderia chegar tão longe.

Aos colegas e amigos de laboratório, de projeto de pesquisa, cada um teve participação mais que especial em uma ou mais etapas deste processo, agradeço pela companhia, pela torcida, pela amizade e pela tantas coisas que aprendi na convivência com vocês. *Silas Fernandes Eto* e *Narciso Junior Vieira*, meus “braços direito e esquerdo” dentro do laboratório de Imunologia IV, muito obrigado pela imensa colaboração, pelos desafios que juntos superamos e pela amizade de vocês. *Ana Paula Cheirubim*, *Lucimila Luchesi Jorge*, *Sandmary Dechechi Chambó* e *Bárbara Gionco*, agradeço pelo auxílio, pelos conselhos, pela

parceria, amizade e apoio em muitos momentos. *Amanda de Fáveri Pitz*, pela grande amizade e pela sugestão simples e inteligente que salvou um dos meus experimentos, não há como esquecer. *Eduardo Vignoto Fernandes* pelo exemplo de garra, determinação e competência, além da grande amizade.

Às coorientandas, coautoras deste trabalho e pessoas muito especiais, *Denise Turini Gonzales Marioto* e *Ana Carolina Navarro dos Santos Ferraro*. O envolvimento e a participação de vocês tornou este processo mais leve e prazeroso. Agradeço pelos anos de excelente convivência, pela dedicação, pelo pouco que pude ensinar e pelo muito que aprendi junto a vocês.

Ao Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina, por permitir a utilização do Laboratório de Histologia, onde parte dos procedimentos experimentais foi desenvolvida. Em especial, agradeço à Profa. Dra. *Fernanda Pacheco Lassance*, à Profa. Dra. *Ana Cláudia Swarça*, à Profa. Dra. *Sheila Michele Levy*, ao prof. Dr. *Júlio de Mello Neto*, à *Aparecida Sturion*, à *Renata Baldo Rodrigues Carvalho* e à *Andreia Carla Eugênio Pupim*, pela ótima convivência e pela amizade, além de todo apoio e atenção dispensados ao logo destes anos.

Ao Prof. Ms. *Luiz Carlos Juliani*, pelo apoio, pelos valiosos conselhos e por disponibilizar parte do Biotério Central; ao Prof. Dr. *João Waine Pinheiros*, por permitir a utilização da Fazenda Escola; ao Prof. *Célio Roberto Estanislau* por ceder parte do Biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento; locais estes, na Universidade Estadual de Londrina, onde alguns procedimentos experimentais foram realizados.

Aos *Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda*, pelos materiais gentilmente fornecidos e ao *Laboratório de Patologia Clínica Veterinária* da Universidade Estadual de Londrina, pelo auxílio prestado.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental*, em especial à Profa. Dra. *Maria Angélica Ehara Watanabe*, pelo carinho e incentivo durante o curso.

À *Universidade Norte do Paraná*, pelo auxílio a mim concedido enquanto docente desta instituição, através do Plano Institucional de Capacitação Docente. Em especial, agradeço a *Bruno Cézar Scaramuzza* e *Melina Klaus*, coordenadores dos cursos de Tecnologia em Processos Gerenciais e Pedagogia,

respectivamente, e à *Denise Sant`Anna Pavan*, pela grande amizade, pela compreensão, pelo encorajamento e por acompanharem de perto, mesmo que indiretamente, o desenvolvimento deste trabalho.

À psicóloga *Elsie Pereira da Silva*, por também ter acompanhado e apoiado a realização deste sonho, pela amizade e pelo imenso carinho, por auxiliar a compreender e a lidar com tantas coisas do passado e do presente.

Aos amigos biólogos, *Tatiana da Silva Pereira, Marise Tanaka Suzuki, Sarah Fernanda Bonorah, Priscilla Davidson Negraes, Maria Cláudia Cordeiro de Negreiro, Viviane Cristina Schiabel, Josiane Alessandra Vignoli, Marcelle Carolina Colhone, Fábio Vieira dos Santos, Luís Gustavo de Lázaro Rampazzo*, que sempre torceram pelo sucesso deste trabalho.

Aos meus amigos de "longe": *Silmar Henrique Missiato Araújo, Natália Favreto Faria Plantier, Gabriel Plantier, João Francisco Amigo Gimenez, Pedro Henrique Flores Bueno, Maria Helena Lopes Amigo, Renato Vaz Neves, Flávia Verusca Buturi Monarin Matos* e *Douglas Terêncio do Vale*, pela torcida e pelo grande sentimento que, de certa forma, nos aproxima.

Aos meus amigos de "perto": *Danielle Bonvechio Rissi, Carlos César Rodrigues das Neves, Eduardo Henrique Duarte, Jeudy Riquerme Taques, Christian Vieira de Souza, Raquel Favreto Faria, Luciana Salomão e Alex Jefferson Fernandes Correa* por estarem presentes em momentos de angústia e principalmente nos bons momentos, compartilhando alegrias, tornando tudo mais divertido; pela paciência, pelos tantos conselhos e por agirem muitas vezes como irmãos, representando de forma tão significativa a "família" que tenho em Londrina.

Aos meus pais, *Hélio Goulart de Andrade* e *Odete Ruotolo de Andrade*, minha real inspiração e motivação mais forte. Sobre eles poderia escrever páginas e mais páginas de agradecimentos, por tudo o que significam em minha vida, mas aqui, cabe o mais verdadeiro e intenso: *muito obrigado*!

Enfim, agradeço a *Deus*, por tudo.

"Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas..."

Luis Fernando Verissimo

ANDRADE, Fábio Goulart de. **Análise da produção de anticorpos IgY e das características histológicas do baço e da medula óssea de galinhas poedeiras inoculadas com venenos de serpentes**. 2011. 94 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Acidentes ofídicos são causados principalmente por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* e tratados pela administração de antissoro de mamíferos. Como alternativa a este procedimento, a utilização de anticorpos IgY antiveneno produzidos em galinhas poedeiras tem sido avaliada nos últimos anos. Neste trabalho foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, foi investigada a participação do baço e da medula óssea na produção de anticorpos IgY em galinhas poedeiras white leghorn (*Gallus gallus domesticus*) imunizadas com veneno crotálico. Amostras de soro e gema foram coletadas durante o experimento, para análise da produção de anticorpos IgY. Ao final deste, o baço e a medula óssea dos animais foram coletados e submetidos à análise histológica. Os resultados mostraram um aumento dos anticorpos IgY crotálico no soro e na gema, a partir do 32º dia após a primeira imunização. Estes níveis permaneceram elevados à medida que foram administradas doses de reforço do veneno usado como antígeno. A inoculação de veneno crotálico em galinhas poedeiras induziu a produção de anticorpos IgY, principalmente na polpa branca perielipsoidal do baço e também no espaço extravascular da medula óssea. No segundo experimento, galinhas poedeiras foram imunizadas com venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* e observadas durante 367 dias. Os anticorpos IgY antiveneno foram coletados no soro e na gema dos ovos e avaliados segundo os seguintes parâmetros: níveis, avidez, padrão de reconhecimento antigênico e eficácia. Os níveis de anticorpos IgY antibotrópico anticrotálico produzidos aumentaram significativamente após a segunda imunização e assim permaneceram até o final do experimento. Índices significativamente elevados de avidez foram observados para anticorpos IgY antibotrópico no 142º dia e para anticorpos IgY anticrotálico no 232º dia após a primeira imunização. Os anticorpos IgY antibotrópico reconheceram antígenos de massa molecular de 25 kDa e 50 kDa, enquanto os anticorpos IgY anticrotálico reconheceram principalmente antígenos de massa molecular de 14 kDa e 30 kDa. Os antígenos foram mais bem reconhecidos ao final do período experimental. Utilizando amostras de soluções aquosas de anticorpos com concentração proteica de 15 mg/ml verificou-se que a solução contendo IgY antibotrópico apresentou eficiência 290µl/3DL_{50} e potência 0,307mg/ml. As amostras de solução aquosa contendo anticorpos IgY anticrotálico apresentaram eficiência 246µl/4DL_{50} e potência de 0,829 mg/ml. A produção de anticorpos IgY antibotrópico e anticrotálico pôde ser melhorada mediante administração de sucessivas doses dos venenos durante período de imunização superior a 6 meses, afim de se atingirem níveis de anticorpos e índices de avidez mais elevados. A avidez elevada e a maior concentração dos anticorpos IgY antiveneno permitiram a neutralização de componentes tóxicos dos venenos inoculados, impedindo seus efeitos letais, sugerindo que estes anticorpos tenham aplicabilidade no tratamento de acidentes ofídicos.

Palavras-chave: Imunoglobulinas. Aves. Órgãos linfoides secundários. Acidentes ofídicos. Imunoterapia.

ANDRADE, Fábio Goulart de. **Analysis of the production of IgY antibodies and histological characteristics of the spleen and bone marrow of laying hens inoculated with snake venoms**. 2011. 94 p. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Ophidian accidents are mainly caused by snakes from the genus *Bothrops* and *Crotalus*, and are treated with administration of mammal antiserum. The utilization of antivenin IgY antibodies produced in laying hens has been evaluated in recent years as an alternative to this procedure. This study carried out two experiments. The first experiment investigated the participation of the spleen and the bone marrow in the production of IgY antibodies in white leghorn (*Gallusgallusdomesticus*) laying hens immunized with crotalic venom. Samples of serum and yolk were collected during the experiment to analyze the production of IgY antibodies. At the end, the spleen and bone marrow from the animals were collected and submitted to histological analysis. The results showed an increase in crotalic IgY antibodies in the serum and yolk beginning on the 32nd day after the first immunization. These levels remained high as reinforcement doses of the venom used as antigen were applied. The inoculation of crotalic venom in laying hens induced the production of IgY antibodies, particularly in the periellipsoidal white pulp of the spleen and also in the extravascular space of the bone marrow. In the second experiment, laying hens were immunized with venom from snakes from the genus *Bothrops* and *Crotalus*, and were observed for 367 days. The IgY antivenin antibodies were collected from serum and egg yolks and evaluated according to the following parameters: level, avidity, pattern of antigen recognition, and efficacy. The levels of anticrotalic antibothropic IgY antibodies increased significantly after the second immunization, and remained high until the end of the experiment. Significantly high avidity indexes were observed for antibothropic IgY antibodies on the 142nd day and for anticrotalic IgY antibodies on the 232nd day after the first immunization. Antibothropic IgY antibodies recognized antigens with molecular masses of 25 kDa and 50 kDa, whereas anticrotalic IgY antibodies recognized mainly antigens with a molecular mass of 14 kDa and 30 kDa. The antigens were better recognized at the end of the experimental period. Using samples of aqueous antibody solutions with a protein concentration of 15 mg/ml, this study observed that the solution containing antibothropic IgY presented an efficiency of 290µl/3DL$_{50}$ and a potency of 0.307mg/ml. The samples of aqueous solution containing anticrotalic IgY antibodies presented an efficiency of 246µl/4DL$_{50}$ and a potency of 0.829 mg/ml. The production of antibothropic and anticrotalic IgY antibodies could be improved through the administration of successive doses of venom during immunization periods longer than 6 months in order to reach higher antibody and avidity levels. High avidity and higher concentrations of antivenin IgY antibodies allowed the neutralization of toxic components of the inoculated venoms, averting their lethal effects, which suggests that these antibodies could be applied in the treatment of ophidian accidents.

Keywords: Immunoglobulin. Birds. Secondary lymphoid organs. Ophidian accidents. Immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Níveis de imunoglobulinas IgY anticrotálico presentes no soro (A) e na gema (B) de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3) durante o período de 97 dias, expressos em OD (densidade óptica a 450 nm). 38

Figura 2 - Fotomicroscopia do baço de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3). 39

Figura 3 - Análise dos elementos histológicos constituintes do baço de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3).. 40

Figura 4 - Fotomicroscopia da medula óssea de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3). 41

Figura 5 - Análise dos elementos histológicos constituintes da medula óssea de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3). 42

Figura 6 - Níveis de imunoglobulinas IgY antibotrópico e IgY anticrotálico presentes no soro (A e B) e na gema (C e D) de galinhas poedeiras inoculadas com 125 µg de veneno crotálico e 125 µg de veneno botrópico, respectivamente. 58

Figura 7 - Índices de avidez das imunoglobulinas IgY antibotrópico (A) e anticrotálico (B) presentes no soro de galinhas poedeiras inoculadas com 125 µg de veneno botrópico e 125 µg de veneno crotálico, respectivamente, verificados ao longo do experimento. 58

Figura 8 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) dos venenos botrópico (A) e crotálico (B) e análise por *Western blot* dos componentes dos venenos reconhecidos por anticorpos IgY presentes no soro e na solução aquosa extraída da gema dos ovos do 232º dia de galinhas poedeiras imunizadas e por IgG presente no soro de cavalos imunizados. 59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 13

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 O Sistema Imune das Aves 15
2.2 A Resposta Imune nas Aves 18
2.3 A Imunoglobulina IgY 20
2.4 O Uso de IgY em Imunoterapia 21
2.5 Acidentes Ofídicos 23
2.6 Referências 25

3 ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY E AS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA DE GALINHAS POEDEIRAS WHITE LEGHORN (*Gallus gallus domesticus*) INOCULADAS COM VENENO DE SERPENTES DA ESPÉCIE *Crotalus durissus terrificus* 31
3.1 Resumo 31
3.2 Introdução 31
3.3 Material e métodos 34
3.3.1 Veneno 34
3.3.2 Animais 34
3.3.3 Imunização das Galinhas 34
3.3.4 Determinação dos Níveis de Anticorpos IgY Anticrotálico 35
3.3.5 Caracterização Histológica 36
3.3.6 Análise Estatística 37
3.4 Resultados 37
3.4.1 Níveis de Anticorpos IgY Anticrotálico 38
3.4.2 Caracterização Histológica do Baço 38
3.4.3 Caracterização Histológica da Medula Óssea 41
3.5 Discussão 42
3.6 Referências 45

4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTIBOTRÓPICO E ANTICROTÁLICO DE GALINHAS POEDEIRAS EM UM EXPERIMENTO DE LONGA DURAÇÃO.....50
4.1 RESUMO.....50
4.1.1 INTRODUÇÃO.....50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....52
4.2.1 Venenos.....52
4.2.2 Animais.....52
4.2.3 Imunização das Galinhas.....53
4.2.4 Extração e Quantificação IgY.....53
4.2.5 Determinação dos Níveis de Anticorpos IgY Antibotrópico e IgY Anticrotálico.....54
4.2.6 Determinação da Avidez de Anticorpos IgY Antibotrópico e IgY Anticrotálico.....55
4.2.7 Caracterização dos Antígenos Reconhecidos Pelos Anticorpos IgY Antibotrópico e IgY Anticrotálico por Western blot.....55
4.2.8 Determinação da Toxicidade Letal dos Venenos, da Eficácia de Neutralização e da Potência dos Antivenenos em Camundongos.....56
4.2.9 Análise Estatística.....57
4.3 RESULTADOS.....57
4.4 DISCUSSÃO.....60
4.5 REFERÊNCIAS.....64

5 CONCLUSÕES GERAIS.....68

APÊNDICES.....69
APÊNDICE A - Artigo Submetido ao Periódico Toxicon.....70

1 INTRODUÇÃO GERAL

Diversos estudos recentes têm descrito a produção de anticorpos em galinhas poedeiras. Este interesse é devido aos altos níveis de anticorpos que podem ser obtidos a partir da gema do ovo. Por isso, a utilização de anticorpos da classe IgY pode ser uma alternativa de menor custo para produção de anticorpos policlonais em mamíferos. Além da importância econômica, a produção de anticorpos IgY é realizada de maneira menos invasiva, minimizando o sofrimento do animal, como também permite a redução do número de animais necessários para se obter uma determinada quantidade de anticorpos.

Devido a estas vantagens, a possibilidade de utilização de anticorpos IgY na pesquisa, no diagnóstico, na imunoprofilaxia e na imunoterapia é um fator determinante no desenvolvimento de estudos sobre metodologias de permitam uma maior produção e purificação destes anticorpos.

Dentre essas pesquisas, destaca-se destaque a inoculação de galinhas poedeiras com venenos de inúmeras espécies de serpentes. As galinhas poedeiras produzem e transferem seus anticorpos neutralizantes para a gema dos ovos, de onde podem ser extraídos em grande quantidade e baixo custo, sem necessidade de sangria do animal. Uma vez que a ocorrência de acidentes ofídicos com serpentes dos gêneros *Bothrops* (jararacas) e *Crotalus* (cascavéis) é comum em países de clima tropical como o Brasil, a produção de anticorpos antiveneno em galinhas poedeiras pode representar uma alternativa ao tratamento dos envenenamentos causados nestes acidentes, onde geralmente é utilizado antissoro produzido em mamíferos.

A utilização de galinhas poedeiras como fonte ética e economicamente viável de anticorpos depende de estudos sobre o sistema imune destes animais. Nas últimas décadas, o sistema imune das aves tem sido amplamente estudado, principalmente em relação ao desenvolvimento das respostas imunes e dentro de modelos de infecção. Entretanto, são escassas as informações referentes à constituição e à participação de tecidos e órgãos linfoides de galinhas poedeiras nas respostas imunes e sobre os locais onde os mecanismos de defesa efetivamente se processam nestes animais.

Assim, este trabalho teve por objetivo geral:

- Analisar a produção de anticorpos IgY e as características histológicas do baço e da medula óssea de galinhas poedeiras inoculadas com venenos de serpentes.

Como objetivos específicos, propusemo-nos:

- Avaliar os níveis de anticorpos IgY antiveneno produzidos por galinhas poedeiras inoculadas com venenos de serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus;*
- Investigar a participação do baço e da medula óssea na produção destes anticorpos, através da análise de suas características histológicas;
- Avaliar os níveis, a avidez, o padrão de reconhecimento antigênico e a eficácia de anticorpos IgY presentes no soro e na gema de galinhas poedeiras imunizadas com doses sucessivas de venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

Visando atingir os objetivos acima propostos, este trabalho foi elaborado em conformidade com as normas vigentes do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, para apresentação de Dissertações e Teses, sendo constituído por uma Revisão Bibliográfica e 2 artigos científicos baseados nas pesquisas experimentais realizadas.

A estrutura geral desta tese obedece às normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas para apresentação de trabalhos acadêmicos – ABNT NBR 14724:2011.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O SISTEMA IMUNE DAS AVES

O sistema imune das aves é constituído por células, tecidos e órgãos que participam dos mecanismos de imunidade inata e adquirida, à semelhança do observado em mamíferos (STURKIE; BENZO, 1986; TIZARD, 2002). Entretanto, existem diferenças importantes com relação aos órgãos linfoides de aves e mamíferos (JEURISSEN et al., 1992; JEURISSEN; JANSE, 1994).

Em aves e mamíferos os linfócitos são originados a partir de precursores presentes na medula óssea e migram para os órgãos linfoides primários onde se diferenciam em linfócitos T e B. O timo é o local de maturação dos linfócitos T em aves e mamíferos. No entanto, na maioria dos mamíferos, a maturação dos linfócitos B ocorre na medula óssea, enquanto em aves, na bursa de Fabricius (STURKIE; BENZO, 1986; TIZARD, 2002). Além disso, são observadas diferenças quanto aos tecidos e órgãos linfoides secundários. Em aves, são órgãos linfoides secundários: o baço, as tonsilas cecais, a glândula de Harder e podem ser encontrados tecidos linfoides associados às mucosas dos sistemas digestórios, respiratório e reprodutor. Em algumas espécies, como nas galinhas, não são encontrados linfonodos (SCOTT, 2004).

O timo é um órgão que apresenta o micro ambiente ideal para o desenvolvimento dos linfócitos T (ERF, 2004). É neste órgão que os linfócitos T adquirem seu repertório de receptores para antígenos e tornam-se capazes de reconhecer as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal. O timo das aves é histologicamente semelhante ao dos mamíferos, apresentando uma região cortical e uma região medular. A região cortical é caracterizada pela presença de linfócitos T imaturos, denominados timócitos, enquanto os linfócitos T maduros são principalmente encontrados na região medular. A migração dos linfócitos T imaturos da medula óssea para o timo tem início entre o sexto e oitavo dia do desenvolvimento embrionário. Em galinhas a involução do timo ainda não está completamente caracterizada como em mamíferos. No entanto, após três meses de vida este órgão apresenta redução progressiva das regiões corticais e medulares, com declínio da atividade imunológica (KENDALL, 1980; AITA et al., 1995; CIRIACO et al., 2003).

A bursa de Fabricius é um órgão encontrado somente em aves, com formato de um saco oco, localizado dorsalmente à cloaca com a qual se comunica através de um ducto (CIRIACO et al., 2003). A função imunológica deste órgão foi descoberta na década de 1950, quando se observou que, após a remoção cirúrgica da bursa de Fabricius, as aves não apresentavam resposta imune humoral eficaz, enquanto que a resposta imune mediada por células não foi afetada. Relacionou-se então este órgão à maturação das células produtoras de anticorpos, os linfócitos B (SCOTT, 2004). A bursa de Fabricius é revestida internamente por dobras de tecido epitelial, que se projetam em direção à luz do órgão. Estas dobras são sustentadas por tecido conjuntivo, com ocorrência de inúmeros folículos linfoides. Estes folículos apresentam uma região cortical rica em linfócitos, linfoblastos, plasmócitos e macrófagos e uma região medular onde são encontrados principalmente linfócitos, linfoblastos, reticulócitos e plasmócitos (STURKIE; BENZO, 1986; TIZARD, 2002). Após o desenvolvimento, maturação e ativação, os linfócitos B migram para outros órgãos linfoides secundários, onde desempenham suas funções imunológicas (HEMMINGSSON, 1972).

A glândula de Harder é encontrada numa região posterior e medial ao globo ocular das aves. Suas funções relacionam-se à secreção de um líquido viscoso que lubrifica a superfície do globo ocular e a produção de imunoglobulinas (SHIRAMA et al., 1996). Nas galinhas, a glândula de Harder apresenta estrutura lobular e é constituída por unidades glandulares, cuja porção secretora é tubuloacinar. Entre as unidades secretoras, ocorrem células intersticiais e acúmulo de linfócitos. A maioria dos linfócitos presentes nesta glândula são do tipo B, produtores de IgA, detectada na secreção glandular (BURNS, 1975; BABA et al., 1988)

As tonsilas cecais são estruturas bilaterais localizadas na junção do intestino delgado com o intestino grosso (STURKIE; BENZO, 1986; TIZARD, 2002). Apresentam características histológicas semelhantes às encontradas ao longo do intestino, como mucosa, submucosa, regiões de criptas glandulares e células epiteliais, camada de tecido muscular e presença marcante de tecido linfoide associado à mucosa (KATO et al., 1992). As tonsilas cecais contêm em sua luz vários microrganismos residentes da microbiota bacteriana normal do intestino. O tecido linfoide associado à mucosa nesta região apresenta linfócitos B, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos e células M. Neste tecido linfoide ocorre a

produção de imunoglobulinas, responsáveis pela regulação da alta atividade bacteriana local e pela defesa contra infecções do trato gastrointestinal (KAJIWARA et al., 2003).

