



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MICHELE PAGLIARI OLIVEIRA MONTINI

**EFEITO DA VIA DE INOCULAÇÃO E DA DOSE DO
ANTÍGENO PROTEÍCO (IgG HUMANA) NA PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS IgY EM GALINHAS DE LINHAGEM DE
POSTURA**

MICHELE PAGLIARI OLIVEIRA MONTINI

**EFEITO DA VIA DE INOCULAÇÃO E DA DOSE DO
ANTÍGENO PROTEÍCO (IgG HUMANA) NA PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS IgY EM GALINHAS DE LINHAGEM DE
POSTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2014

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

Montini, Michele Pagliari Oliveira.

Efeito da via de inoculação e da dose do antígeno proteico (IgG humana) na produção de anticorpos IgY em galinhas de linhagem de postura / Michele Pagliari Oliveira Montini. - Londrina, 2014.
50 f. : il.

Orientador: Emerson José Venancio.

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

Inclui bibliografia.

1. Imunização - Teses. 2. Imunodiagnóstico - Teses. 3. Gallus gallus - Teses. 4. aves - Teses. I. Venancio, Emerson José . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

MICHELE PAGLIARI OLIVEIRA MONTINI

**EFEITO DA VIA DE INOCULAÇÃO E DA DOSE DO ANTÍGENO
PROTEÍCO (IgG HUMANA) NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgY
EM GALINHAS DE LINHAGEM DE POSTURA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia Experimental, CCB- UEL, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr Wagner Loyola
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa Suínos e Aves

Profa Dra Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 31 de outubro de 2014

DEDICATÓRIA

A minha Família, em especial aos meus queridos pais e ao meu esposo Reinaldo, e a todos que não mediram esforços para me apoiar e encorajar, a vocês, meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado forças para perseverar nesta caminhada.

Ao meu orientador, Professor Dr. Emerson José Venancio, pela oportunidade dada e por toda sua dedicação e orientação no decorrer deste trabalho.

Ao professor Mario Augusto Ono e Dr. Wagner Loyola, por terem aceitado o convite de participar da banca examinadora da qualificação, e pela contribuição neste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório, Eduardo Vignoto Fernandes, Denise Turini Gonzales Marioto, Ana Carolina Navarro Ferraro, Mayara Alencar Almeida, Fabiano Cardoso da Silva e Sandmary Dechechi Chambó.

Especialmente as minhas queridas amigas Miriele Carolina da Silva, Ana Paula Cheirubim, e Karla Fernanda Ferraz, que com toda paciência e sabedoria me ouviram e aconselharam, e me acompanharam nesta jornada, vocês sempre terão um lugar especial em meu coração, e sempre levarei comigo um pouco de cada uma e de tudo que aprendi com vocês, MUITO OBRIGADA!

Ao Ruy Cezar Saviani por sempre me receber com um sorriso, pelas conversas amigas, conselhos e por ter me ensinado tantas coisas.

Aos outros colegas que conheci no mestrado, em especial Rafaela Macagnam, Isabele Kazahaya, Wellington Contiero, Fernando Pinheiro de Souza Neto, Rafael Carvalho de Freitas, por toda ajuda e compreensão de vocês, pela amizade, por tudo, muito Obrigada!

A todos que de alguma forma torceram e me ajudaram para a realização deste trabalho, mesmo que fosse com orações.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!

Não nos limitemos a amar somente aqueles que compartilham o nosso ideal. Amemos a todos. Nada do que é feito por amor é pequeno.

Chiara Lubich

Montini, Michele Pagliari Oliveira. **Efeito da via de inoculação e da dose do antígeno proteico (IgG humana) na produção de anticorpos IgY em galinhas de linhagem de postura**. 2014. 50f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, 2014.