As Placas de Peyer são acúmulos de tecido linfoide associados à mucosa intestinal das aves, semelhantes aos encontrados no intestino de mamíferos. São localizadas na região do íleo e na junção ileocecal do intestino das aves (VAUGHN et al., 2006). Sua função imunológica está relacionada ao controle da microbiota bacteriana intestinal e à defesa contra a invasão de microrganismos patogênicos ou oportunistas através da mucosa. No tecido linfoide podem ser encontrados plasmócitos produtores de imunoglobulinas da classe IgA, linfócitos T e células apresentadoras de antígeno (KAJIWARA et al., 2003; KOZUKA et al., 2010)

A medula óssea das aves participa da resposta imune humoral, além de sua função hematopoiética (IVANYI et al., 1972; LAWRENCE et al., 1981). O estroma medular é constituído por células endoteliais sinusoidais e células reticulares (SORRELL; WEISS, 1980) que dividem o órgão em dois compartimentos distintos: intravascular e extravascular (FUJITA et al., 1982; SIATSKAS; BOYD, 2000). O compartimento intravascular, que ocupa o interior dos sinusoides, é caracterizado pela presença de numerosos eritrócitos e trombócitos, em diversos estágios de formação, (FUJITA et al., 1982; OLÁH; VERVELDE, 2008). No compartimento extravascular são encontrados acúmulos de linfócitos, plasmócitos e mastócitos (FUJITA et al., 1982).

Como em mamíferos, nas aves o baço responde a antígenos presentes na circulação sanguínea, além de ser responsável pela seleção e destruição de hemácias envelhecidas (JEURISSEN, 1991; JOHN, 1994; SCOTT, 2004). O baço apresenta-se envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso que penetra no parênquima do órgão, formando pequenas trabéculas. Estas trabéculas permeiam regiões denominadas de polpa vermelha e polpa branca (STURKIE; BENZO, 1986). A polpa vermelha é constituída por sinusoides e cordões celulares que apresentam macrófagos, granulócitos, células reticulares e eventuais linfócitos circulantes. A polpa branca é constituída pelas ramificações da artéria trabecular, denominadas arteríolas centrais, envolvidas por bainhas de tecido linfoide, ricas em linfócitos T, denominadas bainhas linfoides periarteriolares. Entre as bainhas, ocorrem acúmulos de linfócitos B em formações nodulares, os chamados centros germinativos ou em agregados próximos aos elipsoides, denominados polpa branca

perielipsoidal. Estas regiões estão relacionadas à produção de imunoglobulinas no baço destes animais (JEURISSEN, 1991; JEURISSEN et al., 1992; JEURISSEN, 1993; JEURISSEN; JANSE, 1994)

2.2 A RESPOSTA IMUNE NAS AVES

O sistema imunológico das aves apresenta a mesma organização funcional dos mamíferos (SKWARLO-SONTA, 1999). Há mecanismos relacionados à imunidade inata e à imunidade adaptativa (TIZARD, 2002).

A imunidade inata atua como uma primeira linha de defesa contra infecções, respondendo rapidamente contra organismos invasores de forma padronizada e inespecífica. Entretanto, não apresenta a habilidade de responder com intensidade crescente aos desafios repetidos de um mesmo organismo (CARLANDER, 2002; MORGULIS, 2002).

A pele e as mucosas agem como barreiras para impedir a invasão de patógenos. Os cílios, a secreção mucosa e o reflexo da tosse expelem o material inalado das vias respiratórias. No trato gastrintestinal destacam-se o pH baixo do estômago e a microbiota bacteriana normal do intestino que age competindo por nutrientes essenciais ou produzindo substâncias inibitórias contra organismos invasores (CARLANDER, 2002).

A imunidade adaptativa depende da habilidade do sistema imune reconhecer de forma específica substâncias exógenas, responder a essas substâncias e memorizar essa informação em caso de exposições repetidas. Estes mecanismos adquiridos representam o principal modo pelo qual as aves respondem à estimulação antigênica (DHAMA et al., 2006) e, assim como em mamíferos, pode ser dividida entre resposta imune celular e humoral (SKWARLO-SONTA, 1999). De maneira geral, a estimulação antigênica inicia uma resposta imune que envolve a cooperação celular: células fagocíticas processam o antígeno e o apresentam aos linfócitos; Linfócitos T, as células mais importantes na imunidade celular, se diferenciam em subpopulações funcionalmente diversificadas; linfócitos B, as principais células que medeiam a imunidade humoral, transformam-se em plasmócitos e produzem imunoglobulinas (SHARMA, 1991).

A imunidade celular compreende a interação dos receptores dos linfócitos T com o antígeno (ARSTILA et al., 1994). Na imunidade celular, são produzidas grandes quantidades de células imunocompetentes, entre elas os macrófagos, as células *Natural killers* e as células T CD8+, capazes de eliminar especificamente as células alteradas do organismo. A ativação destas células efetoras geralmente é dependente da participação de células T CD4+. (ERF, 2003).

Na resposta imune humoral, em aves, imunoglobulinas são produzidas e secretadas por células B e plasmócitos. As células B são linfócitos não estimulados, imaturos. Estas células, em contato com o antígeno e estimuladas pelas células T CD4+, diferenciam-se em plasmócitos (TIZARD, 2002).

Imunoglobulinas são glicoproteínas que tem como propriedade básica a ligação específica ao antígeno, podendo desencadear reações como neutralização, aglutinação, precipitação, opsonização e ativação do sistema complemento (CARLANDER et al., 1999).

A diversidade de imunoglobulinas nas aves está relacionada à conversão gênica, mecanismo de geração de diversidade diferente da recombinação gênica, comumente observada em mamíferos. Nas aves ocorre uma recombinação não recíproca entre genes homólogos, onde uma porção da informação genética é transmitida de uma sequência doadora para outra aceptora. Desta maneira, nos *loci* onde se encontram os genes responsáveis pela codificação das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas, são inseridos fragmentos de um grande número de pseudogenes. A inserção desses fragmentos é responsável pela diversidade das moléculas de anticorpo (SCHADE et al., 2005). Nas aves, em relação à porção constante, são encontradas três classes de imunoglobulinas: IgM, IgA e IgY (CARLANDER et al., 1999; TIZARD, 2002).

A IgM e IgA das aves são equivalentes às presentes nos mamíferos, quanto a estrutura, peso molecular e mobilidade eletroforética (CARLANDER et al., 1999).

A IgM é produzida durante a resposta imune primária, ocorrendo no plasma em níveis elevados, entre 5 e 12 dias após a exposição ao antígeno. Considerada imunoglobulina de fase aguda, a IgM é secretada em forma de pentâmero e expressa também na forma receptores de membrana plasmáticas dos linfócitos B (LESLIE; CLEM, 1969; 1970).

A IgA, semelhante ao que ocorre em mamíferos, é diretamente relacionada às secreções, sendo produzida geralmente após o 5º dia de exposição ao antígeno em locais específicos, como nas mucosas dos aparelhos digestivo, respiratório e reprodutor, além das glândulas de Harder (LESLIE; CLEM, 1969; LESLIE; MARTIN, 1973; WATANABE et al., 1975)

2.3 A IMUNOGLOBULINA IGY

A IgY é a principal imunoglobulina das aves, produzida na resposta imune secundária (WARR et al., 1995; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010)

Conforme Warr et al. (1995) as características estruturais da IgY são semelhantes à IgG dos mamíferos: massa molecular de aproximadamente 160 kDa, ponto isoelétrico variando entre 5,7 e 7,6, sendo constituída por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas.

A cadeia pesada (67-70 kDa) é formada por um domínio variável e quatro constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4). O domínio CH2 é, provavelmente, relacionado a região de dobradiça da molécula de IgG dos mamíferos (WARR et al., 1995). As regiões entre os domínios CH1/CH2 e CH2/CH3 são ricas em resíduos de prolina e lisina e parecem serem importantes para a inflexibilidade da IgY (HELM et al., 1991). Os domínios CH2 e CH3 estão envolvidos na transferência específica dos anticorpos da classe IgY da circulação materna para o oócito em desenvolvimento (MORRISON et al, 2001).

Cada cadeia leve apresenta massa molecular de aproximadamente 18 kDa e é formada pelos domínios variável (VL) e constante (CL)(WARR et al., 1995). Como ocorre na IgG dos mamíferos, a região Fc da IgY aviária é responsável por suas funções biológicas efetoras como a fixação do complemento e opsonização (NOLL et al., 1982; LARSSON; SJOQUIST, 1990; CARLANDER et al., 1999; SCHADE et al., 2005)

Além de estar presente no sangue das aves, a IgY pode ser encontrada na gema dos ovos em altas concentrações, enquanto a IgM e a IgA são principalmente encontradas na clara (MOHAMMED et al., 1998). Em aves, a transferência de IgY ocorre pela passagem de anticorpos para a gema do ovo em desenvolvimento (LOEKEN; ROTH, 1983), onde receptores para IgY presentes nos

folículos ovarianos captam estas moléculas da circulação sanguínea materna e transferem-na para a gema (MOHAMMED et al., 1998). A quantidade de IgY transferida independe do tamanho do ovo e está relacionada com sua concentração plasmática (LI et al., 1998).

A IgY presente na gema dos ovos de galinhas poedeiras pode ser extraída laboratorialmente, sem perder suas propriedades biológicas. Por isso, estes animais têm sido alvo de estudos, visando à produção de anticorpos para imunoterapia e imunodiagnóstico de doenças veterinárias e humanas (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010)

2.4 O USO DE IGY EM IMUNOTERAPIA

A utilização de anticorpos em procedimentos experimentais e clínicos é amplamente documentada na literatura científica. Os anticorpos são uma poderosa ferramenta para a pesquisa básica sendo utilizados na caracterização e purificação de moléculas e células (HAY et al, 2002). Os anticorpos também são o fundamento de um grande número de ensaios de diagnóstico, conhecidos como imunodiagnóstico, dentre os quais os mais difundidos são as reações de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), *Western blot* e a imunohistoquímica (ROSE, 2002). Os anticorpos têm uma ampla aplicação na área terapêutica, onde a transferência passiva de anticorpos tem sido utilizada, há muito tempo, no tratamento de doenças infecciosas (ZEITLIN et al., 2000). Mais recentemente, com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais e anticorpos humanizados, os anticorpos tem sido utilizados com maior segurança no tratamento de doenças humanas (CESANO; GAYKO, 2003). Os anticorpos disponíveis comercialmente são, em sua maioria, produzidos em mamíferos e purificados a partir do sangue destes animais, o que implica na adoção de procedimentos invasivos, muitas vezes causando o sacrifício do animal, quando se faz necessária a obtenção de grandes quantidades de anticorpos (HARLOW; LANE, 1988).

A obtenção de anticorpos específicos a partir da gema do ovo de galinha pode ser uma importante opção aos métodos tradicionais que utilizam mamíferos (ROLLIER et al., 2000; TINI et al, 2002).

Uma das principais vantagens da produção de anticorpos em ovos de galinha é que este método é pouco invasivo, isto é, não existe a necessidade de

se fazer a sangria do animal, com todos os riscos envolvidos neste procedimento, dispensando o sacrifício do animal imunizado para a obtenção de quantidades satisfatórias de anticorpos. Ao contrário disso, a galinha poedeira pode ser mantida viva por um período maior de tempo, o que facilita a obtenção de quantidades adicionais de anticorpos específicos, sem a necessidade de utilização de novos animais (DE MEULENAER et al., 2001; CHEN et al., 2002).

Outra vantagem é o alto rendimento de anticorpos específicos que pode ser obtido. A quantidade de anticorpo produzida nos ovos de galinha é maior que a quantidade de anticorpos produzidos em mamíferos (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010). Bollen et al. (1996) observaram que a imunização de galinha poedeiras e a extração de IgY da gema do ovo é de 5 a 10 vezes mais produtiva que a produção de anticorpos em coelhos. Tu et al. (2001) compararam a produção de anticorpos específicos para lactoferrina em coelhos e galinha poedeiras. A produção de anticorpos em coelhos foi mais rápida, porém os títulos obtidos declinaram rapidamente na quinta semana pós-imunização. Por outro lado, apesar da produção de anticorpos em galinhas poedeiras atingir os mesmos níveis 2 semanas mais tarde, estes permaneceram elevados até, pelo menos, a décima semana pós-imunização. Tais resultados mostram que a produção de anticorpos em galinhas poedeiras pode ser muito maior do que em coelhos. A alta produtividade deste processo é constatada, ao se considerar que uma galinha poedeira pode produzir em média um ovo por dia (DE MEULENAER et al., 2001) e que uma gema de ovo contenha entre 100 a 150 mg de IgY (MINE; KOVACS-NOLAN, 2002).

Além destas vantagens operacionais, devido à distância filogenética, as diferenças na porção Fc dos anticorpos de aves e mamíferos, fazem que os anticorpos de galinha não ativem o sistema complemento dos mamíferos, nem apresentem reações cruzadas com os fatores reumatoides. Assim, minimizam-se as falsas reações positivas quando são avaliados marcadores de inflamação (proteína C reativa), uma característica importante para o estudo dos processos inflamatórios (STAAK, 1996; SCHADE et al., 2005). A distância filogenética também implica numa maior imunogenicidade de antígenos de mamíferos quando inoculados em frangos (GASSMANN et al., 1990).

Além das vantagens acima descritas, os anticorpos presentes na gema dos ovos de galinhas poedeiras imunizadas podem ser extraídos e purificados por processos de baixo custo (ALMEIDA et al., 1998; BRUNDA et al., 2006). Assim,

a produção de grandes quantidades de IgY específicas com custos menores quando comparado à produção de IgG de mamíferos, torna viável economicamente o emprego de anticorpos IgY com fins profiláticos e terapêuticos (WARR et al., 1995; STAAK, 1996; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

O uso de IgY em imunoterapias é recente. Nos últimos anos, pesquisas vêm sendo desenvolvidas e demonstraram com sucesso a utilização de IgY como imunizante passivo contra patógenos intestinais humanos e animais, como imunoterapêutico para bactérias que são de difícil controle com antibióticos e como ferramenta para investigação oncológica. É crescente o número de pesquisas em humanos e veterinárias, voltadas à ingestão oral de IgY. Alguns trabalhos descrevem que administração oral de IgY é capaz de prevenir infecções com *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística, a formação de placas bacterianas por *Streptococcus mutans*, o desenvolvimento de úlcera gástricas por *Helicobacter pylori*, enterites por *Escherichia coli* em leitões e rotavírus humano (GUIMARÃES et al., 2008).

Além disso, recentemente tem merecido destaque na literatura científica a possibilidade de emprego de IgY no tratamento de envenenamentos causados por picadas de serpentes. O efeito protetor de IgY antiveneno de serpente em camundongos foi inicialmente descrito por Carroll et al. (1992), que inocularam veneno de serpentes do gênero *Crotalus* em galinhas poedeiras e, com sucesso, extraíram anticorpos IgY antiveneno da gema dos ovos destes animais.

A partir daí, trabalhos foram desenvolvidos para produção de IgY antiveneno, utilizando venenos de inúmeras espécies de serpentes como imunógenos em galinhas poedeiras: *Bothrops sp* e *Crotalus durissus terrificus* (ALMEIDA et al., 1998) *Echis carinatus* (PAUL et al., 2007), *Vipera* russelli, *Naja naja, Bungarus caeruleus* (MEENATCHISUNDARAM et al., 2008a; b), *Bitis nasicornis, Bitis rhinoceros, Naja melanoleuca, Naja mossambica* (ALMEIDA et al., 2008).

2.5 ACIDENTES OFÍDICOS

Um problema de saúde pública que afeta vários países tropicais são os acidentes ofídicos, responsáveis por alta incidência de morbidade e mortalidade (PINHO et al., 2004). Espécies de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*,

conhecidas respectivamente como jararacas e cascavéis, são as principais responsáveis pelos envenenamentos por picada de cobra na América do Sul, particularmente no Brasil (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; BOLDRINI-FRANCA et al., 2010).

As serpentes do gênero *Bothrops* compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. As espécies mais conhecidas são: *B. atrox*, *B. erythromelas, B. neuwiedi*, *B. jararaca, B. jararacussu* e *B. alternatus.* As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, a *C. durissus terrificus* (PINHO; PEREIRA, 2001)

De modo geral, os venenos de serpentes são misturas complexas de vinte ou mais componentes diferentes, sendo mais de 90% de seu peso seco constituído por enzimas, toxinas não enzimáticas, proteínas e proteínas não tóxicas. As fosfolipases são constituintes comuns tanto do veneno botrópico como do crotálico (WARRELL, 2010; WILLIAMS et al., 2010)

O veneno botrópico apresenta inúmeras proteases, tais como serina e metaloproteases, oxidase L-aminoácido, 5'-nucleotidase, hialuronidase e lectinas do tipo C, cujos efeitos estão relacionados à ação proteolítica local e atividade hemorrágica sistêmica (QUEIROZ et al., 2008)

O veneno crotálico possui como componente principal uma neurotoxina, denominada crotoxina, além de outros componentes, como a crotapotina, crotoxina, crotamina e girotoxina. Dentre as principais atividades biológicas do veneno, destacam-se sua ação miotóxica e neurotóxica, além dos efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010).

O tratamento específico desses envenenamentos é realizado com soro equino hiperimune contra venenos de serpentes do mesmo gênero da que causou o acidente. O alto custo da técnica, o sofrimento dos animais usados nas imunizações consecutivas e a redução do tempo de vida do animal devido à toxicidade do antígeno usado, são algumas das desvantagens deste procedimento. As doses recomendadas do antiveneno foram, inicialmente, baseadas na estimativa da quantidade de veneno que a serpente poderia inocular e na capacidade neutralizante do soro mensurada por soroneutralização *in vitro* e posterior inoculação em animais de experimentação (ALMEIDA et al., 1998; THEAKSTON et al., 2003).

Experimentos recentes com galinhas imunizadas com venenos ofídicos mostram que estes animais produzem níveis satisfatórios de anticorpos antiveneno de serpente, e que são transferidos e armazenados na gema de seus ovos. A extração e purificação e IgY a partir de gemas de galinhas imunizadas com veneno de cobra possibilita a produção de um antiveneno eficaz e promissor para tratamento de envenenamento de humanos e animais domésticos (ALMEIDA et al., 1998; ARAUJO et al., 2010).

2.6 REFERÊNCIAS

AITA, M. et al. Identification of cells secreting a thymostimulin-like substance and examination of some histoenzymatic pathways in aging avian primary lymphatic organs: I. thymus. **European journal of histochemistry : EJH,** v. 39, n. 4, p. 289-300, 1995.

ALMEIDA, C. M. C. et al. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. **Veterinary Record,** v. 143, n. 21, p. 579-584, Nov 21 1998.

ALMEIDA, C. M. et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon,** v. 52, n. 2, p. 293-301, Aug 1 2008.

ARAUJO, A. S. et al. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon,** v. 55, n. 4, p. 739-44, Apr 1 2010.

ARSTILA, T. P. et al. Central role of CD4+ T cells in avian immune response. **Poultry Science,** v. 73, n. 7, p. 1019-1026, 1994.

BABA, T. et al. Harderian gland dependency of immunoglobulin A production in the lacrimal fluid of chicken. **Immunology,** v. 65, n. 1, p. 67-71, Sep 1988.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica,** v. 19, n. 1, p. 7-16, Jan-Feb 2003.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Snake venomics and antivenomics of Crotalus durissus subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of proteomics,** v. 73, n. 9, p. 1758-76, Aug 5 2010.

BOLLEN, L. 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, n. 2, p. 113-20, May 27 1996.

BURNS, R. B. Plasma cells in the avian Harderian gland and the morphology of the gland in the rook. **Canadian journal of zoology,** v. 53, n. 9, p. 1258-69, Sep 1975.

CARLANDER, D. **Avian IgY antibody: in vitro and in vivo.** Upsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2002.

CARLANDER, D. et al. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Upsala journal of medical sciences,** v. 104, n. 3, p. 179-89, 1999.

CARROLL, S. B. et al. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. **Toxicon,** v. 30, n. 9, p. 1017-25, Sep 1992.

CESANO, A.; GAYKO, U. CD22 as a target of passive immunotherapy. **Seminars in oncology,** v. 30, n. 2, p. 253-7, Apr 2003.

CHEN, C. C. et al. Isolation and characterization of immunoglobulin in yolk (IgY) specific against hen egg white lysozyme by immunoaffinity chromatography. **Journal of agricultural and food chemistry,** v. 50, n. 19, p. 5424-8, Sep 11 2002.

CIRIACO, E. et al. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). **Microscopy research and technique,** v. 62, n. 6, p. 482-7, Dec 15 2003.

DE MEULENAER, B. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol a using chicken immunoglobulins**. Journal of agricultural and food chemistry,** v. 50, n. 19, p. 5273-82, Sep 11 2002.

DHAMA, K. et al. Immunity and Disease Resistance in Poultry: Current and Future Prospects. In: SASIDHAR, P. V. K. (Ed.) **Poultry Research Priorities to 2020**. Bareilly: Bytes & Bytes, 2006. p. 199-210.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary immunology and immunopathology,** v. 135, n. 3-4, p. 173-180, 2010.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science,** v. 83, n. 4, p. 580-90, Apr 2004.

FUJITA, T. et al. The migration of macrophages after phagocytosis in chick bone marrow. **Archivum histologicum Japonicum. Nippon soshikigaku kiroku,** v. 45, n. 5, p. 473-81, Dec 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, n. 8, p. 2528-32, May 1990.

GUIMARÃES, M. C. C. et al. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas on line,** v. 2, n. 7, p. 122-29, 2008.

HAY, F. C. et al. **Practical immunology.** Bodmin: Blackwell Science, 2002.

HELM, B. A. et al. The nature and importance of the inter-epsilon chain disulfide bonds in human IgE. **European journal of immunology,** v. 21, n. 6, p. 1543-8, Jun 1991.

HEMMINGSSON, E. J. Ontogenetic studies on lymphoid cell traffic in the chicken. II. Cell traffic from the bursa of Fabricius to the thymus and the spleen in the embryo. **International archives of allergy and applied immunology,** v. 42, n. 6, p. 764-74, 1972.

IVANYI, J. et al. Bursal origin of bone marrow cells with competence for antibody formation. **Immunology,** v. 23, n. 1, p. 107-11, Jul 1972.

JEURISSEN, S. H. Structure and function of the chicken spleen. **Research in immunology,** v. 142, n. 4, p. 352-5, May 1991.

_____. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response. **Immunology,** v. 80, n. 1, p. 29-33, Sep 1993.

JEURISSEN, S. H. et al. Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. **Immunology,** v. 77, n. 1, p. 75-80, Sep 1992.

JEURISSEN, S. H.; JANSE, E. M. Germinal centers develop at predilicted sites in the chicken spleen. **Advances in experimental medicine and biology,** v. 355, p. 237-41, 1994.

JOHN, J. L. The avian spleen: a neglected organ. **The Quarterly review of biology,** v. 69, n. 3, p. 327-51, Sep 1994.