RESUMO

Nos últimos anos diversos estudos têm investigado a utilização de anticorpos IgY de galinhas poedeiras em reações de imunodiagnóstico e na imunoterapia. Esse grande interesse é decorrente das vantagens dos anticorpos IgY em relação aos anticorpos produzidos em mamíferos como, por exemplo, a produção com métodos menos invasivos e de baixo custo. O objetivo desse estudo foi investigar o efeito da dose e da via de inoculação do antígeno sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY em galinhas de postura *Gallus gallus*. Para avaliar o efeito da dose de antígenos os animais foram inoculados com 2, 20 e 200 µg de IgG humana. Para avaliação do efeito da via de inoculação, os animais foram inoculados com 20 µg do antígeno pelas vias intramuscular (IM), intradérmica (ID) e subcutânea (SC). Os níveis e os índices de avidéz dos anticorpos séricos anti-IgG humana foram avaliados por ELISA indireto. Os resultados foram submetidos a análise estatística e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados obtidos mostram que há a produção de níveis significativos de anticorpos com qualquer uma das doses utilizadas. Contudo, há uma diferença significativa nos níveis de anticorpos produzidos entre as doses 2 e 200 µg, As diferentes doses do antígeno não resultam em diferenças significativas nos índices de avidéz. As vias ID e SC resultam em níveis de anticorpos significativos já após a 3ª imunização. Após a 5ª e 7ª imunizações todas as vias resultam em níveis significativos de anticorpos específicos. Não há influência da via de inoculação do antígeno sobre o índice de avidéz dos anticorpos. Por outro lado, o índice de avidéz é influenciado diretamente pelo número de inoculações. Estes resultados mostram que a produção de níveis significativos de anticorpos específicos contra antígenos purificados podem ser obtidos com doses tão baixas como 2 µg de modo independente da via e que o número de inoculações influencia diretamente no índice de avidéz dos anticorpos obtidos.

Palavras- Chave: Imunização. Imunodiagnóstico. *Gallus gallus*. Aves.

Montini, Michele Pagliari Oliveira. **Effect of inoculation route and dose of antigen in the production of IgY antibodies in laying hens**. 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, 2014.

ABSTRACT

In recent years several studies have investigated the use of IgY antibody responses of laying hens in immunodiagnostic and in immunotherapy. This is a result of great interest in the advantages with respect to antibodies IgY antibodies produced in mammals, for example, production with less invasive and inexpensive methods. The purpose of this study the effect of dose and route of inoculation of the antigen on the production and the avidity of IgY antibodies in laying hens was investigated. To assess the effect of antigen dose of animals were inoculated with 2, 20 and 200 µg of human IgG. To evaluate the effect of the route of inoculation, the animals inoculated with 20 µg form of the antigen by intramuscular (IM), intradermal (ID) and subcutaneous (SC). Levels and avidity indices of serum anti-human IgG were assessed by ELISA. The results were subjected to statistical analysis and p values < 0.05 were considered significant. The results show that there is production of significant levels of antibodies to any of the doses used. However, there is a significant difference in the levels of antibodies produced between 2 and 200 µg doses. Different doses of antigen did not result in significant differences in the avidity indices. ID and SC routes results in significant levels of antibodies already after the 3rd immunization . After the 5th and 7th immunization routes result in any significant level of specific antibodies. No influence of the route of inoculation of antigen on the antibody avidity index. Furthermore, the avidity index is directly influenced by the number of inoculations. These results show that the production of significant levels of specific antibodies against the purified antigens can be obtained with doses as low as 2 µg-independent pathway and the number of inoculations directly influence the level of antibody avidity obtained.

Key words: Immunization. Immunodiagnosics. Gallus gallus. Hens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Translocação dos anticorpos do sangue para o ovo	15
Figura 2 -	Diferenças estruturais entre a IgY de galinha e a IgG de coelho	17

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ARTIGO

Figura 1 -	Efeito da dose do antígeno sobre a produção de anticorpos IgY específicos	41
Figura 2 -	Influência da dose do antígeno sobre o índice de avidéz de anticorpos IgY específicos	41
Figura 3 -	Efeito da via de inoculação do antígeno sobre a produção de anticorpos IgY específicos	42
Figura 4 -	Influência da via de inoculação do antígeno sobre o índice de avidéz de anticorpos IgY específicos	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
CH	Constant domain of the Heavy chain (domínio constante da cadeia pesada)
CL	Constant domain of the Light chain (domínio constante da cadeia leve)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
Fab	Fragment antigen binding (Fragmento de ligação ao antígeno)
Fc	Fragmento cristalizável
HR	Hinge Region (Região de dobradiça)
ID	Via intradérmica
Ig	Imunoglobulina (s)
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
IM	Via Intramuscular
IV	Via intravenosa
kDa	Kilo Dalton
OD	Optical Density (Densidade óptica)
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampão fosfato salina)
SC	Via subcutânea
VH	Variable domain of the Heavy chain (domínio variável da cadeia pesada)
VL	Variable domain of the Light chain (domínio variável da cadeia leve)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	14
2.1	Características Estruturais da IgY X IgG de mamíferos	16
2.2	Produção de anticorpos em galinhas	17
2.3	Produção e Armazenamento de Anticorpos IgY	19
2.4	Propriedades biológicas do anticorpo IgY	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo Geral	21
3.2	Objetivos Específicos	21
4	RESULTADOS	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
5	CONCLUSÕES	43
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os anticorpos têm diversas aplicações na pesquisa básica e nas áreas de saúde humana e de animais. Na pesquisa básica os anticorpos são utilizados na caracterização e purificação de moléculas e células. Nas áreas da saúde, os anticorpos são muito utilizados para fins de diagnóstico - onde as reações de ELISA, Western-blot e a imunohistoquímica são usadas rotineiramente – e para fins do tratamento e prevenção de doenças infecciosas. Mais recentemente, com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais e anticorpos humanizados, os anticorpos têm sido utilizados no tratamento de pacientes com câncer e outras doenças crônicas.

A maioria dos anticorpos disponíveis comercialmente são produzidos em mamíferos e são purificados a partir do sangue destes animais, o que implica na adoção de procedimentos invasivos, muitas vezes com o sacrifício do animal. Além disso, a produção de anticorpos em mamíferos é trabalhosa e apresenta um baixo rendimento o que encarece o custo final dos anticorpos obtidos.

Dentro deste contexto, anticorpos da classe IgY, produzidos a partir de galinhas de postura, estão se tornando uma alternativa para a produção de anticorpos. Anticorpos IgY pertencem a uma das três classes de imunoglobulinas encontradas em aves, as outras classes são a IgM e a IgA. Os anticorpos IgY são transferidos da galinha para o ovo e conferem uma imunidade passiva para o embrião e para o animal recém-nascido. Estima-se que uma gema de ovo contenha entre 100 a 150 mg de IgY. Esses anticorpos são homólogos aos anticorpos da classe IgG de mamíferos. A molécula de IgY tem 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves e tem uma massa molecular de aproximadamente 180 kDa.

Diversos estudos tem mostrado a possibilidade da utilização de anticorpos IgY na imunoterapia de doença em humanos e animais como na fibrose cística por *Pseudomonas aeruginosa*, diarreia por rotavírus, gastrite por *Helicobacter pylori*, e cárie por *Streptococcus mutans*. Além disso, nos últimos anos diversas reações de imunodiagnóstico e imunodeteção baseadas em anticorpos IgY foram desenvolvidas contra *Schistosoma japonicum*, Síndrome Respiratória Aguda Severa,

e morfina. E ainda, na pesquisa básica é observado um crescente uso de anticorpos IgY para a caracterização de moléculas.

A utilização da gema do ovo de aves como fonte de anticorpos tem diversas vantagens com relação a obtenção em mamíferos. Uma das principais vantagens deste método é que não é invasivo, isto é, não existe a necessidade de sangrar o animal, com todos os riscos envolvidos neste procedimento, ou mesmo sacrificar o animal para a obtenção de grandes quantidades de anticorpos. Outras vantagens são o alto rendimento de anticorpos específicos; a maior imunogenicidade de antígenos de mamíferos quando inoculados em frangos; a fácil purificação dos anticorpos IgY a partir da gema de ovos. E ainda, os anticorpos têm várias propriedades biológicas interessantes para a imunoterapia e imunodiagnóstico como a não ativação do sistema complemento de mamíferos e a não interação com os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas presentes na superfície de células de mamíferos.

Apesar das diversas vantagens da utilização de anticorpos IgY, eles são pouco utilizados, provavelmente devido ao pequeno número de estudos sobre as suas propriedades físicas, químicas e biológicas da molécula de IgY. Uma importante propriedade dos anticorpos IgY a ser analisada é a avididade. Propriedade que é uma estimativa da força de ligação entre os anticorpos e seu antígeno correspondente e está diretamente relacionada às propriedades biológicas dos anticorpos. Em aves são poucos os estudos que avaliam a avididade dos anticorpos IgY.

Nesse trabalho investigamos os efeitos da dose e da via de inoculação do antígeno sobre a produção e a avididade de anticorpos IgY obtidos a partir da gema de ovos de galinhas poedeiras. Deste modo este estudo pode contribuir para o desenvolvimento da tecnologia IgY, já que esta é um potencial alvo de estudo, podendo ser futuramente, cada vez mais aplicada na imunoterapia, imunodiagnóstico, na prevenção e tratamento de doenças.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