KAJIWARA, E. et al. Development of Peyer's patch and cecal tonsil in gut-associated lymphoid tissues in the chicken embryo. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science,** v. 65, n. 5, p. 607-14, May 2003.

KATO, A. et al. Are there M cells in the cecal tonsil of chickens? **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science,** v. 54, n. 5, p. 999-1006, Oct 1992.

KENDALL, M. D. Avian thymus glands: a review. **Developmental and comparative immunology,** v. 4, n. 2, p. 191-209, Spring 1980.

KOZUKA, Y. et al. Comparative studies on the secondary lymphoid tissue areas in the chicken bursa of Fabricius and calf ileal Peyer's patch. **Veterinary immunology and immunopathology,** v. 133, n. 2-4, p. 190-7, Feb 15 2010.

LARSSON, A.; SJOQUIST, J. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases,** v. 13, n. 4, p. 199-201, 1990.

LAWRENCE, E. C. et al. Ontogeny of humoral immune function in normal chickens: a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone marrow, spleen, lungs and intestine. **Clinical and experimental immunology,** v. 43, n. 3, p. 450-7, Mar 1981.

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, Dec 1 1969.

_____. Chicken immunoglobulins: biological half-lives and normal adult serum concentrations of IgM and IgY. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine,** v. 134, n. 1, p. 195-8, May 1970.

LESLIE, G. A.; MARTIN, L. N. Studies on the secretory immunologic system of fowl. 3. Serum and secretory IgA of the chicken. **Journal of immunology,** v. 110, n. 1, p. 1-9, Jan 1973.

LI, X. et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. **Poultry Science,** v. 77, n. 2, p. 266-70, Feb 1998.

LOEKEN, L. N.; ROTH, T. F. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. **Immunology,** v. 49, n. 1, p. 21-28, 1983.

MEENATCHISUNDARAM, S. et al. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. **Toxicon,** v. 52, n. 2, p. 221-7, Aug 1 2008a.

_____. Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. **International Immunopharmacology,** v. 8, n. 8, p. 1067-1073, Aug 2008b.

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, Fall 2002.

MOHAMMED, S. M. et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology : an international journal of immunological engineering,** v. 4, n. 2, p. 115-25, Oct 1998.

MORGULIS, M. S. Imunologia Aplicada. In: MACARI, M; FURLAN, R.L; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte.** Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 231-245.

MORRISON, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular immunology,** v. 38, n. 8, p. 619-25, Jan 2002.

NOLL, F. et al. Structure of IgG and IgY molecules in ribosome-antibody complexes as studied by electron microscopy. **Immunology letters,** v. 4, n. 3, p. 117-23, Mar 1982.

OLÁH, I.; VERVELDE, L. Structure of the Avian Lymphoid System. In: FRED, D.;BERND, K., et al (Ed.). **Avian Immunology**. London: Academic Press, 2008. p.13-50.

PAUL, K. et al. Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: Isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon,** v. 50, n. 7, p. 893-900, Dec 1 2007.

PINHO, F. M. et al. Snakebites in the State of Goiás, Brazil. **Revista da Associação Medica Brasileira,** v. 50, n. 1, p. 93-6, Jan-Mar 2004.

PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Snake bites. **Revista da Associacao Medica Brasileira,** v. 47, n. 1, p. 24-9, Jan-Mar 2001.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon,** v. 52, n. 8, p. 842-51, Dec 15 2008.

ROLLIER, C. et al. Maternally transferred antibodies from DNA-immunized avians protect offspring against hepadnavirus infection. **Journal of virology,** v. 74, n. 10, p. 4908-11, May 2000.

ROSE, N. **Manual of Clinical Laboratory Immunology.** Washington: Routledge Publishers, 2002.

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, Apr 2005.

SCOTT, T. R. Our current understanding of humoral immunity of poultry. **Poultry science,** v. 83, n. 4, p. 574-9, Apr 2004.

SHIRAMA, K. et al. The avian Harderian gland: morphology and immunology. **Microscopy research and technique,** v. 34, n. 1, p. 16-27, May 1 1996.

SIATSKAS, C.; BOYD, R. Regulation of chicken haemopoiesis by cytokines. **Developmental and comparative immunology,** v. 24, n. 1, p. 37-59, Jan 2000.

SKWARLO-SONTA, K. Reciprocal interdependence between pineal gland and avian immune system. NEL Review. **Neuro endocrinology letters**, v. 20, n. 3-4, p. 151-156, 1999.

SORRELL, J. M.; WEISS, L. Cell-Interactions between Hematopoietic and Stromal Cells in the Embryonic Chick Bone-Marrow. **Anatomical Record,** v. 197, n. 1, p. 1-19, 1980.

STAAK, C. Egg Yolk Antibodies (IgY) in Routine Diagnostic Work. **ALTEX,** v. 13, n. 5, p. 73-75, 1996.

STURKIE, P. D.; BENZO, C. A. **Avian physiology**. Springer-Verlag, 1986.

THEAKSTON, R. D. et al. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon,** v. 41, n. 5, p. 541-57, Apr 2003.

TINI, M. et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology,** v. 131, n. 3, p. 569-74, Mar 2002.

TIZARD, I. A. N. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: ROCA, 2002.

TU, Y. et al. Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. **Food Research International,** v. 34, n. 9, p. 783-789, 2001.

VAUGHN, L. E. et al. Enhanced gross visualization of chicken Peyer's patch: novel staining technique applied to fresh tissue specimens. **Avian diseases,** v. 50, n. 2, p. 298-302, Jun 2006.

WARR, G. W. et al. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology today,** v. 16, n. 8, p. 392-8, Aug 1995.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet,** v. 375, n. 9708, p. 77-88, Jan 2 2010.

WATANABE, H. et al. Peculiar secretory IgA system identified in chickens. II. Identification and distribution of free secretory component and immunoglobulins of IgA, IgM, and IgG in chicken external secretions. **Journal of immunology,** v. 115, n. 4, p. 998-1001, Oct 1975.

WILLIAMS, D. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet,** v. 375, n. 9708, p. 89-91, Jan 2 2010.

ZEITLIN, L. et al. Preventing infectious disease with passive immunization. **Microbes and infection / Institut Pasteur,** v. 2, n. 6, p. 701-8, May 2000.

3 ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgY E AS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA DE GALINHAS POEDEIRAS WHITE LEGHORN (*Gallus gallus domesticus*) INOCULADAS COM VENENO DE SERPENTES DA ESPÉCIE *Crotalus durissus terrificus*

3.1 RESUMO

Acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Crotalus durissus terrificus* são geralmente tratados pela administração de antissoro de mamíferos. Uma alternativa a este procedimento é a utilização de IgY antiveneno produzido em galinhas poedeiras. O objetivo deste estudo foi investigar a participação do baço e da medula óssea na produção de anticorpos IgY. Galinhas poedeiras foram inoculadas com 125 µg de veneno crotálico nos dias 0, 15, 30, 45 e 90. Amostras de soro e gema dos ovos foram coletadas 7 dias após cada imunização e analisadas por ELISA para determinação do nível de IgY antiveneno. Ao final do experimento, o baço e a medula óssea foram coletados, processados e caracterizados histologicamente. Os níveis de anticorpos antiveneno no soro e na gema foram significativos após o 37º dia e alcançaram maior nível no 55º dia, assim permanecendo até a última imunização. Nos animais imunizados houve aumento significativo no número de células IgY+ na polpa branca perielipsoidal do baço e no espaço extravascular da medula, apresentando correlação positiva moderada e fraca, respectivamente, com os níveis de anticorpos séricos. A inoculação de veneno crotálico em galinhas poedeiras induz a produção de altos níveis de anticorpos IgY antiveneno, principalmente na polpa branca perielipsoidal do baço e também no espaço extravascular da medula óssea.

Palavras-chave: Ovos. Imunoglobulinas. ELISA. Histologia. Órgãos linfoides secundários.

3.2 INTRODUÇÃO

As imunoglobulinas da classe IgY constituem a principal classe de anticorpo produzido pelas aves e têm estrutura semelhante à IgG dos mamíferos (CARLANDER, 2002; SCHADE et al., 2005; BRUNDA et al., 2006). Receptores para IgY , presentes nos folículos ovarianos, captam estas moléculas da circulação sanguínea materna e transferem-nas para a gema dos ovos (MOHAMMED et al., 1998; MORRISON et al., 2002; KITAGUCHI et al., 2010). A concentração de IgY é mantida estável no soro devido ao equilíbrio resultante de sua síntese e transferência contínuas para a gema (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

Estudos mostram que a partir de sua extração e purificação da gema, os anticorpos IgY podem ser utilizados em imunodiagnóstico e imunoterapia (DEVI et al., 2002).

CARROLL et al. (1992) foram pioneiros em descrever a produção de anticorpos IgY antiveneno a partir da imunização de galinhas poedeiras com os venenos de serpentes do gênero *Crotalus*. No Brasil, a segunda causa mais importante de acidentes ofídicos é relacionada à espécie *Crotalus durissus terrificus*. O veneno destas serpentes provoca agravos clínicos e na maioria das vezes pode ser fatal, se o tratamento com antiveneno não for iniciado rapidamente (NOGUEIRA et al., 2007; FONTEQUE et al., 2009).

A administração parenteral de antivenenos é considerada o único tratamento cientificamente validado para envenenamentos causados por acidentes ofídicos (THEAKSTON et al., 2003; MEENATCHISUNDARAM et al., 2008a; PRABHU et al., 2010; DOS-SANTOS et al., 2011). A produção destes soros antiveneno, obtidos principalmente pela sensibilização de mamíferos, é uma técnica de custo elevado, que causa redução do tempo de vida e sofrimento nos animais utilizados nas imunizações, devido à toxicidade do antígeno (ALMEIDA et al., 1998; HILL et al., 2001; BRUNDA et al., 2006). Como alternativa a este procedimento, a produção de anticorpos em galinhas poedeiras tem sido avaliada ao longo dos últimos anos e representa um refinamento no processo de produção de anticorpos. Neste procedimento, a coleta de sangue é substituída pela coleta dos ovos, uma vez que os anticorpos podem ser extraídos da gema, o que por sua vez, implica na redução do número de animais utilizados, pois poucas galinhas são necessárias para a produção de grande quantidade de anticorpos (ALMEIDA et al., 1998, 2008; SCHADE et al., 2005).

Tanto em aves, quanto em mamíferos, a produção de anticorpos depende dos órgãos e tecidos envolvidos neste processo. O sistema imune das aves é constituído por células de defesa, tecidos e órgãos linfoides (STURKIE; BENZO, 1986; TIZARD, 2002) e apresenta diferenças na estrutura dos órgãos linfoides primários e secundários em relação aos mamíferos (JEURISSEN et al., 1992; JEURISSEN; JANSE, 1994). O timo e a bursa de Fabricius são órgãos linfoides primários, onde as células precursoras dos linfócitos se diferenciam em linfócitos T e B, respectivamente (STURKIE; BENZO, 1986; TIZARD, 2002). Os tecidos linfoides secundários ocorrem no baço, na medula óssea, na glândula de

Harder e em associação às mucosas do trato digestivo, respiratório e reprodutor (SCOTT, 2004).

O baço é o principal órgão envolvido na imunidade humoral, respondendo a antígenos presentes na circulação sanguínea e sua importância na resposta imune é acentuada devido à ausência de linfonodos em galinhas (JEURISSEN, 1991; JOHN, 1994; SCOTT, 2004). É constituído por regiões de polpa vermelha, onde há acúmulo de eritrócitos e regiões de polpa branca rica em tecido linfoide (YASUDA et al., 1998, 2003). A polpa branca é constituída pelas ramificações da artéria trabecular, formando as arteríolas centrais que são envolvidas por uma bainha de tecido linfoide, rica em linfócitos T, denominada bainha linfoide periarteriolar (PALS). As ramificações finais destas arteríolas são conhecidas como capilares penicilares ou elipsoidais (JEURISSEN, 1991; JEURISSEN; JANSE, 1994) e são envolvidas por agrupamentos de células fibroblásticas reticulares e células fagocíticas denominados elipsoides (NAGY et al., 2005). Ao redor destas estruturas há acúmulo de linfócitos B, formando a polpa branca perielipsoidal (PWP) (OLÁH; VERVELDE, 2008). Entre estas regiões, também podem ocorrer centros germinativos (GC), que são formações nodulares, constituídas basicamente por agregados de células B, envoltos por delgada lâmina de tecido conjuntivo (JEURISSEN, 1991; JEURISSEN; JANSE, 1994; YASUDA et al., 1998).

Além do baço, a medula óssea participa da resposta imune humoral, pois apresenta um grande número de células B maduras, secretoras de imunoglobulinas, além da atividade hematopoiética (IVANYI et al., 1972; LAWRENCE et al., 1981). O estroma medular é constituído por células endoteliais sinusoidais e células reticulares (SORRELL; WEISS, 1980). As células endoteliais sinusoidais dividem a medula em dois compartimentos distintos, relacionados à geração dos elementos figurados do sangue (FUJITA et al., 1982; SIATSKAS; BOYD, 2000): o compartimento intravascular, que ocupa o interior dos sinusoides, onde ocorrem a eritropoiese e a trombopoiese; e o compartimento extravascular, onde ocorrem a mielopoiese, a monopoiese e a linfopoiese. A camada de células endoteliais dos sinusoides é descontínua e permite intenso trânsito de células entre os dois compartimentos (FUJITA et al., 1982; OLÁH; VERVELDE, 2008). O compartimento intravascular é caracterizado pela presença de numerosos eritrócitos e trombócitos, em diversos estágios de formação e no compartimento extravascular

podem ser encontrados acúmulos de pequenos e médios linfócitos, além de plasmócitos e mastócitos (FUJITA et al., 1982).

O objetivo deste trabalho foi investigar a participação do baço e da medula óssea na produção de anticorpos por galinhas poedeiras inoculadas com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, pela análise de suas características histológicas.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Veneno

Foi utilizado veneno liofilizado de serpentes adultas da espécie *Crotalus durissus terrificus* fornecido pela empresa Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda. O veneno foi diluído a 5mg/ml em tampão fosfato-salina (PBS) e conservado a -20°C.

3.3.2 Animais

Foram utilizadas 15 galinhas poedeiras white leghorn (*Gallus gallus domesticus*), com 20 semanas de vida, provenientes de granjas da região de Londrina-PR. Os animais foram mantidos na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina em gaiolas individualizadas, à temperatura ambiente, recebendo água potável e ração de postura à vontade. Os animais foram mantidos sob estritas condições éticas de acordo com as recomendações sobre bem-estar animal, segundo projeto aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

3.3.3 Imunização das Galinhas

As galinhas foram divididas em 3 grupos (n=5) e imunizadas por via intramuscular, em quatro pontos no músculo peitoral. No Grupo 1 (G1), cada animal foi inoculado com 800 µl de tampão fostato salina (PBS); no Grupo 2 (G2), cada animal foi inoculado com 800 µl de emulsão de PBS e Adjuvante Completo de

Freund (ACF) (Sigma, St. Louis, EUA); o Grupo 3 (G3) foi imunizado com 800 µl de emulsão de ACF e 125 µg de veneno crotálico diluído em PBS.

Nos dias 15, 30, 45 e 90 a partir da primeira imunização, foram inoculadas doses de reforço, nas quais o ACF foi substituído por Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma, St. Louis, EUA).

O sangue e os ovos foram coletados no dia anterior à primeira inoculação e nos dias 22, 37, 52, 97 a partir da primeira imunização.

3.3.4 Determinação dos Níveis de Anticorpos IgY Anticrotálico

Os níveis de anticorpos IgY anticrotálico presentes no soro e na gema dos ovos das galinhas imunizadas foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto.

Foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano (Corning Costar Corporation, Acton, MA, EUA). Para sensibilização das placas, em cada poço foram adicionados 100 µl de tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6, contendo 250 ng de veneno crotálico. As placas foram incubadas *overnight*, a 4 °C. Após a incubação, foram realizadas três lavagens utilizando 150 µl/poço de PBS *tween* 20 a 0,05% pH 7,4 (PBST).

Foram adicionados 150 µl de solução de PBS-leite desnatado 5% em cada poço, a placa foi incubada por 1h, a 25°C e lavada três vezes com PBST, conforme descrito anteriormente.

A seguir, em cada poço foram adicionados 100 µl de amostras de soro ou gema, diluídos a 1:8000 em PBS-leite desnatado 1%. A placa foi incubada por 1 h, a 25 °C e lavada três vezes com PBST. Controles positivos, utilizando solução de IgY purificada, e controles negativos (PBS, pH 7,4) foram realizados em paralelo.

Foram adicionados 100 µl/poço de imunoglobulina de coelho anti-IgY conjugada com peroxidase (Sigma, St. Louis, USA) diluídos 1:40000 em PBS-leite desnatado 1%. Após a incubação por 1 h a 25 °C, a placa foi então lavada três vezes com PBST e em cada poço foram adicionados 100 µl de substrato preparado a partir da mistura de 10 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, 100 µl de peróxido de hidrogênio (F.Maia, Cotia, SP, Brasil), 100 µl de solução de

tetrametilbenzidina (Sigma, St. Louis, EUA). Foi realizada a incubação por 15 min à temperatura ambiente, em ausência de luz e interrompeu-se a reação com a adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 1N (Nuclear, Diadema, SP, Brasil). A leitura da absorbância/poço foi realizada em espectrofotômetro para microplacas (Thermo Plate, TP-Reader, Rayto Life and Analytical Sciences Co. Ltd, Shenzhen, Japão), com filtro de 450 nm.

3.3.5 Caracterização Histológica

Ao final do período de inoculação (97 dias) os animais foram eutanasiados por inalação de dose letal de éter dietílico. O baço de cada animal foi retirado, fixado em solução de Boiun aquoso (71,4% solução aquosa saturada de ácido pícrico, 23,8% formol p.a., 4,8% ácido acético) por 24 h, incluído em paraplast e processado conforme técnica histológica de rotina. O fêmur destes animais foi retirado, dividido na região medial da diáfise e as duas partes fixadas em solução de Bouin aquoso por 24 h. Os ossos foram lavados em álcool 70% e colocados em solução aquosa descalcificadora de ácido etilenodiamino tetra-acético (Synth, Diadema, SP, Brasil) 7% pH 7,2, submetida à corrente elétrica de 75 mV por 30 dias. Após esse período, o osso descalcificado foi retirado, a medula óssea presente no canal medular foi cortada em fragmentos com espessura de 0,5 cm, incluída em paraplast.

A caracterização histológica do baço e da medula óssea foi realizada por análises morfológica, imunohistoquímica e morfométrica. As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em sistema de captura de imagens Moticam (Motic, Xiamen, China) acoplado ao microscópio de luz e analisado no *software* Motic Image Plus 2.0 (Motic, Xiamen, China).

A análise morfológica foi realizada para identificação e descrição dos elementos constituintes dos órgãos, através da observação de cortes histológicos com 7 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE).

Na análise morfométrica foram utilizadas as mesmas lâminas histológicas coradas com HE. Para análise do baço, foram capturados aleatoriamente 8 campos por animal, totalizando 40 campos/grupo, em aumento de 200x. Em cada campo foram demarcadas e mensuradas as áreas de polpa

vermelha e de cada constituinte da polpa branca (PALS, GC, PWP), para determinação do percentual de cada elemento em relação à área total de cada campo observado. Para análise da medula óssea, foi determinada a área total da medula de cada animal em corte transversal na região medial do canal medular e as áreas de acúmulos de tecido linfoide, localizadas no compartimento extravascular, foram mensuradas para determinação do percentual ocupado por este na constituição do órgão, em aumento de 100x, segundo HAILEMARIAM et al. (2008).

A análise imunohistoquímica foi realizada para detecção das células produtoras de IgY, através de detecção indireta conforme descrito por HARLOW e LANE (1999), com modificações. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura nos baços processados como descrito anteriormente. Estes cortes foram hidratados e incubados com soro de rato contendo imunoglobulina de rato anti-IgY, diluído 1:1000 em PBS-leite desnatado 1%, por 2 h, a temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram incubados com imunoglobulina de coelho anti-IgG de rato conjugada com peroxidase (ZYMED, San Francisco, CA, EUA) diluída 1:5000 em PBS-leite desnatado 1%, durante 2h. Foi utilizada solução aquosa de tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, EUA) como substrato. Para quantificação das células IgY positivas (IgY+) presentes no baço dos animais imunizados, foram analisados 8 campos por animal, totalizando 40 campos por grupo, em aumento de 400x. Na medula óssea foram realizados os mesmos procedimentos imunohistoquímicos e foram quantificadas todas as células IgY+ presentes nos cortes analisados.

3.3.6 Análise Estatística

A distribuição de normalidade foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os resultados obtidos nas análises realizadas por ELISA foram comparados por ANOVA de medidas repetidas para o mesmo grupo, em tempos diferentes e entre grupos foi utilizada análise com ANOVA *one way*, ambos com teste *post-hoc* de Tukey ($P<0,05$).

Os resultados obtidos nas análises morfométricas e na quantificação de células IgY+ foram comparados por ANOVA *one way*, com *post-hoc* de Tukey ($P<0,05$).

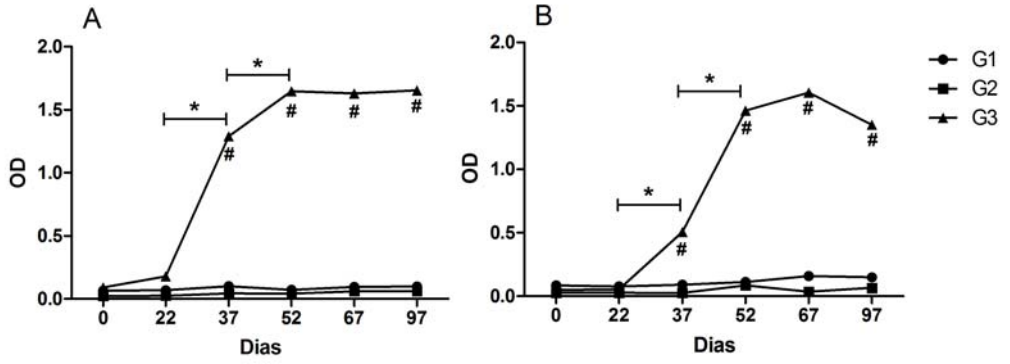
Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para análise da correlação entre os níveis de anticorpos séricos, os dados procedentes da morfometria e o número de células IgY+ presentes nos órgãos.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Níveis de Anticorpos IgY Anticrotálico

Foram analisadas amostras de soro e gema extraídos ao longo do experimento para avaliar a cinética de produção dos anticorpos IgY anticrotálico (Fig. 1). No soro e nas gemas dos ovos das galinhas dos grupos 1 e 2, inoculadas, respectivamente, com PBS e emulsão de PBS e adjuvante, não foram detectados níveis significativos de anticorpos IgY anticrotálico. As galinhas inoculadas com veneno (G3) apresentaram altos níveis de anticorpos IgY anticrotálico tanto no soro quanto na gema após a 3ª imunização. Estes anticorpos foram detectados no 37° dia e atingiram nível máximo no 52° dia a partir da primeira imunização, assim permanecendo até o final do experimento.

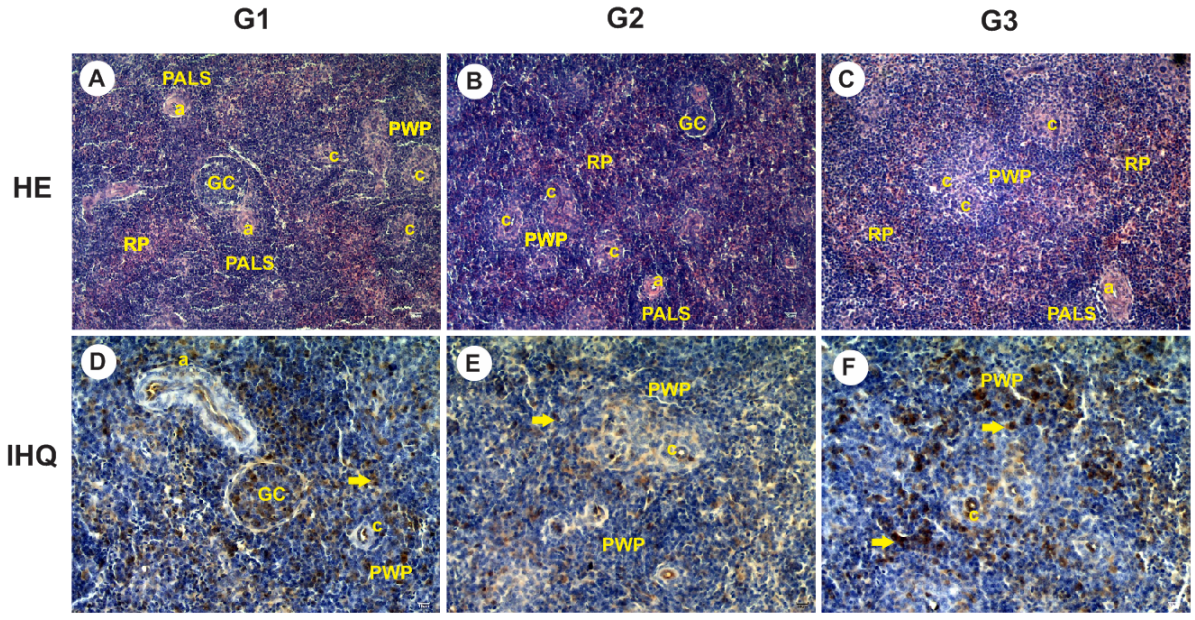
Figura 1 - Níveis de imunoglobulinas IgY anticrotálico presentes no soro (A) e na gema (B) de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3) durante o período de 97 dias, expressos em OD (densidade óptica a 450 nm). * diferença significativa nos níveis de anticorpos em relação à inoculação anterior, ANOVA medidas repetidas, teste de Tukey (P<0,05); # diferença significativa nos níveis de anticorpos em relação aos grupos G1 e G2; ANOVA *one way,* teste de Tukey (P<0,05).



3.4.2 Caracterização Histológica do Baço

O baço dos animais de todos os grupos apresentou características morfológicas semelhantes. Foram observadas regiões distintas, irregularmente distribuídas, de polpa branca e polpa vermelha (Fig. 2A, 2B e 2C). A delimitação da polpa vermelha foi possível devido ao acúmulo de eritrócitos, que atribuiu acentuada acidofilia à região. Na polpa branca, basófila, foram evidenciados GC; arteríolas centrais, envoltas por PALS; capilares elipsoidais cujo endotélio era constituído por células cuboides, circundadas por células de citoplasma fracamente corado (formando o elipsoide), que por sua vez eram envoltas pela PWP.

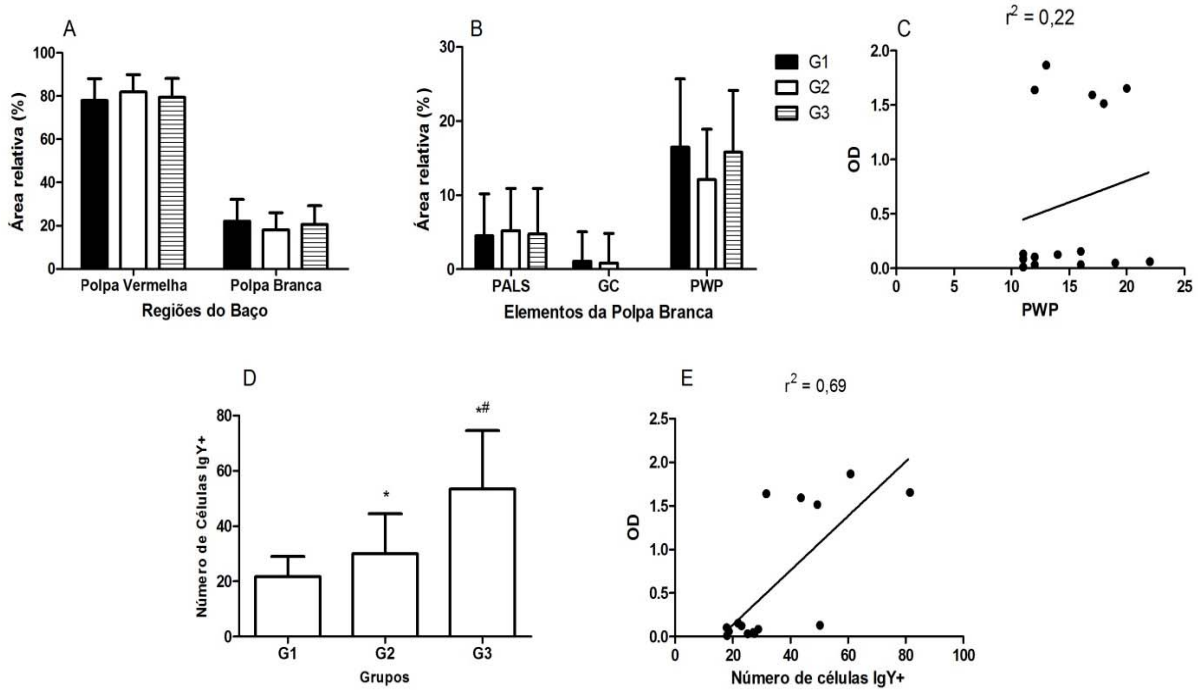
Figura 2 - Fotomicroscopia do baço de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3). **A, B, C**: Cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3, respectivamente, corados com hematoxilina e eosina (HE). **D, E, F:** Cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3, respectivamente, submetidos à técnica de imunohistoquímica (IHQ) para detecção de células IgY+. RP: polpa vermelha; GC: centro germinativo; a: arteríola; PALS: bainha linfóide periarteriolar; c: capilar elipsodal; PWP: polpa branca perielipsoidal; seta: célula IgY+.



Não houve diferença significativa entre as áreas dos elementos constituintes do baço dos animais dos 3 grupos. Cada campo analisado, em aumento de 200x apresentou área de 0,4 mm^2, dos quais 80% em média eram ocupados pela polpa vermelha e 20%, em média, pela polpa branca (Fig. 3A).

Dentre os constituintes da polpa branca, não houve diferenças entre as áreas de PALS, que ocuparam em média 5% da área em todos os grupos e os GC representaram em média menos de 1% da área observada. O principal constituinte da polpa branca dos 3 grupos foi a PWP, que representou em média 15% (Fig. 3B). Foi observada fraca correlação entre os níveis de anticorpos presentes no soro e as áreas relativas de PWP do baço destes animais (r^2= 0,22) (Fig. 3C).

Figura 3 - Análise dos elementos histológicos constituintes do baço de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3).



A: Comparação entre grupos das médias ± desvio padrão das áreas relativas ocupadas pela polpa vermelha e pela polpa branca, *P*>0,05, teste ANOVA. **B:** Comparação entre grupos das médias ± desvio padrão das áreas relativas dos elementos constituintes da polpa branca: PALS, GC e PWP, *P*>0,05, teste ANOVA. **C:** Correlação entre a área relativa média de PWP e os níveis séricos de anticorpos IgY anticrotálico, expressos em OD (densidade óptica a 450 nm), coeficiente de correlação de Spearman. **D:** Número médio ± desvio padrão de células IgY+ presentes na área ocupada pela PWP, em campos de 0,09 mm^2; * diferença em relação ao grupo G1; # diferença em relação ao grupo G2, teste de Tukey (*P*<0,05). **E:** Correlação entre o número de células IgY+ e os níveis séricos de anticorpos IgY anticrotálico, expressos em OD (densidade óptica a 450 nm), r^2: coeficiente de correlação de Spearman.

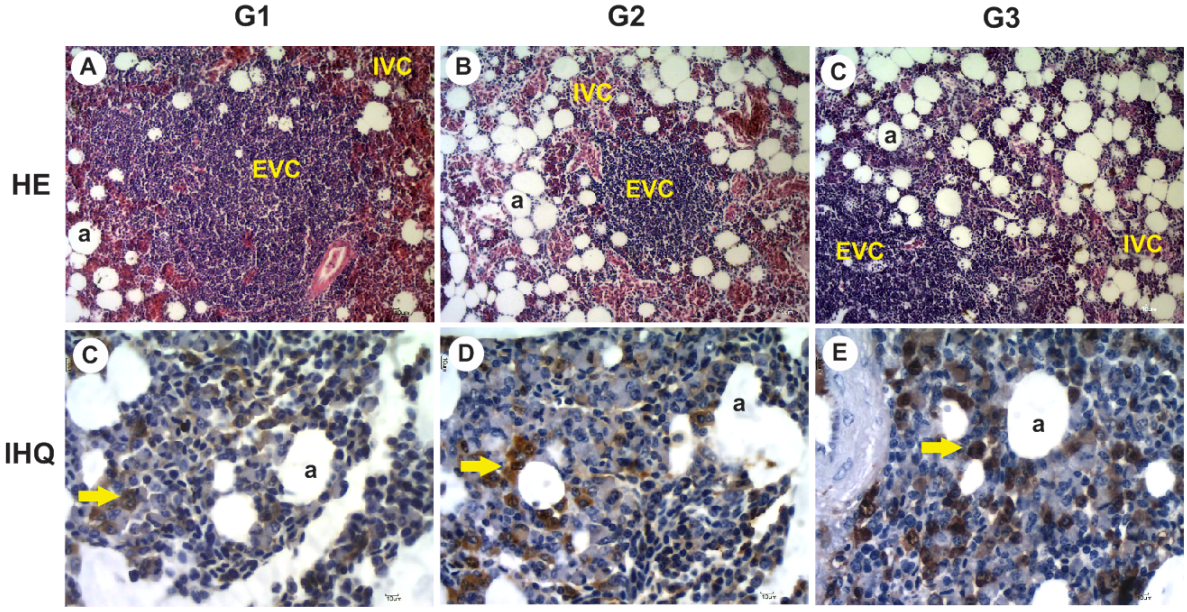
No baço, as células produtoras de anticorpos (IgY+) foram encontradas distribuídas irregularmente em toda a polpa branca, com predomínio das regiões de PWP, onde apresentaram intensa marcação positiva (Fig. 2D, 2E e 2F). A quantificação das células IgY+ realizada nas regiões de PWP demonstrou que os animais do G1 possuíam o menor número de células IgY+ por campo

analisado (média de 21,70 ± 7,37 células/campo), em relação a G2 (29,95 ± 14,57) e G3 (53,40 ± 21,26) (Fig. 3D). Além disso, o grupo G3 apresentou número significativamente maior de células IgY+ em relação a G2. Foi verificado que há correlação moderada entre os níveis de anticorpos presentes no soro e o número de células IgY+ encontradas no baço destes animais (r^2 = 0,69)(Fig. 3E).

3.4.3 Caracterização Histológica da Medula Óssea

A medula óssea dos animais dos 3 grupos apresentou características morfológicas semelhantes (Fig. 4A, 4B e 4C). O compartimento intravascular apresentou acidofilia característica, em função do acúmulo de células da linhagem eritrocítica nesta região, no interior dos sinusoides medulares. O compartimento extravascular apresentou acentuada basofilia, sendo constituído por acúmulos de células densamente agrupadas e poucos eritrócitos. Em ambos os compartimentos foram observados adipócitos.

Figura 4 - Fotomicroscopia da medula óssea de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3).



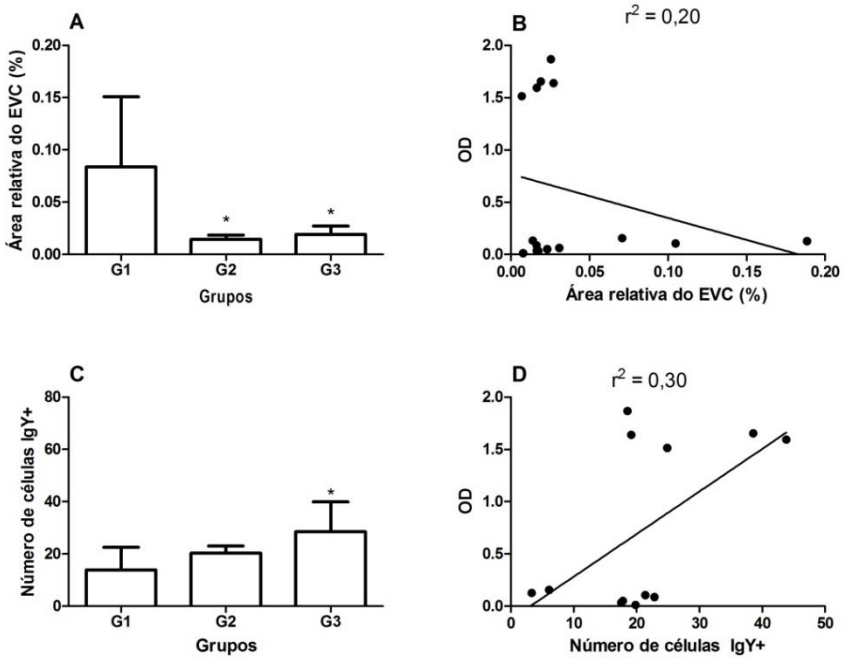
A, B, C: cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3, respectivamente, corados com hematoxilina e eosina (HE). **D, E, F:** Cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3, respectivamente, submetidos à técnica de imunohistoquímica (IHQ). IVC: compartimento intravascular; EVC: compartimento extravascular; a: adipócito; seta: célula IgY+.

As áreas relativas ocupadas por tecido linfoide nos compartimentos extravasculares foram estimadas na medula óssea dos animais de cada grupo. O

percentual médio destes compartimentos foi de aproximadamente 0,08 % no G1 e menor que 0,03% nos grupos G2 e G3 (Fig. 5A). Houve fraca correlação negativa (r^2 = 0, 20) entre os níveis de anticorpos IgY anticrotálico presentes no soro e as áreas relativas dos compartimentos extravasculares da medula óssea destes animais (Fig. 5B).

As células produtoras de anticorpos (IgY+) foram encontradas no compartimento extravascular, irregularmente distribuídas e exibindo intensa marcação positiva (Fig. 4C, 4D e 4E). O G3 apresentou maior número de células IgY+ em relação aos demais grupos (Fig. 5C) e foi observada fraca correlação (r^2 = 0,30) entre os níveis de anticorpos séricos e o número de células IgY+ dos compartimentos extravasculares da medula óssea (Fig. 5D).

Figura 5 - Análise dos elementos histológicos constituintes da medula óssea de galinhas poedeiras inoculadas com PBS (G1), PBS+Adjuvante (G2) e 125 µg de veneno crotálico (G3).



A: Comparação entre as áreas relativas dos compartimentos extravasculares (EVC) da medula óssea de galinhas poedeiras dos grupos G1, G2 e G3, * diferença em relação ao grupo G1, teste de Tukey (*P*<0,05). **B:** Correlação entre a área relativa do EVC e os níveis séricos de anticorpos IgY anticrotálico, expressos em OD (densidade óptica a 450 nm), correlação de Spearman. **C:** Número médio de células IgY+ presentes no compartimento extravascular da medula óssea de galinhas poedeiras dos grupos G1, G2 e G3 em campos de 0,09 mm^2, * diferença em relação ao grupo G1, teste de Tukey (*P*<0,05). **D:** Correlação entre o número de células IgY+ e os níveis séricos de anticorpos IgY anticrotálico, expressos em OD (densidade óptica a 450 nm), r^2: coeficiente de correlação de Spearman.

3.5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, vários trabalhos descreveram a produção de anticorpos antiveneno em galinhas poedeiras imunizadas com venenos de serpentes. Nestes estudos, níveis elevados de IgY foram produzidos em resposta à inoculação de pequenas doses de veneno de cada espécie de serpente (JEURISSEN; JANSE, 1994; PAUL et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; MEENATCHISUNDARAM et al., 2008a; b; ARAUJO et al., 2010; PRABHU et al., 2010). Em relação aos efeitos da inoculação do veneno de *Crotalus durissus terrificus,* o único trabalho que descreveu a produção de IgY anticrotálico em galinhas poedeiras imunizadas com venenos desta espécie de serpente foi publicado por Almeida *et al.* (1998). Considerando a cinética de produção de IgY anticrotálico, nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Almeida et al. (1998) que descreveram níveis elevados de anticorpos IgY anticrotálico entre o 35º e o 45º dia após a primeira imunização, assim permanecendo até o final do experimento. Como o veneno crotálico não é considerado um bom imunógeno quando inoculado em mamíferos (SCHAEFFER et al., 1988), podendo apresentar ação imunossupressora (RANGEL-SANTOS; MOTA, 2000), nossos achados sugerem a possibilidade de produção de anticorpos IgY anticrotálico a partir da imunização de galinhas poedeiras, onde foi observada sua elevada imunogenicidade.

Ainda não são conhecidos os principais órgãos envolvidos no processo de produção de IgY em resposta à inoculação de veneno de serpentes. Em nosso experimento foram utilizados três critérios para investigar a participação do baço e da medula óssea na produção de anticorpos IgY antiveneno: a análise morfológica, a análise morfométrica e a análise imunohistoquímica para detecção das células IgY+.

Os baços dos animais de todos os grupos apresentaram estruturas histológicas típicas, semelhantes ao descrito por outros autores (OLÁH; GLICK, 1982; JEURISSEN et al., 1992; JEURISSEN; JANSE, 1994; JOHN, 1994; YASUDA et al., 1998), onde foi possível distinguir regiões de polpa vermelha e polpa branca, com seus principais elementos constituintes. Como a resposta imune humoral no baço das aves está diretamente relacionada à participação dos linfócitos B

(SUGIMURA; HASHIMOTO, 1980; JEURISSEN; JANSE, 1994), foram analisadas as regiões de polpa branca onde estas células ocorrem: os GC e a PWP.

Em aves, os GC se formam no baço após estimulação antigênica (YASUDA et al., 1998, 2003) e desempenham função semelhante à observada em mamíferos, participando do desenvolvimento da resposta imune humoral e constituindo um dos principais locais de multiplicação de linfócitos B para produção de anticorpos (YASUDA et al., 1998; IMAMURA et al., 2009). Os GC são constituídos principalmente por células B maduras, também denominadas células B foliculares. Estas células são recirculantes e também podem ser encontradas em outros órgãos linfoides secundários, como a medula óssea, participando ativamente da produção de anticorpos (PILLAI; CARIAPPA, 2009). Neste estudo, esperava-se que o baço dos animais que produziram altos níveis de anticorpos IgY também apresentasse extensas áreas ocupadas por GC, o que não ocorreu. Além disso, foi investigada a relação entre a produção de anticorpos IgY e a área de PWP e as análises apontaram para uma fraca correlação entre estas duas variáveis.

Em mamíferos, as células B podem ser induzidas a crescer também em regiões extrafoliculares (MACLENNAN et al., 2003; PAUS et al., 2006), gerando plasmócitos de curta duração, que produzem anticorpos de baixa afinidade (VINUESA et al., 2005). No entanto, são escassas as informações sobre a participação de células B extrafoliculares na resposta imune humoral em aves. Sabe-se que estas células localizam-se principalmente nas regiões de PWP, que são consideradas funcionalmente homólogas à zona marginal do baço dos mamíferos (JEURISSEN, 1991; 1993; OLÁH; VERVELDE, 2008). Os resultados do presente trabalho sugerem que a produção de anticorpos em galinhas poedeiras é atribuída às células B extrafoliculares, presentes na PWP. Conforme os parâmetros analisados, verificou-se que os níveis mais elevados de IgY não estão relacionados à área relativa ocupada pela PWP no baço, mas sim ao número de células produtoras de anticorpos, concentradas nesta região da polpa branca. Assim, a quantidade elevada de células IgY+ presentes na PWP dos animais que produziram altos níveis de anticorpos sugere que esta região da polpa branca do baço participa efetivamente da resposta imune humoral em galinhas poedeiras inoculadas com veneno crotálico por via intramuscular.

Quanto à morfologia da medula óssea foram identificados seus principais componentes, o compartimento intravascular e o compartimento

extravascular, apresentando características semelhantes ao descrito por outros autores (IVANYI et al., 1972; SORRELL e WEISS, 1980; FUJITA et al., 1982; SIATSKAS; BOYD, 2000; NAGY et al., 2005; OLÁH; VERVELDE, 2008). Não são encontrados trabalhos na literatura que descrevam a participação da medula óssea das aves na produção de anticorpos em animais imunizados. Lawrence *et al.* (1981), publicaram o único trabalho que relaciona a medula óssea das aves à resposta imune humoral, utilizando cultura de células, sem, no entanto utilizar estimulação antigênica prévia. Estes autores atribuíram um papel relevante às células encontradas na medula óssea em relação à produção de imunoglobulinas. Em nosso experimento procuramos verificar, pela análise histológica, a participação da medula óssea na produção de anticorpos, após imunizações sucessivas com veneno crotálico. De maneira semelhante ao que foi observado na PWP do baço, foi observado um aumento das células IgY+ intensamente marcadas no compartimento extravascular da medula óssea dos animais imunizados. Entretanto, a análise da área dos compartimentos extravasculares da medula óssea e do número de células produtoras de anticorpos encontradas nestes locais apresentou fraca correlação com os níveis de anticorpos produzidos. Estes dados sugerem uma participação menor da medula óssea do fêmur na resposta imune em galinhas poedeiras inoculadas com veneno crotálico no músculo peitoral.

Conclui-se que o veneno crotálico é um bom imunógeno para galinhas poedeiras, que produzem altos níveis de anticorpos em resposta a imunizações sucessivas. Este veneno não induz a formação de centros germinativos, mas estimula o aumento no número de células B extrafoliculares, produtoras de anticorpos IgY nas regiões de PWP do baço. Além disso, com base nas características analisadas, fica evidente o aumento do número de células B nos compartimentos extravasculares, indicando a participação secundária da medula óssea do fêmur na produção de anticorpos em resposta à inoculação do veneno. Estas informações contribuem para a compreensão dos elementos celulares e teciduais responsáveis pela resposta imune humoral em aves imunizadas com veneno de serpentes, evidenciando a participação do baço e da medula neste processo, com vistas a aprimorar a produção de anticorpos antiveneno em galinhas poedeiras, como alternativa ao uso de mamíferos para este fim.