Os anticorpos são proteínas séricas circulantes, produzidas pelos linfócitos B em resposta a exposição a substâncias denominadas de antígenos (Ag) (LEENAARS, M. e HENDRIKSEN, C. F.M. 2005). Os mamíferos têm cinco classes de imunoglobulinas (Ig), sendo elas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (LANNING, D.K., *et al.*, 2003; SUN, Y., *et al.*, 2013). A IgG é a classe de Ig mais abundante no soro. Ela tem a capacidade de neutralizar Ags toxinas, opsonizar agentes patogênicos e ativar o sistema complemento. A IgA é a classe de Ig predominante nas mucosas e secreções, fornecendo proteção contra patógenos externos incluindo aerossóis e Ags presentes na dieta. As classes IgM e IgD estão presentes na superfície das células B, onde atuam como receptor de Ag, sendo que os anticorpos IgM também são abundantes no soro, onde podem neutralizar os antígenos e atuar contra patógenos ativando o sistema complemento ou mesmo promovendo a sua aglutinação. Anticorpos da classe IgE são conhecidos pela capacidade de ligação aos antígenos desencadeando a liberação de histamina a partir de mastócitos e basófilos, o que resulta em uma resposta inflamatória, que em determinadas situações leva a uma reação alérgica (CHOI, J. W., *et al.*, 2010). As aves possuem apenas três classes de Ig, sendo elas IgY, IgM, e IgA (LESLIE, G.A. e MARTIN, L.N., 1973; CHOI, J.W. *et al.*, 2010). As classes IgM e IgA de aves são homólogas as Ig de mamíferos (CHOI, J. W., *et al.*, 2010), enquanto a IgY é funcionalmente equivalente a IgG e IgE de mamíferos, ou seja, a IgY combina as funções dessas Ig, pois ela não só fornece defesa contra infecções, como também pode mediar anafilaxia. Análises moleculares da IgY mostraram que ela é um ancestral evolutivo da IgG e IgE de mamíferos, porém há algumas diferenças em sua estrutura (WARR, G. W., *et al.*, 1995; SPILLNER, E., *et al.*, 2012). Das classes de Ig de aves a mais amplamente estudada para imunodiagnóstico é a IgY devido suas vantagens em relação aos anticorpos de mamíferos (KOVACS-NOLAN, J. e MINE, Y., 2012).

Os ovos de aves contêm todos os nutrientes e moléculas necessárias para o crescimento e desenvolvimento dos embriões, incluindo os anticorpos, desta forma, durante a formação do ovo a IgY é transportada do sangue da galinha para a gema do ovo, fornecendo assim imunidade passiva ao feto antes que este possa gerar sua própria resposta imune humoral (MORRISON, S. L., *et al.*, 2005). Esta passagem da

IgY do soro para o ovo leva aproximadamente 5 dias (MOHAMMED, S.M., *et al.*, 1998). Os anticorpos presentes na gema do ovo foram denominados de imunoglobulina Y (IgY) devido à nomenclatura derivada do inglês *Egg Yolk Immunoglobulin* (KOVACS-NOLAN, J. e MINE, Y., 2012). A IgY é transferida seletivamente do soro para a gema do ovo através de um receptor na superfície da membrana da gema específico para sua translocação (MORRISON, S.L., *et al.*, 2002; TESAR, D.B., *et al.*, 2008), posteriormente ela é transferida para o feto via circulação embrionária (KRAMER, T. T. e CHO, H. C., 1970; HAMAL, K. R., *et al.*, 2006) enquanto anticorpos da classe IgA e IgM são depositadas na clara do ovo (Figura 1) (ROSE, M.E., *et al.*, 1974).

O tempo de meia vida da IgY na circulação em uma galinha adulta é de 36 a 65 horas, sendo um tempo de meia vida muito curto se comparado com a IgG de ovelha que é de pelo menos de 15 dias e de humanos que é cerca de 21 a 23 dias (PATTERSON, R., *et al.*, 1962; WATSON, D.L. 1992; WOOLLEY, J.A. e LONDON, J., 1995; IMAI, K. e TAKAOKA, 2006; ABRAHAMIAN, F, *et al.*, 2009).

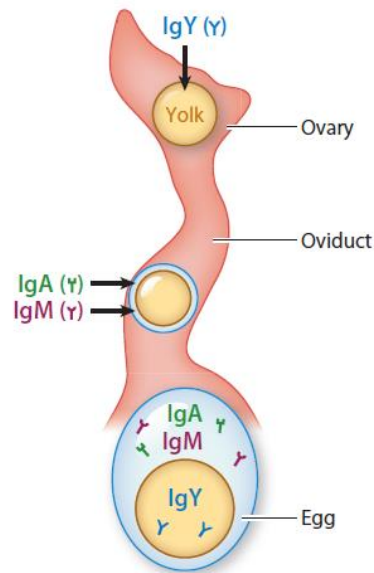


Figura 1: Translocação dos anticorpos do sangue para o ovo. Durante a formação do ovo a IgY, é transferida do sangue para a gema do ovo, por meio de receptores específicos para translocação de IgY. IgA e IgM são posteriormente depositados na clara de ovo no oviduto. Fonte: KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y., 2012.