3.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. M. C. et al. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. **Veterinary Record,** v. 143, n. 21, p. 579-584, Nov 21 1998.

_____. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 52, n. 2, p. 293-301, Aug 1 2008.

ARAUJO, A. S. et al. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 55, n. 4, p. 739-44, Apr 1 2010.

BRUNDA, G. et al. Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (Naja naja naja) venom in biological samples of forensic origin. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 48, n. 2, p. 183-194, Aug 2006.

CARLANDER, D. **Avian IgY antibody: in vitro and in vivo**. Acta Universitatis Upsaliensis, 2002.

CARROLL, S. B. et al. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 30, n. 9, p. 1017-25, Sep 1992.

ALMEIDA, C. M. et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 52, n. 2, p. 293-301, Aug 1 2008.

DEVI, C. M. et al. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. **Journal of biochemical and biophysical methods,** v. 51, n. 2, p. 129-38, Apr 18 2002.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary immunology and immunopathology,** v. 135, n. 3-4, p. 173-80, Jun 15 2010.

DOS-SANTOS, M. C. et al. Comparison of the effect of Crotalus simus and Crotalus durissus ruruima venoms on the equine antibody response towards Bothrops asper venom: implications for the production of polyspecific snake antivenoms. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 57, n. 2, p. 237-43, Feb 2011.

FONTEQUE, J. H. et al. Perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes Crotalus durissus terrificus (cascavel) criadas em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 29, p. 457-460, 2009.

FUJITA, T. et al. The migration of macrophages after phagocytosis in chick bone marrow. **Archivum histologicum Japonicum. Nippon soshikigaku kiroku,** v. 45, n. 5, p. 473-81, Dec 1982.

HAILEMARIAM, Z. et al. Detection and characterization of chicken anemia virus from commercial broiler breeder chickens. **Virology journal,** v. 5, p. 128, 2008.

HARLOW, E.; LANE, D. **Using antibodies: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

HILL, R. E. et al. Time to reconstitution: purified Fab antivenom vs. unpurified IgG antivenom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 39, n. 5, p. 729-31, May 2001.

IMAMURA, K. et al. Characteristic cellular composition of germinal centers. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases,** v. 32, n. 5, p. 419-28, Sep 2009.

IVANYI, J. et al. Bursal origin of bone marrow cells with competence for antibody formation. **Immunology,** v. 23, n. 1, p. 107-11, Jul 1972.

JEURISSEN, S. H. Structure and function of the chicken spleen. **Research in immunology,** v. 142, n. 4, p. 352-5, May 1991.

_____. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response. **Immunology,** v. 80, n. 1, p. 29-33, Sep 1993.

JEURISSEN, S. H. et al. M. Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. **Immunology,** v. 77, n. 1, p. 75-80, Sep 1992.

JEURISSEN, S. H.; JANSE, E. M. Germinal centers develop at predilicted sites in the chicken spleen. **Advances in experimental medicine and biology,** v. 355, p. 237-41, 1994.

JOHN, J. L. The avian spleen: a neglected organ. **The Quarterly review of biology,** v. 69, n. 3, p. 327-51, Sep 1994.

KITAGUCHI, K. et al. Microscopic detection of IgY-Fc binding signal in the inner layers of ovarian follicular tissue in quail. **Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho,** v. 81, n. 5, p. 580-5, Oct 2010.

LAWRENCE, E. C. et al. Ontogeny of humoral immune function in normal chickens: a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone marrow, spleen, lungs and intestine. **Clinical and experimental immunology,** v. 43, n. 3, p. 450-7, Mar 1981.

MACLENNAN, I. C. M. et al. Extrafollicular antibody responses. **Immunological Reviews,** v. 194, n. 1, p. 8-18, 2003.

MEENATCHISUNDARAM, S. et al. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 52, n. 2, p. 221-7, Aug 1 2008a.

_____. Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. **International Immunopharmacology,** v. 8, n. 8, p. 1067-1073, Aug 2008b.

MOHAMMED, S. M. et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology,** v. 4, n. 2, p. 115-125, Oct 1998.

MORRISON, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular immunology,** v. 38, n. 8, p. 619-625, 2002.

NAGY, N. et al. Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists,** v. 232, n. 1, p. 55-66, Jan 2005.

NOGUEIRA, R. M. B. et al. Experimental envenomation with Crotalus durissus terrificus venom in dogs treated with antiophidic serum - part I: clinical evaluation, hematology and myelogram. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases,** v. 13, p. 800-810, 2007.

OLÁH, I.; GLICK, B. Splenic white pulp and associated vascular channels in chicken spleen. **The American journal of anatomy,** v. 165, n. 4, p. 445-80, Dec 1982.

OLÁH, I.; VERVELDE, L. Structure of the Avian Lymphoid System. In: FRED, D.;BERND, K., et al (Ed.). **Avian Immunology**. London: Academic Press, 2008. p.13-50.

PAUL, K. et al. Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: Isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 50, n. 7, p. 893-900, Dec 1 2007.

PAUS, D. et al. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. **The Journal of experimental medicine,** v. 203, n. 4, p. 1081-91, Apr 17 2006.

PILLAI, S.; CARIAPPA, A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. **Nature reviews. Immunology,** v. 9, n. 11, p. 767-77, Nov 2009.

PRABHU, R. R. et al. Extraction and characterization of polyclonal egg yolk antibodies (IgY) in chicken against cobra (Naja naja) venom. **Current Science,** v. 98, n. 2, p. 237-239, Jan 25 2010.

RANGEL-SANTOS, A. C.; MOTA, I. Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of Crotalus durissus terrificus venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 38, n. 10, p. 1451-7, Oct 2000.

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, Apr 2005.

SCHAEFFER, R. C., JR. et al. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) of size-selected crotalid venom antigens by Wyeth's polyvalent antivenom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 26, n. 1, p. 67-76, 1988.

SHARMA, J. M. Overview of the avian immune system. **Veterinary immunology and immunopathology,** v. 30, n. 1, p. 13-7, Nov 1991.

SCOTT, T. R. Our current understanding of humoral immunity of poultry. **Poultry science,** v. 83, n. 4, p. 574-9, Apr 2004.

SIATSKAS, C.; BOYD, R. Regulation of chicken haemopoiesis by cytokines. **Developmental and comparative immunology,** v. 24, n. 1, p. 37-59, Jan 2000.

SORRELL, J. M.; WEISS, L. Cell-Interactions between Hematopoietic and Stromal Cells in the Embryonic Chick Bone-Marrow. **Anatomical Record,** v. 197, n. 1, p. 1-19, 1980.

STURKIE, P. D.; BENZO, C. A. **Avian physiology**. Springer-Verlag, 1986.

SUGIMURA, M.; HASHIMOTO, Y. Quantitative histological studies on the spleen of ducks after neonatal thymectomy and bursectomy. **Journal of anatomy,** v. 131, n. Pt 3, p. 441-52, Oct 1980.

THEAKSTON, R. D. et al. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology,** v. 41, n. 5, p. 541-57, Apr 2003.

TIZARD, I. A. N. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. ROCA, 2002.

VINUESA, C. G. et al. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. **Nature reviews. Immunology,** v. 5, n. 11, p. 853-65, Nov 2005.

YASUDA, M. et al. A comparative study of germinal center: fowls and mammals. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases,** v. 21, n. 3, p. 179-89, Jul 1998.

_____. Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation. **Developmental and comparative immunology,** v. 27, n. 2, p. 159-66, Feb 2003.

4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTIBOTRÓPICO E ANTICROTÁLICO DE GALINHAS POEDEIRAS EM UM EXPERIMENTO DE LONGA DURAÇÃO

4.1 RESUMO

Acidentes ofídicos representam um grande problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Estudos recentes mostram que anticorpos produzidos em galinhas poedeiras podem ser uma alternativa a produção de antiveneno em mamíferos. Neste estudo analisamos a produção de anticorpos IgY em galinhas poedeiras inoculadas com venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* durante um período de 367 dias. Os anticorpos IgY presentes no soro e na gema dos ovos foram analisados quanto a avidez, o padrão de reconhecimento antigênico e a eficácia de neutralização dos venenos utilizados. Os níveis de anticorpos IgY antibotrópico e anticrotálico produzidos aumentaram significativamente após a segunda imunização e assim permaneceram até o final do experimento. Índices significativamente elevados de avidez foram observados para os anticorpos IgY antibotrópico no 142º dia e para os anticorpos anticrotálico no 232º dia após a primeira imunização. Os anticorpos IgY antibotrópico reconheceram antígenos de massa molecular de 25 kDa e 50 kDa, enquanto os anticorpos IgY anticrotálico reconheceram principalmente antígenos de massa molecular de 14 kDa e 30 kDa, respectivamente. Foi observado um aumento dos antígenos reconhecidos pelos antivenenos ao longo do período experimental. Amostras de anticorpos IgY anti-veneno botrópico apresentaram eficiência 290µl/3 DL_{50} e potência 0,307mg/ml. Enquanto as amostras de anticorpos IgY anticrotálico apresentaram eficiência 246µl/4 DL_{50} e potência de 0,829 mg/ml. Estes resultados mostram que a administração de sucessivas doses dos venenos durante um período superior a 6 meses resulta em um antiveneno com maior avidez e capaz de reconhecer um maior número de antígenos presentes nos venenos. Estas características levaram a obtenção de um antiveneno com eficiência e potência maiores do que as descritas anteriormente em outros estudos.

Palavras-chave: Imunoglobulinas, aves, gema, *Crotalus*, *Bothrops*.

4.1.1 INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais onde são responsáveis por grande número de mortes (PINHO et al., 2004; WILLIAMS et al., 2010). Na América do Sul, as principais espécies responsáveis por estes acidentes são as serpentes dos gêneros *Bothrops* (SEGURA et al., 2010) e *Crotalus* (GEORGIEVA et al., 2010), popularmente conhecidas como jararacas e cascavéis, respectivamente.

O uso de antissoro é reconhecido como tratamento de eficácia comprovada contra o envenenamento causado por picadas de serpentes (THEAKSTON et al., 2003; PRABHU et al., 2010). O antissoro é obtido a partir de soro equino contendo anticorpos policlonais contra venenos do mesmo gênero da serpente que causou o acidente. O alto custo da técnica, o sofrimento dos cavalos causado pelas imunizações consecutivas e a redução do tempo de vida destes animais, devido à toxicidade do antígeno usado, são algumas das desvantagens deste procedimento (ALMEIDA et al., 1998, 2008; THEAKSTON et al., 2003).

Por outro lado, galinhas poedeiras têm sido reconhecidas como uma excelente fonte de anticorpos policlonais, podendo representar uma alternativa para a produção de antissoros em cavalos (ALMEIDA et al., 2008; ARAUJO et al., 2010). A principal imunoglobulina encontrada nas aves é denominada IgY, cujas características estruturais se assemelham à IgG dos mamíferos (CARLANDER et al., 1999; BRUNDA et al., 2006). Além de estar presente no sangue das aves, a IgY é encontrada na gema dos ovos em altas concentrações (MOHAMMED et al., 1998; MORRISON et al., 2002; BAE et al., 2009). Cada ovo contém entre 80 e 100 mg de anticorpos específicos que podem ser encontrados na gema por até 100 dias após a imunização (DEVI et al., 2002), o que possibilita a produção de grandes quantidades de anticorpos durante o período de postura (CARLANDER et al., 1999). Além disso, os anticorpos presentes na gema dos ovos de galinhas poedeiras imunizadas podem ser extraídos e purificados por processos de baixo custo (ALMEIDA et al., 1998; BRUNDA et al., 2006). A produção de anticorpos em galinhas poedeiras também é atraente do ponto de vista ético porque evita a sangria, além de reduzir e aperfeiçoar a utilização de animais de laboratório. A capacidade de evitar a sangria de animais para obtenção dos anticorpos representa um refinamento ético considerável (ARAUJO et al., 2010; PRABHU et al., 2010).

Estudos recentes indicam que os anticorpos produzidos em galinhas poedeiras podem efetivamente neutralizar os efeitos do veneno de várias espécies de serpentes, uma vez que a IgY é funcionalmente equivalente a IgG de equinos, tanto no rendimento quanto na potência de neutralização (PRABHU et al., 2010). Altos títulos de anticorpos foram produzidos em galinhas imunizadas com veneno de *Echis carinatus* (PAUL et al., 2007), *Vipera* russelli, *Naja naja, Bungarus caeruleus* (MEENATCHISUNDARAM et al., 2008a, 2008b), *Bitis nasicornis, Bitis rhinoceros, Naja melanoleuca, Naja mossambica* (ALMEIDA et al., 2008).

Os anticorpos IgY produzidos em galinhas imunizadas com venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* também são capazes de reconhecer e neutralizar os componentes tóxicos dos venenos utilizados como antígenos (CARROLL et al., 1992; ALMEIDA et al., 1998; ARAUJO et al., 2010). A otimização deste processo permitiu a produção de extrato aquoso de IgY com alta atividade, a partir da gema de ovos de galinhas imunizadas com veneno de serpentes do gênero *Bothrops* (ARAUJO et al., 2010).

Este trabalho teve por objetivo avaliar os níveis, a avidez, o padrão de reconhecimento antigênico e a eficácia dos anticorpos IgY de galinhas poedeiras imunizadas com doses sucessivas de venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* em um experimento de longa duração.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Venenos

Como antígenos, foram utilizados *pools* de venenos de serpentes adultas do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, 35,8%; *B. alternatus*, 14,3%; *B. moojeni*, 14,3%*; B. jararacuçu* 7,1%*; B. newiedii*, 7,1%*; B. atrox*, 14,3%; *B. brazili*, 7,1%) e venenos de serpentes adultas da espécie *Crotalus durissus terrificus*.

As amostras dos venenos liofilizados foram fornecidas pelos Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda, diluídas a 5 mg/ml em tampão fosfato-salina (PBS) e conservadas a -20 °C.

4.2.2 Animais

Para a produção de IgY, foram utilizadas 10 galinhas poedeiras da linhagem white leghorn (*Gallus gallus domesticus*), com 20 semanas de vida, provenientes de granjas da região de Londrina - PR. Os animais foram mantidos na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina em gaiolas individualizadas, à temperatura ambiente, recebendo água potável e ração de postura à vontade.

Para os testes de toxicidade do veneno e eficiência do antiveneno, foram utilizados camundongos machos albinos *Swiss*, com massa entre 18 e 22 g, mantidos em gaiolas plásticas, com água e ração à vontade.

Os animais foram mantidos sob estritas condições éticas, de acordo com as recomendações sobre bem-estar animal, segundo projeto aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

4.2.3 Imunização das Galinhas

As galinhas poedeiras foram divididas em dois grupos (n=5), de acordo com o veneno utilizado. Cada animal foi inoculado por via intramuscular, em quatro pontos no músculo peitoral.

Um grupo de animais foi inoculado com 800 µl de emulsão de Adjuvante Completo de Freund (FCA) (Sigma, St. Louis, EUA) e 125 µg de veneno botrópico diluído em PBS, pH 7,4. O outro grupo foi inoculado com 800 µl de emulsão de FCA e 125 µg de veneno crotálico diluído em PBS, pH 7,4.

Nos dias 15, 30, 45, 90, 135, 180, 225, 270, 315 e 360, a partir da primeira imunização, foram inoculadas doses de reforço, nas quais o FCA foi substituído por Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma, St. Louis, EUA).

O sangue e os ovos foram coletados no dia anterior à primeira inoculação e nos dias 22, 37, 52, 97, 142, 187, 232, 277, 322 e 367, a partir da primeira imunização.

4.2.4 Extração e Quantificação IgY

Para extração dos anticorpos IgY foi utilizado o protocolo de precipitação com sulfato de amônia, segundo Akita e Nakai (1992), com modificações. As gemas coletadas foram separadas da clara e lavadas em água destilada. Após a retirada da película protetora, foram diluídas com cinco partes de água destilada pH 2,5 e incubadas *overnight* a 4°C.

Após incubação, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman número 1, a 4°C. Ao filtrado foi adicionado sulfato de amônia para concentração final de 35%, homogeneizado e incubado por 1 h à temperatura ambiente. Após a incubação, a solução foi centrifugada por 20 min a 1400 g. O precipitado foi ressuspendido em 2 ml de água destilada e dialisado contra água destilada por 24 h e contra PBS, pH 7,4, por mais 24 h, a 4 °C. Após o período da diálise foi adicionado

timerosal (Synth, Diadema, SP, Brasil) para concentração final de 0,02% à solução aquosa de anticorpos, aliquotada e armazenada a -20 °C.

A concentração de proteínas presente na solução aquosa extraída da gema foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.2.5 Determinação dos Níveis de Anticorpos IgY Antibotrópico e IgY Anticrotálico

Os níveis de anticorpos antibotrópico e anticrotálico presentes no soro e na gema dos ovos das galinhas imunizadas foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto.

Foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano (Corning Costar Corporation, Acton, MA, EUA). Para sensibilização das placas, em cada poço, foram adicionados 100 µl de tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6, contendo 250 ng de veneno crotálico ou 500 ng de veneno botrópico. As placas foram incubadas *overnight*, a 4°C. Após a incubação, foram realizadas três lavagens, utilizando 150 µl/poço de PBS *tween* 20 a 0,05% pH 7,4 (PBST).

Foram adicionados 150 µl de solução de PBS-leite desnatado 5% em cada poço, a placa foi incubada por 1h, a 25 °C e lavada três vezes com PBST, conforme descrito anteriormente.

A seguir, em cada poço foram adicionados 100 µl de amostras de soro ou gema diluídos 1:8000 em PBS-leite desnatado 1%. A placa foi incubada por 1h, a 25 °C e lavada três vezes com PBST. Controles positivos, utilizando solução de IgY purificada, e controles negativos (PBS, pH 7,4) foram realizados em paralelo.

Foram adicionados 100 µl/poço de imunoglobulina de coelho anti-IgY conjugada com peroxidase (Sigma, St. Louis, EUA) diluídos 1:40000 em PBS-leite desnatado 1%. Após a incubação por 1 h a 25 °C, a placa foi então lavada três vezes com PBST e em cada poço foram adicionados 100 µl de substrato preparado a partir da mistura de 10 ml de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 com 100 µl de peróxido de hidrogênio (F.Maia, Cotia, SP, Brasil) e 100 µl de solução de tetrametilbenzidina (Sigma, St. Louis, EUA). Foi realizada a incubação por 15 min à temperatura ambiente, em ausência de luz e interrompeu-se a reação com a adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 1N (Nuclear, Diadema, SP, Brasil). A leitura da absorbância/poço foi realizada em espectrofotômetro para microplacas (Thermo

Plate, TP-Reader, Rayto Life and Analytical Sciences Co. Ltd, Alemanha), com filtro de 450 nm.

4.2.6 Determinação da Avidez de Anticorpos IgY Antibotrópico e IgY Anticrotálico

A avidez dos anticorpos da gema e do soro das aves foi determinada por ELISA competitivo indireto, segundo Bollen et al. (1996), com modificações.

A placa foi sensibilizada como descrito no item anterior. Após a incubação com as amostras de soro ou gema, em cada poço foram adicionados 100 µl de solução aquosa de cloreto de magnésio 2 M (Nuclear, Diadema, SP, Brasil), a placa foi incubada por 30 min a 25 °C e lavada três vezes. Em seguida, procedeu-se a adição de imunoglobulina de coelho anti-IgY conjugada com peroxidase e as demais etapas foram seguidas conforme protocolo no item anterior. O índice de avidez dos anticorpos IgY foi determinado pela relação entre as absorbâncias obtidas a 450 nm na presença ou ausência de cloreto de magnésio 2 M.

4.2.7 Caracterização dos Antígenos Reconhecidos Pelos Anticorpos IgY Antibotrópico e IgY Anticrotálico por *Western blot*

Amostras dos venenos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). Os antígenos separados por eletroforese foram transferidos para membranas de nitrocelulose em 30 V, *overnight*, a 4 °C em cuba (SCIE-PLAS, Holliston, MA, EUA).

As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente com solução de Ponceau 0,1% em ácido acético 5%; lavadas 4 vezes em PBS, pH 7,4, por 5 min e incubadas por 2 h em solução de PBS-leite desnatado 5% em agitador, a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com amostras de soro antibotrópico ou anticrotálico, procedentes das galinhas imunizadas e de cavalos hiperimunizados (Vencofarma, Londrina, PR, Brasil) além de solução aquosa de IgY antibotrópico e anticrotálico extraída das gemas. As amostras de soro e das soluções aquosas de IgY foram diluídas 1:1000 em PBS-leite desnatado 1% e as membranas de nitrocelulose foram incubadas por 24 h em agitador, à temperatura ambiente. A seguir, foi realizada a lavagem em PBS, conforme descrito acima, e a incubação com imunoglobulina de coelho anti-IgY

(Sigma, St. Louis, EUA) ou anti-IgG (ZYMED, San Francisco, CA, EUA) conjugada com peroxidase, diluídas 1:5000 em PBS-leite desnatado 1%, durante 2 h, a temperatura ambiente, em agitador

Após as lavagens, as membranas foram incubadas por 30 min, em agitador, na ausência de luz, com 15 ml de solução de tampão Tris 0,05 M pH 7,4, contendo 10 mg de 3,3-diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, EUA) e peróxido de hidrogênio (F.Maia, Cotia, SP, Brasil) 3%. Para bloqueio da reação, as membranas foram lavadas várias vezes em água destilada.

4.2.8 Determinação da Toxicidade Letal dos Venenos, da Eficácia de Neutralização e da Potência dos Antivenenos em Camundongos

A toxicidade letal de cada veneno foi determinada pelo cálculo da dose letal (DL_{50}). Foi realizada a diluição seriada de cada veneno em solução salina, totalizando 0,5 ml, que foi injetada intraperitonealmente em camundongos. Para cada dose de veneno (cinco doses) foram utilizados grupos de 6 animais. A dose de cada veneno que matou 50% dos animais (DL_{50}) em 48 h após a injeção do mesmo, foi calculada pela análise de probitos.

A eficácia dos anticorpos neutralizantes foi avaliada pelo o cálculo da dose efetiva média (DE_{50}).

Cada camundongo foi inoculado com uma mistura de veneno e solução aquosa de IgY antiveneno, totalizando um volume de 0,5 ml/animal. A concentração de proteínas da solução aquosa de IgY utilizada foi ajustada para 15 mg/ml. Para o veneno botrópico foi utilizado volume equivalente a 3 DL_{50} e para o veneno crotálico, 4 DL_{50}. As soluções foram preparadas a partir da mistura do veneno com volumes crescentes de solução aquosa de IgY extraída das gemas dos ovos do 232º dia após a primeira imunização. Após incubação em agitador, a 37 °C por 30 min, as misturas veneno-antiveneno foram inoculadas em 6 camundongos por diluição de solução aquosa de IgY.