2.1 Características Estruturais da IgY X IgG de mamíferos.

A IgY apresenta uma massa molecular de aproximadamente 180 kDa, enquanto a IgG de mamíferos tem massa molecular em torno de 150 kDa. A IgY é composta por duas cadeias pesadas (H, do inglês *Heavy*) com cerca de 65 a 70 kDa cada e duas cadeias leves (L, do inglês *Light*), que tem de 19 a 21 kDa. , Por outro lado, a cadeia pesada de mamíferos é de aproximadamente 50 kDa, as cadeias leves possuem de 22 a 23 kDa. As cadeias leves e pesadas das Igs são mantidas unidas por pontes dissulfeto. A cadeia leve de ambos os anticorpos é constituída de um domínio variável (VL - *variable domain of the chain*) e um domínio constante (CL- *constant domain of the light chain*). Já cadeia pesada da IgY consiste de um domínio variável (VH - *variable domain of the heavy chain*) e quatro domínios constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4 - *constant domain of the heavy chain*), diferente da IgG, a qual tem apenas três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). Outra diferença, é que a IgY tem uma região de dobradiça mais curta e menos flexível quando comparada com mesma região da IgG, (SHIMIZU, M., 1992; HATTA, H., *et al.*, 1993; WARR, G. W., *et al.*, 1995 SUN, S., *et al.*, 2001, NARAT, M., *et al.*, 2003) estas diferenças estruturais características entre a IgY e a IgG, podem ser melhores observadas na *figura 2*. Outra diferença entre a IgY e a IgG é que a primeira apresenta a porção Fc do anticorpo mais hidrofóbica que a segunda isso ocorre em resposta ao ambiente rico em lipídeos na gema do ovo (DÁVALOS- PANTOJA, L., *et al.*, 2001). Além dessas diferenças, a estrutura da IgY é estável em um pH de 4 a 11 à temperatura entre 60 e 65 °C com uma perda mínima de sua atividade, no entanto quando aquecida por 15 minutos até 70 °C sua atividade é reduzida sensivelmente (KOVACS-NOLAN, J. e MINE, Y., 2012), enquanto a IgG é estável em pH de 3 a 10 em uma temperatura inferior a 70°C (SHIMIZU, M., *et al.*, 1992; HATTA, T., *et al.*, 1993; ZHANG, W-W, 2003).

Nos últimos anos diversos estudos têm mostrado a possibilidade da utilização de anticorpos IgY na imunoterapia humana e veterinária, como na fibrose cística por *Pseudomonas aeruginosa* (CARLANDER, D., *et al.*, 2000; NILSSON, E., *et al.*, 2008), diarreia por rotavírus (SARKER, S.A., *et al.*, 2001), gastrite por *Helicobacter pylori* (SHIN, J-H., *et al.*, 2002), cárie por *Streptococcus mutans* (SMITH, D.J., *et al.*, 2001), diarreia epidêmica em suínos (KWEON, C.H., *et al.*, 2000), parvovirose canina (NGUYEN, S.V., *et al.*, 2006), rotavírus bovino (VEGA, C., *et al.*, 2011), e infecção por *Escherichia coli* (LI, X.Y., *et al.*, 2009; MAHADAVI, A.H. *et al.*, 2010; WANG, Q., *et al.*, 2010).

Mais recentemente, os anticorpos IgY têm sido estudados como um possível substituto de moléculas antimicrobianas usadas como fatores de crescimento na produção animal. Os antimicrobianos foram utilizados na produção animal por mais de 50 anos em doses subterapêuticas para promoção e crescimento animal, doses profiláticas para a prevenção de doenças e para o tratamento de infecções (TURNER, J.L., *et al.*, 2001). Anos de pesquisa e experiência prática tem demonstrado que o uso de antibióticos melhora significativamente o desempenho e estado de saúde animal, no entanto o uso contínuo e abusivo de antibióticos na alimentação levou a problemas de resíduos em animais e produtos, selecionando cepas bacterianas resistentes (XU, Y., *et al.*, 2010; THACKER, P.A., *et al.*, 2013), como resultado o uso de antibióticos em doses subterapêuticas foi proibido em países Europeus desde 1 de janeiro de 2006 (KIM, D.P., *et al.*, 2013). Sendo assim são urgentes alternativas ao uso de antibióticos (XU, Y., 2010), desta forma a IgY vem sendo utilizada como aditivo na alimentação, pois a IgY tem estabilidade relativamente elevada em diferentes condições como: altas temperaturas, pressão, diferentes pH (alcalinidade e acidez), na presença de enzimas proteolíticas como a tripsina e a quimiotripsina, além da sua atividade de inibição de crescimento de antígenos bacterianos, sendo assim a IgY é um prático complemento alimentar (SUNWOO, H.H., *et al.*, 2002; SUI, J., *et al.*, 2011).

A produção de IgY vem sendo amplamente estudada para diversas áreas da saúde humana e de animais, tais como imunoterapia e imunodiagnóstico devido as várias vantagens da obtenção de anticorpos da gema de ovo com relação à obtenção de anticorpos em mamíferos (TINI, M., *et al.*, 2002; DIAS DA SILVA, W., e TAMBOURGI, D.V., 2010). Uma das principais vantagens é que a produção de

anticorpos da gema do ovo é um método não invasivo, ou seja, não há a necessidade de sangrar o animal, evitando assim todos os riscos envolvidos neste procedimento, além disso não é necessário a eutanásia do animal para a obtenção de grandes quantidades de anticorpos (DIAS DA SILVA, W. e TAMBOURGI, D.V., 2010). Outras vantagens da produção da IgY são: o alto rendimento de anticorpos específicos (PAULY, D.; *et al.*, 2009); a maior imunogenicidade de antígenos de mamíferos quando inoculados em frangos, devido à distância filogenética (GASSMANN, M.; *et al.*, 1990), a fácil purificação dos anticorpos IgY a partir da gema de ovos (DE MEULENAER, B.; *et al.*, 2001), além de reduzir o número de animais usados para produção de anticorpos e realização de estudos, já que estes são produzidos em maior escala (HAU, J., e HENDRIKSEN, C.F.M., 2005). Uma galinha adulta tem 5 a 7 mg/mL de IgY no soro aproximadamente, em um mês uma galinha de alta postura consegue produzir cerca de 20 ovos, o que corresponde a cerca de 2 g de IgY por mês, o que é equivalente a 300mL de soro ou a 600mL de sangue total, tais quantidades de sangue só podem ser obtidas de mamíferos grandes (SHIMITZU, M., *et al.*, 1994; DIAS DA SILVA, W., e TAMBOURGI, D.V., 2010; MICHAEL, S., *et al.*, 2010)

2.3 Produção e Armazenamento de Anticorpos IgY

O resultado da quantidade de IgY produzida a partir de imunizações são um tanto imprevisíveis, pois depende de vários fatores. Estudos tem encontrado um rendimento de 60 a 150 mg por ovo. Há pelo menos quatro variáveis que influenciam a produção de anticorpos sendo elas: o antígeno (peso molecular e a concentração); adjuvante utilizado; a via de inoculação do antígeno e fatores individuais do animal como idade, raça, e linhagem (SCHADE, R., *et al.*, 2005; COOK M.E. e TROTT D.L., 2010). Uma galinha pode botar aproximadamente 325 ovos por ano, podendo resultar cerca de 20a 40g de IgY por ano (PAULY, D., *et al.*, 2009), dos quais 2% à 10% é específico para o antígeno (SCHADE R., *et al.* 1996, TINI, M., *et al.* 2002).

O armazenamento da IgY pode ser afeito 4°C por um período de meses a alguns anos, desde que seja adicionado um conservante como azida sódica, timerosal ou gentamicina. Quando conservada a -70°C é observado uma perda de sua atividade de 50%, sendo melhor mantê-la armazenada a -20°C. Para evitar os

efeitos de congelamento e descongelamento repetitivo da IgY, pode ser adicionado de 10% à 50% de glicerol (SCHADE, R. *et al.*, 2005).

2.4 Propriedades biológicas do anticorpo IgY

Esses anticorpos ainda tem várias propriedades biológicas importantes para a imunoterapia e imunodiagnóstico como: a não ativação do sistema complemento de mamíferos (LARSSON, A.; *et al.*, 1992); a não interação com os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas presentes na superfície de células de mamíferos (SCHIMIDT, P. *et al.*, 1993); e a não interação com fatores reumatoides (autoanticorpos geralmente da classe IgM, que se ligam na porção Fc de outros Ac, presentes em cerca de 80% dos indivíduos com artrite reumatóide) (KUMAR, V., *et al.*, 2010).