A DE_{50} foi calculada a partir do número de mortes ocorridas nas primeiras 48 h após a injeção da mistura veneno-antiveneno, pela análise de probitos. A DE_{50} foi expressa em microlitros de solução aquosa de IgY antiveneno/camundongo.

A partir do cálculo da DE_{50}, foi determinada a potência dos anticorpos IgY antiveneno, ou seja, a quantidade de veneno neutralizada por 1,0 ml de antiveneno, através da análise de probitos. Os procedimentos para determinação da DL_{50} e da DE_{50} foram realizados conforme recomendado pela Organização Mundial de Saúde (CHIPPAUX, 2010).

4.2.9 Análise Estatística

A distribuição de normalidade foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os resultados obtidos nas análises realizadas por ELISA foram comparados por ANOVA de medidas repetidas, em tempos diferentes, com teste *post-hoc* de Tukey ($P<0,05$).

As análises de probitos foram realizadas utilizando o programa BioStat - AnalystSoft - versão 2007.

4.3 RESULTADOS

Para determinação dos níveis de anticorpos IgY antibotrópico e IgY anticrotálico produzidos após sucessivas imunizações, amostras de soro e gema obtidas ao longo do experimento foram analisadas por ELISA indireto (Figura 6A e 6B). Níveis elevados destes anticorpos foram observados no 37° dia após a primeira imunização, atingindo nível máximo nas imunizações posteriores, assim permanecendo até o final do experimento, que durou 367 dias. Na gema a produção de IgY antivenenos, em resposta aos dois antígenos, apresentou cinética semelhante à observada no soro (Figura 6C e 6D).

Para determinar os níveis de avidez dos anticorpos IgY antibotrópico e IgY anticrotálico, foram analisadas amostras de soro obtidas ao longo do experimento. O soro antibotrópico apresentou aumento significativo de avidez a partir do 142º dia (Figura 7A), de maneira semelhante com o que ocorreu com o soro anticrotálico a partir do 232º dia (Figura 7B). Não houve diferença entre os resultados obtidos na análise da avidez do soro e da gema.

Figura 6 - Níveis de imunoglobulinas IgY antibotrópico e IgY anticrotálico presentes no soro (A e B) e na gema (C e D) de galinhas poedeiras inoculadas com 125 µg de veneno crotálico e 125 µg de veneno botrópico, respectivamente. OD: densidade óptica a 450 nm. * diferença significativa nos níveis de anticorpos em relação aos dias 0 e 22. (p <0,05)

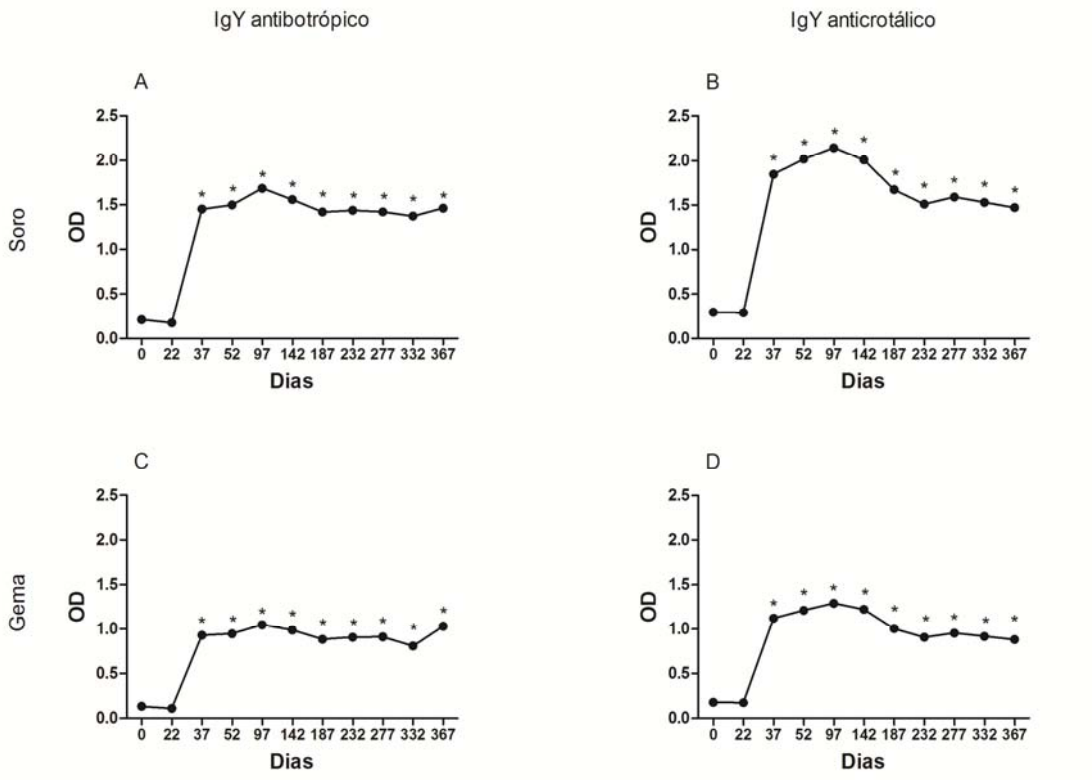
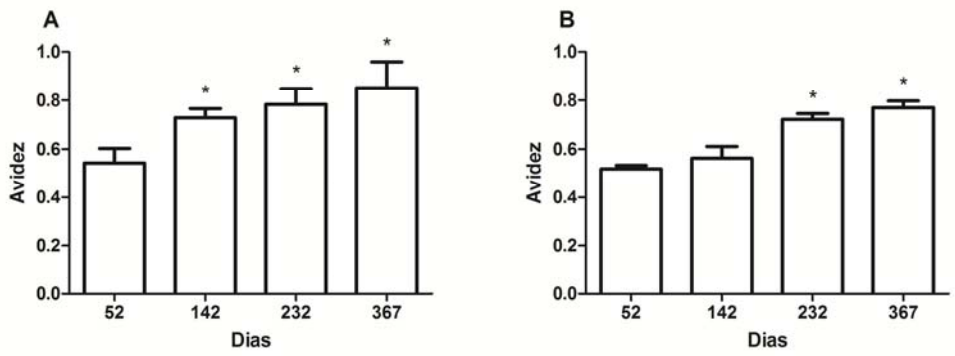


Figura 7 - Índices de avidez das imunoglobulinas IgY antibotrópico (A) e anticrotálico (B) presentes no soro de galinhas poedeiras inoculadas com 125 µg de veneno botrópico e 125 µg de veneno crotálico, respectivamente, verificados ao longo do experimento. *diferença significativa em relação à 3ª imunização (52 dias) (P<0,05).

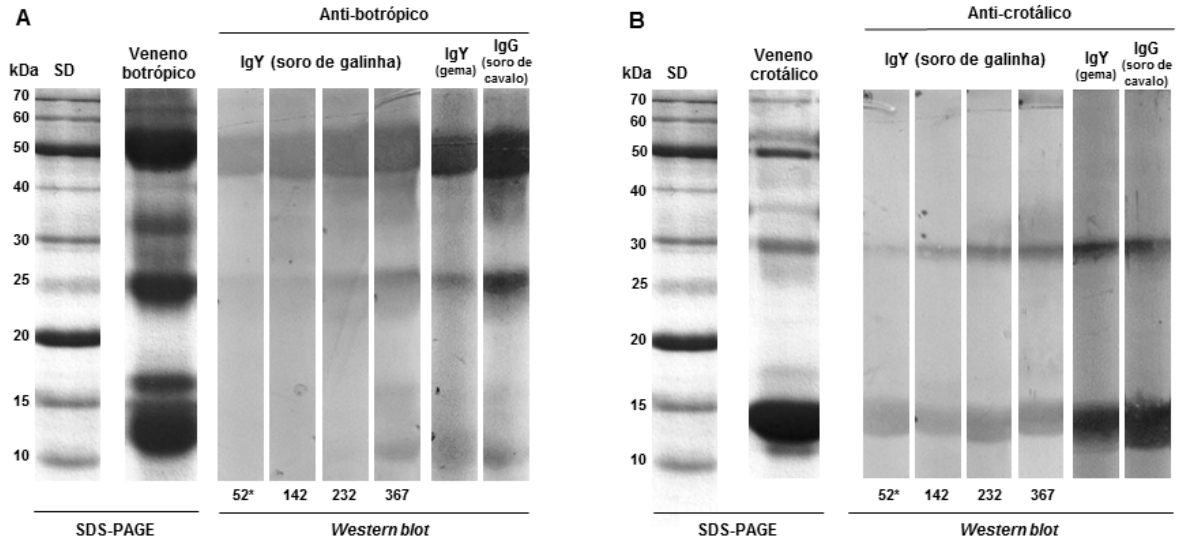


Foram realizadas análises por *Western blot* para determinar quais componentes dos venenos são reconhecidos pelos anticorpos IgY antibotrópico e pelos anticorpos IgY anticrotálico procedentes do soro e da gema das galinhas imunizadas, e para comparar estes padrões de reconhecimento aos apresentados

pelo soro antibotrópico e anticrotálico produzido em cavalos. As imunoglobulinas presentes no soro das galinhas poedeiras imunizadas reconheceram frações diferentes dos antígenos após sucessivas imunizações (Figura 3), sendo que alguns componentes dos venenos botrópico e crotálico foram reconhecidos apenas a partir da sétima imunização (232° dia). E ainda, alguns componentes não foram reconhecidos me nenhum momento.

Os anticorpos antibotrópico extraídos das gemas após a última imunização reconheceram os mesmos antígenos que os anticorpos IgY do soro das galinhas e os anticorpos IgG antibotrópico de cavalo (Figura 8A). Um padrão semelhante de reconhecimento dos componentes antigênicos foi observado quando comparados os anticorpos IgY anticrotálico proveniente do soro, da gema e os anticorpos IgG anticrotálico proveniente do soro de cavalo (Figura 8B).

Figura 8 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) dos venenos botrópico (A) e crotálico (B) e análise por *Western blot* dos componentes dos venenos reconhecidos por anticorpos IgY presentes no soro e na solução aquosa extraída da gema dos ovos do 232º dia de galinhas poedeiras imunizadas e por IgG presente no soro de cavalos imunizados. *Dias após a 1ª imunização.



Para determinar a eficiência do antiveneno, foram realizados os testes para determinação da DL_{50}. A DL_{50} encontrada para o veneno botrópico foi de 44,47 µg e para o veneno crotálico de 0,68 µg.

O teste de neutralização foi utilizado para demonstrar a capacidade dos anticorpos IgY antibotrópico e anticrotálico em neutralizar a toxicidade letal de

cada veneno utilizado como antígeno. Foram utilizadas amostras de solução aquosa de IgY extraídas dos ovos do 232º dia após a primeira imunização. A concentração de proteínas das soluções aquosas de IgY utilizadas foi ajustada para 15 mg/ml. A eficácia dos anticorpos IgY antibotrópico, expressa através da DE_{50}, foi de 290µl/3 DL_{50} e indica o volume de solução aquosa dos anticorpos IgY necessário para neutralizar o número de DL_{50} utilizado. A potência dos anticorpos IgY antibotrópico foi de 0,307mg/ml e representa a quantidade de veneno neutralizada por 1ml de antiveneno. A eficácia dos anticorpos IgY anticrotálico foi de 246µl/4 DL_{50} e sua potência de 0,829 mg/ml.

4.4 DISCUSSÃO

O tratamento de envenenamento causado por serpentes utiliza o princípio básico de neutralização mediada por anticorpos (LOMONTE et al., 2009). Esta estratégia terapêutica, amplamente difundida, possibilita a redução da mortalidade e da morbidade dos acidentes ofídicos, uma vez que os anticorpos obtidos principalmente a partir do soro de animais imunizados são capazes de neutralizar as toxinas de ação sistêmica presentes nos venenos (GUTIERREZ et al., 2006, 2007).

A maioria das mortes por picada de serpente ocorre em países tropicais, que requerem, portanto, grandes estoques de antiveneno apropriado. Os procedimentos utilizados para imunização de cavalos são prolongados e complexos e a toxicidade do veneno representa a principal limitação desta metodologia (DEVI et al., 2002). As dificuldades da produção de antissoro pelos métodos tradicionais tem motivado a busca por agentes neutralizantes para complementar e aperfeiçoar as ações da soroterapia convencional (LOMONTE et al., 2009).

Como alternativa à produção de antiveneno em mamíferos, a produção de anticorpos IgY a partir da gema de ovos de galinhas imunizadas tem sido investigada nas últimas décadas. Carroll et al. (1992) foram pioneiros em descrever a produção e a capacidade de neutralização *in vivo* dos anticorpos IgY extraída de gemas de ovos de galinhas poedeiras imunizadas com veneno de *Crotalus atrox*. Desde então, diversos trabalhos sugerem o uso de IgY em substituição a IgG de mamíferos no tratamento de acidentes ofídicos (ALMEIDA et al., 1998, 2008; PAUL et al., 2007; MEENATCHISUNDARAM et al., 2008a; 2008b;

ARAUJO et al., 2010; PRABHU et al., 2010). A possibilidade de produção de IgY antiveneno a partir de galinhas imunizadas com veneno de serpentes do gênero *Bothrops* é considerada uma abordagem promissora, uma vez que nenhum dano macroscópico aparente é causado aos animais durante o período experimental. Além disso, baixas doses de veneno induzem a produção de altos níveis de IgY antibotrópico e o processo de purificação pode ser realizado nas mesmas instalações utilizadas para a preparação de soro de cavalo (ARAUJO et al., 2010).

A maioria dos estudos que utilizaram venenos de serpente como antígeno para produção de anticorpos em galinhas poedeiras, descrevem protocolos de imunização com períodos inferiores a 6 meses. (CARROLL et al., 1992; ALMEIDA et al., 1998, 2008; PAUL et al., 2007; MEENATCHISUNDARAM et al., 2008a; 2008b). Neste trabalho pela primeira vez descrevemos o perfil de produção e as características de anticorpos IgY antiveneno em galinhas poedeiras durante um período de tempo de 367 dias. Os resultados do presente estudo mostram que altos níveis de anticorpos IgY antibotrópico e anticrotálico puderam ser observados logo após a segunda imunização, tanto no soro como na gema, à semelhança do que foi descrito por Almeida et al. (1998) e Araujo et al. (2010), utilizando venenos de serpentes das mesmas espécies. Além disso, observamos que a realização de imunizações a cada 45 dias resulta em níveis estáveis de anticorpos, o que permite a redução sensível do número de imunizações em comparação com outros estudos (ARAÚJO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2008; MEENATCHISUNDARAM et al., 2008). A redução do número de inoculações necessárias para a manutenção de altos níveis de anticorpos IgY pode tornar viável a utilização em escala industrial de galinhas poedeiras para esta finalidade.

Outro importante resultado observado em nosso estudo foi que a avidez dos anticorpos IgY antibotrópico e IgY anticrotálico produzidos em galinhas poedeiras aumenta de modo significativo após sucessivas imunizações. Este resultado era esperado, uma vez que em aves, bem como em mamíferos, ocorre um aumento progressivo da avidez concomitante ao tempo decorrido após várias imunizações, onde anticorpos de menor avidez são produzidos durante estágios iniciais da resposta imune, e os de alta avidez em momentos posteriores (INOUYE et al., 1984). Uma vez que foi observado o aumento significativo da avidez dos anticorpos IgY antibotrópico no 135º dia após a primeira imunização e que a IgY anticrotálico apresenta avidez significativamente maior após o 225º dia, sugere-se

que, em protocolos experimentais que utilizam períodos inferiores a estes, os resultados de neutralização possam ser comprometidos pela menor avidez dos anticorpos. Além disso, à medida que os índices de avidez aumentaram, verificamos que ocorreram mudanças no reconhecimento pelos anticorpos IgY dos componentes antigênicos dos venenos.

Os venenos ofídicos são misturas complexas de moléculas bioativas constituídas, principalmente, por proteínas, em sua maioria toxinas ou enzimas tóxicas e ainda podem conter peptídeos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas e componentes inorgânicos. A proporção destes componentes é variável nos venenos das diferentes espécies, o que explica a diversidade da sintomatologia dos envenenamentos (DOLEY; KINI, 2009). O veneno produzido pelas serpentes do gênero *Bothrops* apresentam grande variação em sua composição e na atividade de suas toxinas. A maioria das proteínas encontradas no veneno botrópico apresenta peso molecular variando entre 64 e 14 kDa e atividade proteolítica (QUEIROZ et al., 2008). Em nosso experimento, os resultados obtidos que comparam as frações imunogênicas do veneno, reconhecidas pela IgY antibotrópico de galinhas e pelo antissoro produzido em cavalo, indicaram que as proteínas do veneno com massa molecular de aproximadamente 50 kDa e 25 kDa foram reconhecidas por estes anticorpos. Proteínas que apresentam massa molecular de aproximadamente 50 kDa e 25 kDa, presentes no veneno botrópico, foram identificadas como metaloproteases (MEIER, 1986; LOPEZ-LOZANO et al., 2002; SALDARRIAGA et al., 2003;GUERCIO et al., 2006; CORREA-NETTO et al., 2010). Estas enzimas são altamente tóxicas e provocam hemorragias pela interferência na coagulação sanguínea e na formação do tampão hemostático ou, ainda, pela degradação dos componentes da lâmina basal capilar e citotoxicidade sobre as células endoteliais (KAMIGUTI et al., 1991; MOREIRA et al., 1994; MATSUI et al., 2000).

O veneno das serpentes do gênero *Crotalus* também é constituído por substâncias, cujos efeitos biológicos variam nas diferentes espécies (GEORGIEVA et al., 2010). O principal componente encontrado neste veneno é a crotoxina, uma neurotoxina que ocorre na maioria das espécies sul-americanas, constituída principalmente pela fosfolipase A2, uma proteína de ação enzimática, com massa molecular de 14 kDa (FRANCISCHETTI et al., 2000; BOLDRINI-FRANCA et al., 2010; GEORGIEVA et al., 2010). Nossos resultados das análises em *Western blot* indicaram que anticorpos IgY anticrotálico reconheceu a fração

antigênica do veneno crotálico com massa molecular de aproximadamente 14 kDa, o que correspondente provavelmente à crotoxina (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010). Os anticorpos IgY também foram capazes de reconher componentes do veneno com massa molecular de aproximadamente 30 kDa, que podem corresponder às serinoproteases presentes no veneno crotálico. (OLIVEIRA et al., 2009; BOLDRINI-FRANCA et al., 2010). As serinoproteases não são letais por si só, mas contribuem para o efeito tóxico do veneno, interferindo na homeostase, uma vez que alteram a agregação plaquetária e causam fibrinólise (BRAUD et al., 2000). Almeida et al. (1998) também descreveram que a IgY anticrotálico foi capaz de reconhecer e precipitar elementos do veneno da serpente, com atividades biológicas definidas como a fosfolipase, neutralizando seus efeitos biológicos, sem no entanto identificar a massa molecular destes componentes. Além disso, baixas doses de veneno induziram a produção de altos níveis de anticorpos em galinhas, ao contrário do que ocorre em cavalos, uma vez que o veneno crotálico é considerado pobre imunógeno, quando utilizado para a produção de soro antiofídico em mamíferos (CLISSA et al., 1999).

Uma vez que alguns componentes tóxicos dos venenos foram reconhecidos pelos anticorpos IgY antibotrópico e anticrotálico, foram realizados testes *in vivo* onde foi possível verificar o efeito protetor dos anticorpos IgY. Os testes de eficiência e potência mostraram a ação neutralizante dos anticorpos IgY produzido em galinhas, que receberam o equivalente a 3 DL_{50} do veneno botrópico e 4 DL_{50} do veneno crotálico. Nossos dados indicam que os anticorpos IgY antibotrópico produzidos, após o período de imunização utilizado, apresentam eficiência e potência superiores aos observados por outros autores. Almeida et al. (1998) descreveram a eficiência dos anticorpos IgY antibotrópico em termos de dose efetiva (592,5 µl/2 DL_{50}) e a potência de 0,067 mg/ml. Araújo et al (2010) relataram a dose efetiva de 365µl/2 DL_{50} e a potência de 0,154 mg/ml para os anticorpos IgY antibotrópico produzidos. Da mesma forma, em relação aos anticorpos IgY anticrotálico, nossos resultados foram maiores que os descritos por Almeida et al. (1998), que relataram valores de 457,5 µ1/3 DL_{50} e 0,075 mg/ml, para dose efetiva e potência, respectivamente, dos anticorpos IgY produzidos a partir da imunização de galinhas com veneno de serpentes da espécie *C. Durissus terrificus.* Provavelmente as diferenças observadas na dose efetiva e na potência dos anticorpos IgY obtidos no nosso estudo deve-se ao aumento da avidez observada ao longo do período de

imunização. Porém, não podemos descartar a possibilidade de diferenças na concentração do antiveneno ser a causa da diferença na dose efetiva e potência do nosso antiveneno em comparação aos antivenenos obtidos pelos autores citados.

Portanto, podemos concluir que a produção de anticorpos IgY antibotrópico e anticrotálico em níveis elevados pode ser obtida com administração de doses de reforço dos venenos botrópico e crotálico, a cada 45 dias. Este aumento no período de imunização contribui significativamente para o aumento dos índices de avidez e consequentemente para a maior capacidade de neutralização de toxinas constituintes dos venenos botrópico e crotálico. Estes dados podem ser importantes no aperfeiçoamento de protocolos para utilização de galinhas poedeiras como fonte econômica e eticamente viável de anticorpos policlonais, o que pode resultar em metodologias complementares ou mesmo substitutas da soroterapia, comumente utilizada no tratamento de acidentes ofídicos.

4.5 REFERÊNCIAS

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from Egg-Yolk - Isolation and Purification. **Journal of Food Science,** v. 57, n. 3, p. 629-634, May-Jun 1992.

ALMEIDA, C. M. C. et al. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. **Veterinary Record,** v. 143, n. 21, p. 579-584, Nov 21 1998.

_____. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon,** v. 52, n. 2, p. 293-301, Aug 1 2008.

ARAUJO, A. S. et al. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon,** v. 55, n. 4, p. 739-44, Apr 1 2010.

BAE, H. D. et al. Higher incorporation of heterologous chicken immunoglobulin Y compared with homologous quail immunoglobulin Y into egg yolks of Japanese quail (Coturnix japonica). **Poultry Science,** v. 88, n. 8, p. 1703-1711, Aug 1 2009.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Snake venomics and antivenomics of Crotalus durissus subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics,** v. 73, n. 9, p. 1758-76, Aug 5 2010.

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, n. 2, p. 113-120, May 27 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry,** v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRAUD, S. et al. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie,** v. 82, n. 9-10, p. 851-9, Sep-Oct 2000.

BRUNDA, G. et al. Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (Naja naja naja) venom in biological samples of forensic origin. **Toxicon,** v. 48, n. 2, p. 183-194, Aug 2006.

CARLANDER, D. et al. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Upsala Journal of Medical Sciences,** v. 104, n. 3, p. 179-89, 1999.