Uma das principais propriedades dos anticorpos é a afinidade. A afinidade de um anticorpo, é a força de ligação do anticorpo com o antígeno com um único sítio de ligação (MURPHY, K., *et al.*, 2010; CHAN, T. D. e BRINK, R., 2012). A afinidade apresenta uma evolução característica que depende da maturação da resposta imune (EINSEN, H. N. e SISKIND, G. W., 1964). Os linfócitos B produtores de anticorpos de maior afinidade têm preferência na ligação aos antígenos e devido a um processo de seleção altamente regulado e que ocorre no centro germinativo, onde as células B produtoras de anticorpos de maior afinidade passam a ser os clones dominantes a cada exposição subsequente ao antígeno. Este processo, denominado de maturação de afinidade, aumenta a afinidade de ligação média dos anticorpos durante a evolução da resposta imune humoral (ABBAS, ABUL, K., *et al.*, 2011; CHAN, T. D. e BRINK, R., 2012). O termo avidéz é usado para explicar a força total de interação em que o anticorpo se liga ao antígeno com mais de um sítio de ligação, sendo assim, esta força de ligação é maior que a afinidade (MURPHY, K., *et al.*, 2010; CHAN, T. D., e BRINK, R., 2012). A avidéz, pode ser determinada quimicamente e estudos tem mostrado que anticorpos de alta avidéz são mantidos ao longo da vida do indivíduo (MACRE, M. S., 2002; SOUZA, V. A. U. F., *et al.*, 1997).

Diversos estudos sugerem que a produção de anticorpos em galinhas poedeiras é a melhor opção para produção de anticorpos policlonais de alta

afinidade e alta avidéz (GASSMANN, M., *et al.*, 1990; ROSOL, T.J., *et al.*, 1993; WOOLLEY, J.A. e LONDON, J., 1995).

Na tentativa de melhorar a produção de IgY, vários estudos investigando a via de imunização do antígeno, adjuvante de vacina, e do tipo de antígeno têm sido feitos (CHANG, H.M., *et al.*, 1999; ERHARD, M. H., *et al.*, 2000; LEVESQUE S., *et al.* 2007). Secundo Schade, R. e colaboradores, 2005, para cada antígeno, a dose ótima necessária para uma imunização bem sucedida tem que ser testado experimentalmente. Porém na maioria dos estudos são utilizadas doses de 50 a 200 µg/animal.

Este trabalho teve como principal objetivo investigar o efeito da utilização de diferentes doses e vias de inoculação do antígeno sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY em galinhas poedeiras. Deste modo este estudo pode contribuir para o desenvolvimento da tecnologia IgY, já que esta é um potencial alvo de estudo, podendo ser futuramente, cada vez mais aplicada na imunoterapia, imunodiagnóstico, na prevenção e tratamento de doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da via e da dose de inoculação do antígeno sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY em galinhas poedeiras.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar o efeito da via de inoculação de IgG humana sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY.
- Comparar o efeito da dose do antígeno IgG humana sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY.

4. RESULTADOS

ARTIGO 1

EFEITO DA VIA DE INOCULAÇÃO E DA DOSE DE ANTÍGENO PROTEICO (IgG HUMANA) NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgY EM GALINHAS POEDEIRAS

Michele Pagliari Oliveira Montini^A, Miriele Caroline Caroline da Silva^A, Ana Paula Cheirubim^A, Emerson José Venancio^{B*}

^A Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, ^BDepartamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina

Endereço de e-mail

emersonj@uel.br

Autor correspondente E J Venancio *, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, CEP 86.057-970, Londrina, Brasil

Resumo

Nos últimos anos diversos estudos têm investigado a utilização de anticorpos IgY de galinhas poedeiras em reações de imunodiagnóstico e na imunoterapia. Esse grande interesse é decorrente das vantagens dos anticorpos IgY em relação aos anticorpos produzidos em mamíferos como, por exemplo, a produção com métodos menos invasivos e de baixo custo. O objetivo desse estudo foi investigar o efeito da dose e da via de inoculação do antígeno sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY em galinhas poedeiras. Para avaliar o efeito da dose de antígenos os animais foram inoculados com 2, 20 e 200 µg de IgG humana. Para avaliação do efeito da via de inoculação, os animais foram inoculados com 20 µg do antígeno pelas vias intramuscular (IM), intradérmica (ID) e subcutânea (SC). Os níveis e os índices de avidéz dos anticorpos séricos anti-IgG humana foram avaliados por ELISA indireto. Os resultados foram submetidos a análise estatística e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados obtidos mostram que há a produção de níveis significativos de anticorpos com qualquer uma das doses utilizadas. Contudo, há uma diferença significativa nos níveis de anticorpos produzidos entre as doses 2 e 200 µg. As diferentes doses do antígeno não resultam em diferenças significativas nos índices de avidéz. As vias ID e SC resultam em níveis de anticorpos significativos já após a 3^a inoculação. Após a 5^a e 7^a inoculações todas as vias resultam em níveis significativos de anticorpos específicos. Não há influência da via de inoculação do antígeno sobre o índice de avidéz dos anticorpos. Por outro lado, o índice de avidéz é influenciado diretamente pelo número de inoculações. Estes resultados mostram que a produção de níveis significativos de anticorpos específicos contra antígenos purificados podem ser obtidos com doses tão baixas como 2 µg de modo independente da via e que o número de inoculações influencia diretamente no índice de avidéz dos anticorpos obtidos.