CARROLL, S. B. et al. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. **Toxicon,** v. 30, n. 9, p. 1017-25, Sep 1992.

CHIPPAUX, J. P. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. **Biologie aujourd'hui,** v. 204, n. 1, p. 87-91, 2010.

CLISSA, P. B. et al. Toxicity and immunogenicity of Crotalus durissus terrificus venom treated with different doses of gamma rays. **Toxicon,** v. 37, n. 8, p. 1131-41, Aug 1999.

CORREA-NETTO, C. et al. Immunome and venome of Bothrops jararacussu: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon,** v. 55, n. 7, p. 1222-35, Jun 15 2010.

DEVI, C. M. et al. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods,** v. 51, n. 2, p. 129-38, Apr 18 2002.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and molecular life sciences : CMLS,** v. 66, n. 17, p. 2851-71, Sep 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus). **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP,** v. 127, n. 1, p. 23-36, Aug 2000.

GEORGIEVA, D. et al. Snake Venomic of Crotalus durissus terrificus-Correlation with Pharmacological Activities. **Journal of Proteome Research,** v. 9, n. 5, p. 2302-2316, May 2010.

GUERCIO, R. A. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake Bothrops atrox. **Proteome science,** v. 4, p. 11, 2006.

GUTIERREZ, J. M. et al. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Medicine,** v. 3, n. 6, p. e150, Jun 2006.

_____. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Current Pharmaceutical Desig,** v. 13, n. 28, p. 2935-50, 2007.

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, n. 3, p. 525-9, Sep 1984.

KAMIGUTI, A. S. et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. **Toxicon,** v. 29, n. 8, p. 961-72, 1991.

LOMONTE, B. et al. Neutralization of Bothrops asper venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon,** v. 54, n. 7, p. 1012-1028, 2009.

LOPEZ-LOZANO, J. L. et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild Bothrops atrox specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon,** v. 40, n. 7, p. 997-1006, Jul 2002.

MATSUI, T. et al. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et biophysica acta,** v. 1477, n. 1-2, p. 146-56, Mar 7 2000.

MEENATCHISUNDARAM, S. et al. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. **Toxicon,** v. 52, n. 2, p. 221-7, Aug 1 2008a.

_____. Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. **International Immunopharmacology,** v. 8, n. 8, p. 1067-1073, Aug 2008b.

MEIER, J. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance Bothrops atrox. **Toxicon ,** v. 24, n. 1, p. 41-6, 1986.

MOHAMMED, S. M. et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology,** v. 4, n. 2, p. 115-125, Oct 1998.

MOREIRA, L. et al. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from Bothrops asper (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon,** v. 32, n. 8, p. 976-87, Aug 1994.

MORRISON, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular immunology,** v. 38, n. 8, p. 619-625, 2002.

OLIVEIRA, D. G. et al. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of Crotalus durissus terrificus and Crotalus durissus collilineatus. **Acta biochimica et biophysica Sinica,** v. 41, n. 1, p. 21-9, Jan 2009.

PAUL, K. et al. Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: Isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon,** v. 50, n. 7, p. 893-900, Dec 1 2007.

PINHO, F. M. et al.. Snakebites in the State of Goias, Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v. 50, n. 1, p. 93-6, Jan-Mar 2004.

PRABHU, R. R. et al. Extraction and characterization of polyclonal egg yolk antibodies (IgY) in chicken against cobra (Naja naja) venom. **Current Science,** v. 98, n. 2, p. 237-239, Jan 25 2010.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon,** v. 52, n. 8, p. 842-51, Dec 15 2008.

SALDARRIAGA, M. M. et al. Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia. **Toxicon,** v. 42, n. 4, p. 405-11, Sep 15 2003.

SEGURA, A. et al. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. **Toxicon,** v. 56, n. 6, p. 980-9, Nov 2010.

THEAKSTON, R. D. et al. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon,** v. 41, n. 5, p. 541-57, Apr 2003.

WILLIAMS, D. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet,** v. 375, n. 9708, p. 89-91, Jan 2 2010.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A partir do exposto, é possível concluir que:

- O veneno crotálico é um bom imunógeno quando inoculado em galinhas poedeiras, pois induziu a produção de altos níveis de anticorpos IgY a partir da segunda imunização;
- Em galinhas poedeiras inoculadas com veneno crotálico, o baço participa da reposta imune humoral através do aumento no número de células B extrafoliculares, produtoras de anticorpos IgY nas regiões de PWP;
- Em resposta à inoculação com veneno crotálico em galinhas poedeiras houve aumento do número de células B nos compartimentos extravasculares da medula óssea;
- A inoculação de doses de reforço dos venenos botrópico e crotálico em galinhas poedeiras, a cada 45 dias, estimula a produção de anticorpos IgY antibotrópico e anticrotálico em níveis elevados durante longos períodos;
- A utilização de um protocolo de imunização superior a 232 dias possibilitou a produção de anticorpos IgYantibotrópico e anticrotálico com maiores índices de avidez e consequentemente maior capacidade de neutralização de toxinas constituintes dos venenos botrópico e crotálico, respectivamente.
- A compreensão dos locais onde se desenvolve a resposta imune humoral, bem como das propriedades dos anticorpos IgY antiveneno produzidos favorecem a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune humoral de galinhas poedeiras e fortalecem a ideia de produção e utilização destes anticorpos no tratamento de acidentes ofídicos.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo Submetido ao Periódico Toxicon

Gmail by Google

Fábio Goulart de Andrade <fgandrade@gmail.com>

Editor handles TOXCON-D-11-00266

1 mensagem

Toxicon <toxcon@elsevier.com> **27 de junho de 2011 02:26**
Para: fgandrade@gmail.com

Ms. Ref. No.: TOXCON-D-11-00266
Title: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-BOTHROPIC AND ANTI-CROTALIC IGY ANTIBODIES OF LAYING HENS IN A LONG-TERM EXPERIMENT
Toxicon

Dear Fábio,

Your submission entitled "PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-BOTHROPIC AND ANTI-CROTALIC IGY ANTIBODIES OF LAYING HENS IN A LONG-TERM EXPERIMENT" will be handled by Editor in Chief Alan Harvey.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is http://ees.elsevier.com/toxcon/.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/TOXCON/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Toxicon

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-BOTHROPIC AND ANTI-CROTALIC IGY ANTIBODIES OF LAYING HENS IN A LONG-TERM EXPERIMENT

Fábio Goulart de Andrade[1, 2*], Silas Fernandes Eto[2,1], Ana Carolina Navarro dos Santos Ferraro[2], Denise Turini Gonzales Marioto[2], Narciso Júnior Vieira[2], Ana Paula Cheirubim[2], Solange de Paula Ramos[3], Emerson José Venâncio [1,2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, P. O. Box 6001, CEP 86051-980, Londrina, PR, Brazil
[2] Laboratório de Imunologia IV, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, P. O. Box 6001, CEP 86051-980, Londrina, PR, Brazil
[3] Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, P. O. Box 6001, CEP 86051-980, Londrina, PR, Brazil

* Corresponding author. Tel./fax +55 4333714327
E-mail address: fgandrade@gmail.com

ABSTRACT

Ophidian accidents represent a great public health problem in developing countries. Recent studies have shown that antibodies produced in laying hens could be an alternative to the production of antivenin in mammals. In this study we analyzed the production of IgY antibodies in laying hens inoculated with venom from snakes of the *Bothrops* and *Crotalus* genera over a 360-day period. IgY antibodies present in the serum and egg yolks were analyzed according to avidity, pattern of antigen recognition, and efficiency in neutralizing the venom. The levels of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies increased significantly after the second immunization, and remained at these levels until the end of the experiment. Significantly high avidity levels were observed for anti-bothropic IgY antibodies on the 142nd day and for anti-crotalic antibodies on the 232nd day after the first immunization. Anti-bothropic IgY antibodies recognized antigens with molecular masses between 25 kDa and 50 kDa, whereas anti-crotalic IgY antibodies recognized mainly the antigens with molecular masses of 14 kDa and 30 kDa, respectively. An increase in the antigens recognized by the antivenins was observed during the experimental period. Samples of bothropic IgY antivenin antibodies presented an efficiency of 290µl/3 DL_{50} and a potency of 0.307mg/ml. Samples of anti-crotalic IgY antibodies presented an efficiency of 246µl/4 DL_{50} and a potency of 0.829 mg/ml. These results show that the administration of successive doses of the venoms for more than 6 months results in an antivenin with higher avidity that is able to recognize a greater number of antigens present in the venoms. These characteristics indicate a more efficient and potent antivenin than what has been described in other studies.

Keywords: IgY Antivenom. Chicken egg yolk. Snake venom. *Crotalus*. *Bothrops*

1. Introduction

Ophidian accidents represent a serious public health problem in tropical countries, where they cause a large number of deaths (Pinho et al., 2004; Williams et al., 2010). In South America, the main species responsible for these accidents are snakes from the *Bothrops* (Segura et al., 2010) and *Crotalus* (Georgieva et al., 2010) genera, popularly known as lanceheads and rattlesnakes, respectively.

The use of antiserum is recognized as an effective treatment for snakebite poisoning (Theakston et al., 2003; Prabhu et al., 2010). Antiserum is obtained from equine serum that contains polyclonal antibodies against venoms from the same genus of the snake involved in the accident. Some disadvantages of this procedure include

the high cost of the technique, the suffering of the horses due to consecutive immunizations and the reduced longevity of these animals due to the toxicity of the antigen (Almeida et al., 1998, 2008; Theakston et al., 2003).

On the other hand, laying hens have been recognized as an excellent source of polyclonal antibodies, and could represent an alternative to antiserum production in horses (Almeida et al., 2008; Araujo et al., 2010). The principal immunoglobulin found in birds is denominated IgY, and its structural characteristics are similar to mammalian IgG (Carlander et al., 1999; Brunda et al., 2006). In addition to being present in the blood of birds, high concentrations of IgY are found in egg yolks (Mohammed et al., 1998; Morrison et al., 2002; Bae et al., 2009). Each egg contains between 80 and 100 mg of specific antibodies that can be found in the yolk for up to 100 days after immunization (Devi et al., 2002), which allows the production of great quantities of antibodies during the laying period (Carlander et al., 1999). Furthermore, antibodies present in the yolk of eggs of immunized laying hens can be extracted and purified through low cost processes (Almeida et al., 1998; Brunda et al., 2006). The production of antibodies in laying hens is also attractive from the ethical point of view because it avoids blood-letting as well as reduces and perfects the use of laboratory animals. The possibility of avoiding animal blood-letting to obtain antibodies represents a considerable ethical refinement (Araujo et al., 2010; Prabhu et al., 2010).

Recent studies have indicated that antibodies produced in laying hens can effectively neutralize the effects of the venom from several snake species because IgY is functionally equivalent to equine IgG both in yield and in neutralizing potency (Prabhu et al., 2010). High antibody titers have been produced in hens immunized with venoms of *Echis carinatus* (Paul et al., 2007), *Vipera* russelli, *Naja naja, Bungarus*

caeruleus (Meenatchisundaram et al., 2008a, 2008b), *Bitis nasicornis, Bitis rhinoceros, Naja melanoleuca, Naja mossambica* (Almeida et al., 2008).

IgY antibodies produced in hens immunized with venom of snakes from the *Bothrops* and *Crotalus* genera can also recognize and neutralize toxic components of venoms used as antigens (Carroll et al., 1992; Almeida et al., 1998; Araujo et al., 2010). The optimization of this process made it possible to produce high-activity IgY aqueous extract from the egg yolks of hens immunized with *Bothrops* genus venom (Araujo et al., 2010).

The objective of this study was to evaluate the levels, avidity, antigen recognition patterns and efficiency of IgY antibodies from laying hens immunized with successive doses of *Bothrops* and *Crotalus* genera venom in a long-term experiment.

2. Material and Methods

2.1. Venoms

The antigens used were pools of venoms from adult snakes of the genus *Bothrops* (*B. jararaca*, 35.8%; *B. alternatus*, 14.3%; *B. moojeni*, 14.3%*; B. jararacuçu* 7.1%*; B. newiedii*, 7.1%*; B. atrox*, 14.3%; *B. brazili*, 7,1%) and venoms from adults of the species *Crotalus durissus terrificus*.

Samples of lyophilized venom were provided by the Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda., diluted at 5 mg/ml in phosphate buffered saline (PBS) and stored at -20 °C.

2.2. Animals

Ten 20-week old laying hens of the lineage white leghorn (*Gallus gallus domesticus*) were used to produce the IgY. The hens came from poultry farms near Londrina, PR, Brazil. They were kept in individual cages at the Farming School of the Universidade Estadual de Londrina at room temperature and were given ad libitum access to water and laying feed.

Swiss albino mice with a mass between 18 and 22 g were used for venom toxicity and antivenin efficiency tests. They were kept in plastic cages with ad libitum access to food and water.

The animals were kept under strict ethical conditions, according to animal well-being guidelines. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Estadual de Londrina.

2.3. Hen immunization

Laying hens were divided into two groups (n=5), according to venom type. Each animal was inoculated intramuscularly at four points of the pectoral muscle.

One group of hens was inoculated with 800 µl of emulsion of Freund's Complete Adjuvant (FCA) (Sigma, St. Louis, USA) and 125 µg of bothropic venom diluted in PBS (pH 7.4). The other group was inoculated with 800 µl of FCA emulsion and 125 µg of crotalic venom diluted in PBS (pH 7.4).

On days 15, 30, 45, 90, 135, 180, 225, 270, 315 and 360 after the first immunization, reinforcement doses were administered and FCA was substituted with Freund's Incomplete Adjuvant (Sigma, St. Louis, USA).

Blood and eggs were collected the day before the first inoculation and on days 22, 37, 52, 97, 142, 187, 232, 277, 322 and 367 after the first immunization.

2.4. IgY Extraction and Quantification

An ammonium sulfate precipitation protocol, following the method of Nakita and Nakai (1992) with some modifications, was used to extract IgY antibodies. The collected yolks were separated from the whites and washed in distilled water. After the protective pellicle was removed, they were diluted with five parts of distilled water (pH 2.5) and incubated overnight at 4°C.

After incubation the solution was filtered with Whatman no. 1 filter paper at 4°C. Ammonium sulfate was added to the filtrate for a final concentration of 35%, which was then homogenized and incubated for 1 h at room temperature. After incubation the solution was centrifuged for 20 min at 1400 g. The precipitate was resuspended in 2 ml of distilled water and dialyzed against distilled water for 24 h, and against PBS, pH 7.4, for another 24 h at 4 °C. After the dialysis period, thimerosal (Synth, Diadema, SP, Brazil) was added at a concentration of 0.02% to the antibody in aqueous solution, which was aliquoted and stored at -20 °C.

The concentration of protein present in the aqueous solution extracted from the yolk was determined with the Bradford method (Bradford, 1976).

2.5. Determination of levels of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies

Indirect enzyme immunoassay (ELISA) was used to determine the levels of anti-bothropic and anti-crotalic antibodies present in the yolk serum from the eggs of immunized hens.

Incubation was carried out in 96-well flat-bottom polystyrene plates (Corning Costar Corporation, Acton, MA, USA). In order to sensitize the plates, 100 µl of carbonate-bicarbonate buffer (0.05 M pH 9.6) was added to each well, which contained 250 ng of crotalic venom or 500 ng of bothropic venom. The plates were incubated overnight at 4°C. After incubation three washes were performed, using 150 µl/well of PBS-Tween 20 at 0.05% pH 7.4 (PBST).

A 150 µl solution of PBS-5% skim milk was added to each well. The plate was incubated for 1h at 25°C and washed three times with PBST, as previously described.

Next, 100 µl samples of serum or yolk diluted 1:8000 in PBS-1% skim milk were added to each well. The plate was incubated for 1h at 25°C and washed three times with PBST. Positive controls using purified IgY solution and negative controls (PBS, pH 7.4) were carried out in parallel.

100 µl of rabbit anti-IgY immuglobin with peroxidase (Sigma, St. Louis, USA) diluted 1:40000 in PBS-1% skim milk were added to each well. After incubation for 1h at 25 °C, the plate was then washed three times with PBST and 100 µl of substrate prepared from a mix of 10 ml sodium acetate buffer (0.1M, pH 5.0) with 100 µl of hydrogen peroxide (F.Maia, Cotia, SP, Brazil) and 100 µl of tetramethylbenzidine solution (Sigma, St. Louis, USA) was added to each well. Incubation was carried out for 15 min at room temperature in the absence of light, and the reaction was

interrupted by adding 50 µl of IN sulfuric acid (Nuclear, Diadema, SP, Brazil) per well. The reading of absorbance/well was carried out in a spectrophotometer for microplates (Thermo Plate, TP-Reader, Rayto Life and Analytical Sciences Co. Ltd, Germany) with a 450 nm filter.

2.6. Determination of avidity of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies

The avidity of antibodies in the yolk and serum of the birds was determined by indirect competitive ELISA, following Bollen et al. (1996) with modifications.

The plate was sensitized as described in the previous section. After incubation with the samples of serum or yolk, 100 µl of 2 M magnesium chloride aqueous solution (Nuclear, Diadema, SP, Brazil) was added to each well and the plate was incubated for 30 min at 25 °C and washed three times. Then rabbit anti-IgY immunoglobin with peroxidase was added and the other steps followed the protocol described in the previous section. The avidity index of IgY antibodies was determined by the relation between the absorbancies obtained at 450 nm in the presence or absence of magnesium chloride 2 M.

2.7. Characterization of antigens recognized by anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies using Western blot

Venom samples were submitted to 15% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The antigens separated by electrophoresis were transferred to nitrocellulose membranes at 30 V and placed in a container (SCIE-PLAS, Holliston, MA, USA) overnight at 4 °C.

Nitrocellulose membranes were incubated for 5 min at room temperature with 0.1% Ponceau solution in 5% acetic acid and then washed 4 times in PBS (pH 7.4) for 5 min and incubated for 2 h in PBS-5% skim milk solution in an agitator at room temperature. Next the membranes were incubated with samples of anti-bothropic or anti-crotalic serum from immunized hens and hyperimmunized horses (Vencofarma, Londrina, PR, Brazil) as well as anti-bothropic and anti-crotalic IgY aqueous solution extracted from the yolks. The samples of serum and IgY aqueous solution were diluted 1:1000 in PBS-1% skim milk and the nitrocellulose membranes were incubated for 24 h in an agitator at room temperature. Afterwards, a PBS wash was carried out according to procedures described above, followed by incubation with rabbit anti-IgY (Sigma, St. Louis, USA) or anti-IgG (ZYMED, San Francisco, CA, USA) immunoglobin with peroxidase diluted to 1:5000 in PBS-1% skim milk for 2 h at room temperature in an agitator.

After the washes, the membranes were incubated for 30 min in an agitator in the absence of light with 15 ml of Tris buffer solution 0.05 M (pH 7.4) containing 10 mg of 3.3-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, USA) and hydrogen peroxide (F.Maia, Cotia, SP, Brazil) 3%. The membranes were washed several times in distilled water to block the reaction.

2.8. Determination of the lethal toxicity of venoms, neutralization efficiency and antivenin potency in mice

The lethal toxicity of each venom type was determined by calculating the lethal dose (LD_{50}). Serial dilution of each venom type was carried out in saline solution, totaling 0.5 ml, and then injected intraperitoneally in mice. For each dose of venom (five

doses) groups of 6 animals were used. A dose of venom that killed 50% of the animals (LD_{50}) 48 h after injection was determined by an analysis of the deaths.

The efficiency of neutralizing antibodies was evaluated according to the median effective dose (ED_{50}).

Each mouse was inoculated with a mixture of venom and IgY antivenin aqueous solution, totaling 0.5 ml/animal. The concentration of proteins in the IgY antivenin in aqueous solution was adjusted to mg/ml. Volumes equivalent to 3 LD_{50} and 4 LD_{50} were used for the bothropic and crotalic venoms, respectively. The solutions were prepared from mixtures of venom with increasing volumes of IgY aqueous solution extracted from egg yolks from the 232nd day after the first immunization. After being incubated in an agitator at 37°C for 30 min, the venom-antivenin mixtures were inoculated in 6 mice in a dilution of IgY aqueous solution.

ED_{50} was calculated based on the number of deaths determined by probit analysis of the first 48 hours after the injection of the venom-antivenin mixture. ED_{50} was expressed in microliters of IgY antivenin aqueous solution/mouse.

Based on the ED_{50} calculation, the potency of the IgY antivenin antibodies was determined, i.e., the quantity of venom neutralized per 1.0 ml of antivenin determined by probit analysis. The procedures for determining LD_{50} and ED_{50} were carried out according to World Health Organization recommendations (Chippaux, 2010).

2.9. Statistical analysis

The normality of the data distribution was verified using the Kolmogorov-Smirnov test. The results obtained in the ELISA analysis were compared with repeated-measures ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p<0.05$).

Probit analysis was carried out with AnalystSoft BioStat 2007.

3. Results

In order to determine the levels of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies produced after successive immunizations, serum and yolk samples obtained throughout the experiment were analyzed using indirect ELISA (Fig. 1A and 1B). Elevated levels of these antibodies were observed on the 37th day after the first immunization, reaching a maximum in subsequent immunizations and remaining at that level until the end of the experiment, which lasted 367 days. The production of IgY antivenins in response to both antigens in yolks presented similar kinetics to what was observed in the serum (Fig. 1C and 1D).

Serum samples obtained throughout the study were used to determine the avidity levels of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies. The anti-bothropic serum presented a significant increase in avidity beginning on the 142nd day (Fig. 2A), as did the anti-crotalic serum beginning on the 232nd day (Fig. 2B). The analysis revealed no differences in the results between the serum and the yolk.

Western blot analysis was carried out to determine which components of the venom were recognized by the anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies of the serum and yolks of immunized hens and to compare these recognition patterns to those presented by the anti-bothropic and anti-crotalic serum produced in horses. The immunoglobulins present in the serum of immunized hens recognized different fractions of antigens after successive immunizations (Fig. 3), and some components of the bothropic and crotalic venoms were recognized only after the seventh immunization (232nd day). Some components were never recognized.

Anti-bothropic antibodies extracted from yolks after the last immunization recognized the same antigens as the IgY antibodies from hen serum and the anti-bothropic IgG antibodies from horses (Fig. 3A). A similar pattern of antigen component recognition was observed when compared to anti-crotalic IgY antibodies from serum and yolk and anti-crotalic IgG antibodies from horse serum (Fig. 3B).

Tests to determine LD_{50} were carried out in order to determine the efficiency of the antivenin. The LD_{50} found was 44.47 µg for the bothropic venom and 0.68 µg for the crotalic venom.

The neutralization test was used to demonstrate the capacity of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies for neutralizing the lethal toxicity of each venom used as an antigen. Samples of IgY aqueous solution extracted from eggs on the 232^{nd} day after the first immunization were used. The concentration of proteins used in IgY aqueous solutions was adjusted to 15 mg/ml. The efficiency of anti-bothropic IgY antibodies, expressed in ED_{50}, was 290µl/3 LD_{50}, indicated the volume of aqueous solution of IgY antibodies necessary to neutralize the LD_{50} used. The potency of anti-bothropic IgY antibodies was 0.307mg/ml, representing the quantity of venom neutralized by 1ml of antivenin. The efficiency of anti-crotalic IgY antibodies was 246µl/4 LD_{50} and its potency was 0.829 mg/ml.

4. Discussion

Snakebite treatment involves the basic principle of neutralization mediated by antibodies (Lomonte et al., 2009). This widely pervasive therapeutic strategy reduces mortality and morbidity in ophidian accidents because the antibodies obtained

principally from the serum of immunized animals are capable of neutralizing the systemically-acting toxins present in the venom (Gutierrez et al., 2006, 2007).

Most snakebite deaths occur in tropical countries. Therefore, these countries require substantial stocks of appropriate antivenin. The procedures used for immunizing horses are long and complex, and the toxicity of the venom represents the main limitation of this methodology (Devi et al., 2002). The difficulties in producing antiserum with traditional methods has motivated the search for neutralizing agents to complement and perfect conventional serum therapy (Lomonte et al., 2009).

As an alternative to producing antivenin in mammals, the production of IgY antibodies from the egg yolks of immunized hens has been investigated in recent decades. Carroll et al. (1992) were pioneers in describing the production and *in vivo* neutralization capacity of IgY antibodies extracted from egg yolks of hens immunized with *Crotalus atrox* venom. Since then, several studies have suggested the use of IgY as a substitute for mammal IgG in ophidian accident treatment (Almeida et al., 1998, 2008; Paul et al., 2007; Meenatchisundaram et al., 2008a; 2008b; Araujo et al., 2010; Prabhu et al., 2010). The possibility of producing IgY antivenin from hens immunized with *Bothrops* genus venom is considered a promising approach, because no apparent macroscopic damage is caused to the animals during the experimental period. Furthermore, low doses of venom induce the production of high levels of antibothropic IgY, and the Purification process can be carried out in the same facilities used to prepare the horse serum (Araujo et al., 2010).

Most studies that have used snake venom as an antigen for producing antibodies in laying hens describe immunization protocols lasting less than 6 months. (Carroll et al., 1992; Almeida et al., 1998, 2008; Paul et al., 2007; Meenatchisundaram et al., 2008a; 2008b). In this study we describe for the first time the production profile and

characteristics of IgY antivenom antibodies developed in laying hens for a period of 360 days. The results of the present study show that high levels of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies could be observed soon after the second immunization, both in the serum and in the yolk, corroborating the description by Almeida et al. (1998) and Araujo et al. (2010), who used venoms from the same species. Furthermore, we observed that immunization every 45 days results in stable antibody levels, which allows a significant reduction in the number of immunizations compared to other studies (Araújo et al., 2010; Almeida et al., 2008; Meenatchisundaram et al., 2008). The reduction in the number of inoculations necessary for maintaining high levels of IgY antibodies could make the use of laying hens viable on an industrial scale.

Another important result observed in our study was that the avidity of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies produced in laying hens increases significantly after successive immunizations. This result was expected, because in birds and mammals there is a progressive increase of avidity concomitant with the time elapsed after several immunizations; low avidity antibodies are produced during initial stages of immune response and high avidity antibodies are produced subsequently (Inouye et al., 1984). Considering that a significant increase in the avidity of anti-bothropic IgY antibodies was observed on the 135th day after the first immunization and that anti-crotalic IgY presented significantly higher avidity after the 225th day, we suggest that in experimental protocols using shorter periods the results of neutralization could be compromised by the low avidity of the antibodies. Furthermore, as the avidity indexes increased we verified changes in the recognition of antigen components by IgY antibodies.

Ophidian venoms are complex mixtures of bioactive molecules that mainly consist of proteins, most of them toxins or toxic enzymes. They may also contain peptides, carbohydrates, lipids, biogenic amines and inorganic components. The proportion of these components varies in the venoms of different species, which explains the diversity of poisoning symptoms (Doley and Kini, 2009). The venom produced by snakes from the *Bothrops* genus present great variation in composition and toxin activity. Most proteins found in bothropic venom present a molecular weight from 64 to 14 kDa and proteolytic activity (Queiroz et al., 2008). In our experiment, the results from the comparison of immunogenic fractions of venom recognized by the anti-bothropic IgY of hens and by the horse antiserum indicated that venom proteins with a molecular mass of approximately 50 kDa and 25 kDa were identified as metalloproteases (Meier, 1986; Lopez-Lozano et al., 2002; Saldarriaga et al., 2003; Guercio et al., 2006; Correa-Netto et al., 2010). These enzymes are highly toxic and cause hemorrhages due to their interference in blood coagulation and the formation of hemostatic plugs, the degradation they cause in capillary basal lamina components and the cytoxicity they promote in endothelial cells (Kamiguti et al., 1991; Moreira et al., 1994; Matsui et al., 2000).

The venom of snakes from the *Crotalus* geuns is also composed of substances that cause different biological effects in different species (Georgieva et al., 2010). The main component found in this venom is crotoxin, a neurotoxin present in most south-American species, mainly consisting of phospholipase A2, a protein with enzymatic action that has a molecular mass of 14 kDa (Francischetti et al., 2000; Boldrini-Franca et al., 2010; Georgieva et al., 2010). The results of our Western blot analysis indicated that anti-crotalic IgY antibodies recognized the antigen fraction of crotalic venom with a molecular mass of approximately 14 kDa, which probably corresponds

to the crotoxin (Boldrini-FrancA et al., 2010). IgY antibodies could also recognize venom components with a molecular mass of approximately 30 kDa, which could correspond to the serine protease present in crotalic venom (Oliveira et al., 2009; Boldrini-Franca et al., 2010). Serine proteases are not lethal by themselves, but contribute to the venom's toxic effect by interfering in homeostasis since they alter platelet aggregation and cause fibrinolysis (Braud et al., 2000). Almeida et al. (1998) described that anti-crotalic IgY could recognize and precipitate elements from snake venom with specific biological activities such as phospholipase, neutralizing their biological effects even though the molecular mass of these components was not identified. In addition, low venom doses induced the production of high levels of antibodies in hens, contrary to what occurs in horses, considering that crotalic venom is considered a poor immunogenic when used to produce anti-ophidic serum in mammals (Clissa et al., 1999).

Because some toxic components of the venoms were recognized by anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies, *in vivo* tests were carried out to verify the protective effect of IgY antibodies. Efficiency and potency tests demonstrated the neutralizing action of IgY antibodies produced in hens that received the equivalent of 3 LD_{50} of bothropic venom and 4 LD_{50} of crotalic venom. Our data indicate that the anti-bothropic IgY antibodies produced after the immunization period presented superior efficiency and potency to that observed by other authors. Almeida et al. (1998) described the efficiency of anti-bothropic IgY antibodies in terms of effective dose (592.5 µl/2 LD_{50}) and potency of 0.067 mg/ml. Araújo et al (2010) reported an effective dose of 365µl/2 LD_{50} and a potency of 0.154 mg/ml for the anti-bothropic IgY antibodies produced. Similarly, our results regarding anti-crotalic IgY antibodies were higher than those described by Almeida et al. (1998), who reported values of

457.5 µ1/3 LD_{50} and 0.075 mg/ml for the effective dose and potency, respectively, for IgY antibodies produced from hen immunization using *C. Durissus terrificus* venom. The differences observed in the effective dose and potency of IgY antibodies obtained in our study are probably due to the increasing avidity observed throughout the immunization period. However, we cannot discard the possibility of differences in the antivenin concentration being the cause of differences in the effective dose and potency when compared to the antivenin obtained by the above-cited authors.

Therefore, we can conclude that the production of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies at elevated levels can be obtained with the administration of reinforcement doses of bothropic and crotalic venom every 45 days. Such an increase in the immunization period contributes significantly to increased avidity indexes and, consequently, to greater capacity for neutralizing the toxins in bothropic and crotalic venoms. This data may be important for perfecting the protocols for using laying hens as an economical and ethically viable source of polyclonal antibodies, which could result in complementary or even alternative methodologies to serum therapy, which is commonly used in the treatment of ophidian accidents.

References

Akita, E.M., Nakai, S., 1992. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. J Food Sci 57, 629-634.

Almeida, C.M., da Silva, C.L., Couto, H.P., Escocard Rde, C., da Rocha, D.G., Sentinelli Lde, P., Kipnis, T.L., da Silva, W.D., 2008. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. Toxicon 52, 293-301.

Almeida, C.M., Kanashiro, M.M., Rangel Filho, F.B., Mata, M.F., Kipnis, T.L., da

Silva, W.D., 1998. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. Vet Rec 143, 579-584.

Araujo, A.S., Lobato, Z.I., Chavez-Olortegui, C., Velarde, D.T., 2010. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. Toxicon 55, 739-744.

Bae, H.D., Kitaguchi, K., Horio, F., Murai, A., 2009. Higher incorporation of heterologous chicken immunoglobulin Y compared with homologous quail immunoglobulin Y into egg yolks of Japanese quail (Coturnix japonica). Poult Sci 88, 1703-1711.

Boldrini-Franca, J., Correa-Netto, C., Silva, M.M., Rodrigues, R.S., De La Torre, P., Perez, A., Soares, A.M., Zingali, R.B., Nogueira, R.A., Rodrigues, V.M., Sanz, L., Calvete, J.J., 2010. Snake venomics and antivenomics of Crotalus durissus subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. J Proteomics 73, 1758-1776.

Bollen, L.S., Crowley, A., Stodulski, G., Hau, J., 1996. 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. J Immunol Methods 191, 113-120.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.

Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. Biochimie 82, 851-859.

Brunda, G., Sashidhar, R.B., Sarin, R.K., 2006. Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (Naja naja naja) venom in

biological samples of forensic origin. Toxicon 48, 183-194.

Carlander, D., Stalberg, J., Larsson, A., 1999. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. Ups J Med Sci 104, 179-189.

Carroll, S.B., Thalley, B.S., Theakston, R.D., Laing, G., 1992. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. Toxicon 30, 1017-1025.

Chippaux, J.P., 2010. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Biol Aujourdhui 204, 87-91.

Clissa, P.B., do Nascimento, N., Rogero, J.R., 1999. Toxicity and immunogenicity of Crotalus durissus terrificus venom treated with different doses of gamma rays. Toxicon 37, 1131-1141.

Correa-Netto, C., Teixeira-Araujo, R., Aguiar, A.S., Melgarejo, A.R., De-Simone, S.G., Soares, M.R., Foguel, D., Zingali, R.B., 2010. Immunome and venome of Bothrops jararacussu: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. Toxicon 55, 1222-1235.

Devi, C.M., Bai, M.V., Lal, A.V., Umashankar, P.R., Krishnan, L.K., 2002. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. J Biochem Biophys Methods 51, 129-138.

Doley, R., Kini, R.M., 2009. Protein complexes in snake venom. Cell Mol Life Sci 66, 2851-2871.

Francischetti, I.M., Gombarovits, M.E., Valenzuela, J.G., Carlini, C.R., Guimaraes, J.A., 2000. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 127, 23-36.

Georgieva, D., Ohler, M., Seifert, J., von Bergen, M., Arni, R.K., Genov, N., Betzel,

C., 2010. Snake venomic of Crotalus durissus terrificus--correlation with pharmacological activities. J Proteome Res 9, 2302-2316.

Guercio, R.A., Shevchenko, A., Lopez-Lozano, J.L., Paba, J., Sousa, M.V., Ricart, C.A., 2006. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake Bothrops atrox. Proteome Sci 4, 11.

Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Leon, G., Rucavado, A., Chaves, F., Angulo, Y., 2007. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. Curr Pharm Des 13, 2935-2950.

Gutierrez, J.M., Theakston, R.D., Warrell, D.A., 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. PLoS Med 3, e150.

Inouye, S., Hasegawa, A., Matsuno, S., Katow, S., 1984. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. J Clin Microbiol 20, 525-529.

Kamiguti, A.S., Cardoso, J.L., Theakston, R.D., Sano-Martins, I.S., Hutton, R.A., Rugman, F.P., Warrell, D.A., Hay, C.R., 1991. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. Toxicon 29, 961-972.

Lomonte, B., Leon, G., Angulo, Y., Rucavado, A., Nunez, V., 2009. Neutralization of Bothrops asper venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. Toxicon 54, 1012-1028.

Lopez-Lozano, J.L., de Sousa, M.V., Ricart, C.A., Chavez-Olortegui, C., Flores Sanchez, E., Muniz, E.G., Buhrnheim, P.F., Morhy, L., 2002. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild Bothrops atrox specimens from Amazonian rain forest. Toxicon 40, 997-1006.

Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochim Biophys Acta 1477, 146-156.

Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Michael, A., Ramalingam, S., 2008a. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. Toxicon 52, 221-227.

Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Michael, A., Ramalingam, S., 2008b. Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. Int Immunopharmacol 8, 1067-1073.

Meier, J., 1986. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance Bothrops atrox. Toxicon 24, 41-46.

Mohammed, S.M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K.R., Wildeman, A.G., Bonselaar, J., Etches, R.J., 1998. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. Immunotechnology 4, 115-125.

Moreira, L., Borkow, G., Ovadia, M., Gutierrez, J.M., 1994. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from Bothrops asper (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. Toxicon 32, 976-987.

Morrison, S.L., Mohammed, M.S., Wims, L.A., Trinh, R., Etches, R., 2002. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. Mol Immunol 38, 619-625.

Oliveira, D.G., Murakami, M.T., Cintra, A.C., Franco, J.J., Sampaio, S.V., Arni, R.K., 2009. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of Crotalus durissus terrificus and Crotalus durissus collilineatus. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 41, 21-29.

Paul, K., Manjula, J., Deepa, E.P., Selvanayagam, Z.E., Ganesh, K.A., Subba Rao, P.V., 2007. Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. Toxicon 50, 893-900.

Pinho, F.M., Oliveira, E.S., Faleiros, F., 2004. Snakebites in the State of Goias, Brazil. Rev Assoc Med Bras 50, 93-96.

Prabhu, R.R., Ramamurty, N., Mathiyalagan, A., 2010. Extraction and characterization of polyclonal egg yolk antibodies (IgY) in chicken against cobra (Naja naja) venom. Curr Sci India 98, 237-239.

Queiroz, G.P., Pessoa, L.A., Portaro, F.C., Furtado Mde, F., Tambourgi, D.V., 2008. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. Toxicon 52, 842-851.

Saldarriaga, M.M., Otero, R., Nunez, V., Toro, M.F., Diaz, A., Gutierrez, J.M., 2003. Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia. Toxicon 42, 405-411.

Segura, A., Castillo, M.C., Nunez, V., Yarleque, A., Goncalves, L.R., Villalta, M., Bonilla, C., Herrera, M., Vargas, M., Fernandez, M., Yano, M.Y., Araujo, H.P., Boller, M.A., Leon, P., Tintaya, B., Sano-Martins, I.S., Gomez, A., Fernandez, G.P., Geoghegan, P., Higashi, H.G., Leon, G., Gutierrez, J.M., 2010. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. Toxicon 56, 980-989.

Theakston, R.D., Warrell, D.A., Griffiths, E., 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. Toxicon 41, 541-557.

Williams, D., Gutierrez, J.M., Harrison, R., Warrell, D.A., White, J., Winkel, K.D., Gopalakrishnakone, P., 2010. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for

snake bite. Lancet 375, 89-91.

Legends to figures

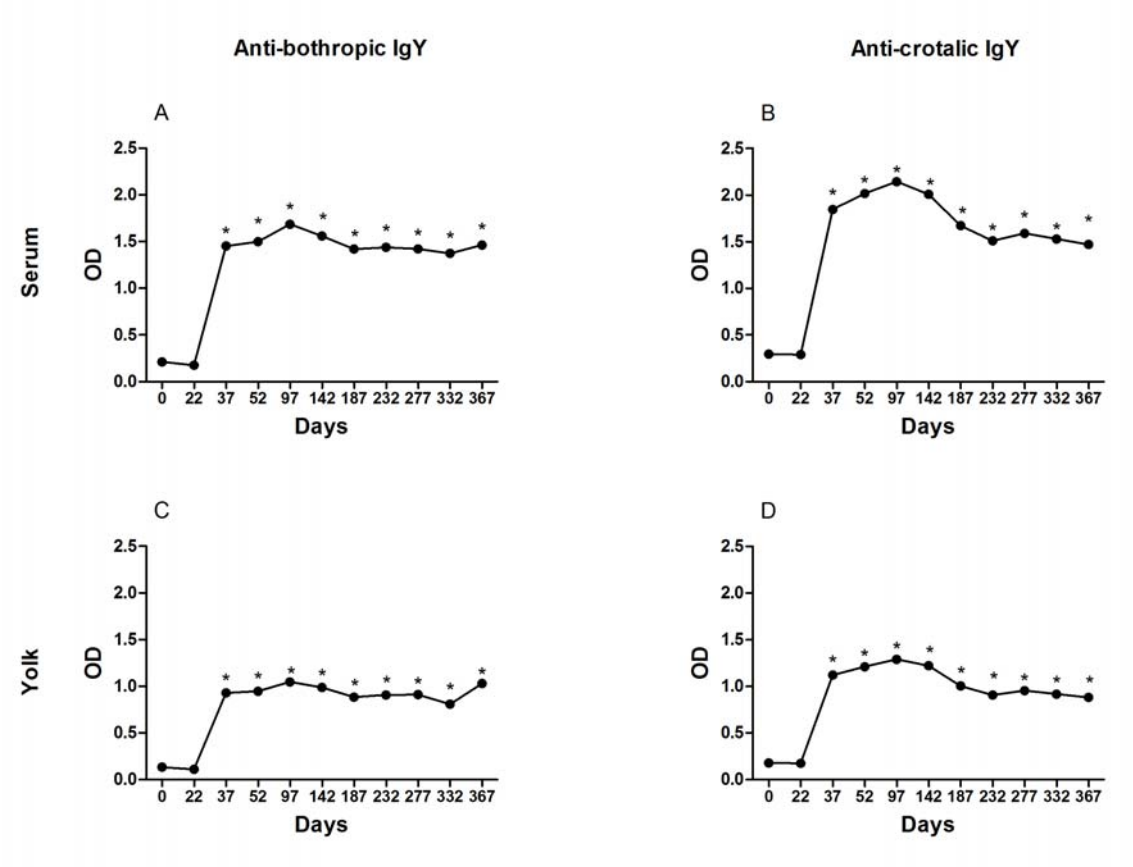


Fig. 1. Levels of anti-bothropic and anti-crotalic IgY immunoglobulin present in the serum (A and B) and in the yolk (C and D) of laying hens inoculated with 125 µg of crotalic venom and 125 µg of bothropic venom, respectively. OD: optical density at 450 nm. * Significant difference in the levels of antibodies compared to the previous period (p <0.05).

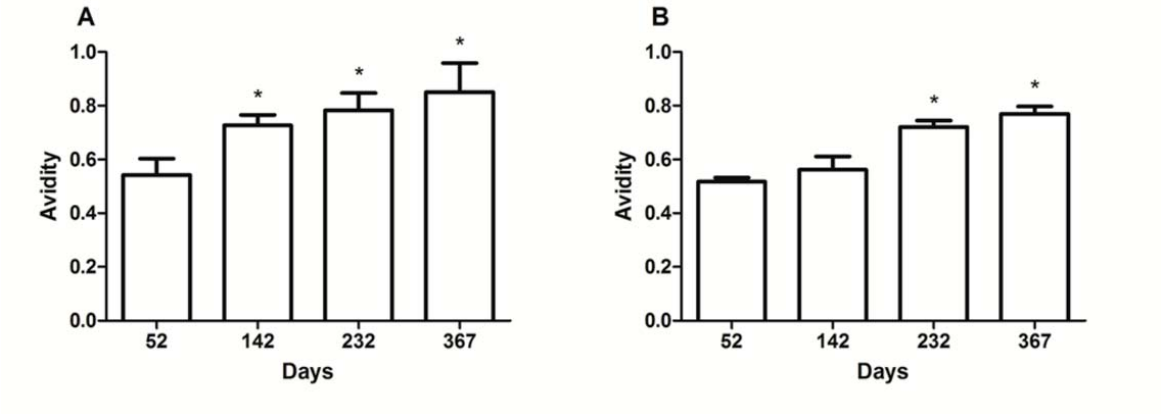


Fig. 2. Avidity indexes of anti-bothropic (A) and anti-crotalic (B) IgY immunoglobulin present in the serum of laying hens inoculated with 125 µg of bothropic venom and 125 µg of crotalic venom, respectively, verified throughout the experiment. * Significant difference compared to the 3rd immunization (52 days) (p<0.05).

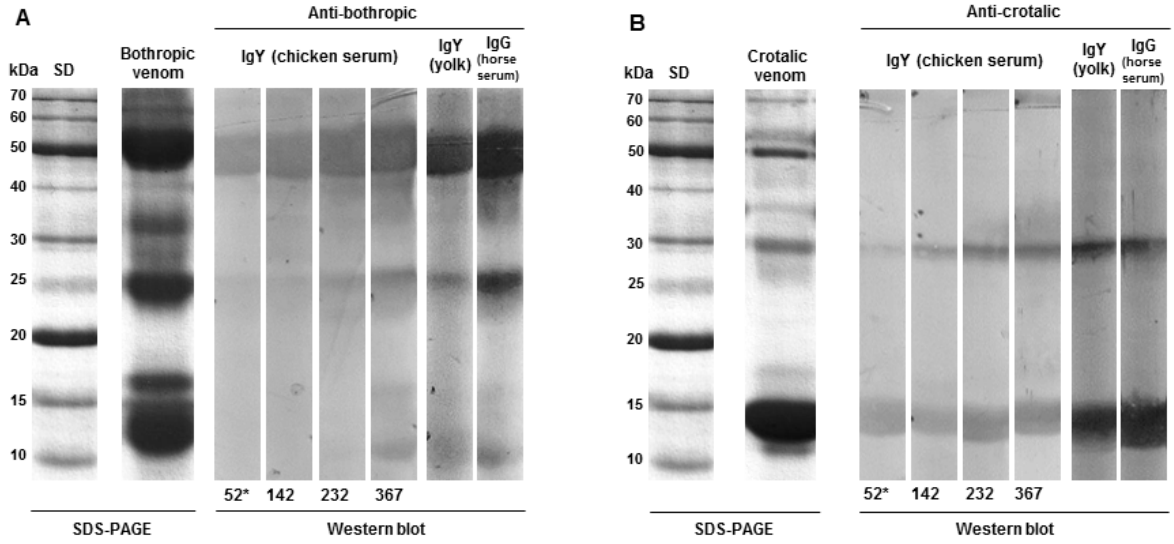


Fig. 3. Electrophoretic profile (SDS-PAGE 15%) of bothropic (A) and crotalic (B) venoms, and western blot analysis of components of the venoms recognized by IgY antibodies present in the serum and the aqueous solution extracted from the yolks of eggs of immunized laying hens laid on the 232nd day and by IgG present in the serum of immunized horses. *Days after the 1st immunization.