Introdução

Os anticorpos são glicoproteínas séricas circulantes, produzidas por linfócitos B, que possuem a propriedade de ligar-se especificamente a estruturas denominadas de antígenos (Ag), inativando-as. Os mamíferos apresentam cinco classes de anticorpos, IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Em aves são encontradas três IgY, IgM e IgA. A IgY é capaz de reconhecer especificamente agentes patogênicos levando a ativação do sistema complemento e consequentemente a morte ou a opsonização do patógeno. A IgY das aves é a única classe encontrada na gema do ovo e fornece ao feto imunidade passiva antes que o mesmo seja capaz de gerar sua própria resposta imune humoral. Estima-se que uma gema de ovo contenha entre 100 a 150 mg de IgY (Zhang 2003). Além disso, este anticorpo é homólogo a IgG de mamíferos, possuindo apenas diferenças estruturais.

A IgY é constituída por duas cadeias pesadas (67-70 kDa cada) e duas cadeias leves (19-21 kDa cada), ligadas por uma ponte dissulfeto, e detém uma massa molecular de aproximadamente 180 kDa, diferentemente da IgG que tem uma massa molecular em torno de 150 kDa. A cadeia leve de ambos anticorpos é composta por um domínio variável e um constante. A cadeia pesada da IgY é formada por um domínio variável e quatro constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4), enquanto que a IgG possui apenas três domínios constantes.

Nos últimos anos estudos têm mostrado a viabilidade da aplicação de anticorpos IgY na imunoterapia humana e veterinária, como na fibrose cística por *Pseudomonas aeruginosa* (Nilsson *et al.*, 2008), diarreia por rotavírus (Sarker *et al.*, 2001), gastrite por *Helicobacter pylori* (Suzuki *et al.*, 2004, Nomura *et al.*, 2005), cárie por *Streptococcus mutans* (Smith *et al.*, 2001), diarreia epidêmica em suínos (Kweon *et al.*, 2000) e parvovirose canina (van Nguyen *et al.*, 2006). Desde a descoberta da IgY, a produção desta vem sendo amplamente utilizada para diversas áreas da medicina, tais como imunoterapia e imunodiagnóstico devido a diversas vantagens da obtenção de anticorpos da gema de ovo com relação à obtenção de

anticorpos em mamíferos (Tini *et al.*, 2002; Dias da Silva & Tambourgi 2010). Uma das principais vantagens propiciadas por este método é o fato do mesmo não ser invasivo, não necessitando sangrar o animal ou realizar eutanásia para a obtenção de grandes quantidades de anticorpos. Outras vantagens são o alto rendimento de anticorpos específicos (Pauly *et al.*, 2010); a maior imunogenicidade de antígenos de mamíferos quando inoculados em frangos, devido à distância filogenética (Gassmann *et al.*, 1990); a fácil purificação dos anticorpos IgY a partir da gema de ovos (de Meulenaer *et al.*, 2001) e a redução do número de animais usados para produção de anticorpos e realização de estudos, já que estes são produzidos em maior escala (Hau & Hendriksen, 2005).

Além disso, esses anticorpos ainda têm várias propriedades biológicas interessantes para a imunoterapia e imunodiagnóstico como a não ativação do sistema complemento de mamíferos (Larsson *et al.*, 1992), a não interação com os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas presentes na superfície de células de mamíferos (Schimidt *et al.*, 1993) e não interagem com fatores reumatóides (Kumar *et al.*, 2010); evitando, assim, reações de ELISA com resultados falso-positivos.

Um caráter importante de ser avaliado das imunoglobulinas IgY é a avidéz, ou seja, a estimativa da força total de ligação entre um anticorpo e seu antígeno específico. Diversos estudos têm demonstrado que a produção de anticorpos em galinha poedeira é a melhor escolha para produção de anticorpos policlonais de alta afinidade e alta avidéz (Gassmann *et al.*, 1990; Rosol *et al.*, 1993; Wooley e Landon 1995).

Material e métodos

Animais

Foram utilizadas galinhas *Gallus gallus* da linhagem *White leghorn* provenientes da Granja da Fazenda escola da Universidade Estadual de Londrina-PR. Esses animais foram mantidos nos galpões da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, em gaiolas, à temperatura ambiente, recebendo água potável e ração de postura à vontade.

Procedimento Experimental

1. Efeito da dose do Antígeno sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY

Para avaliar o efeito da dose do antígeno sobre a produção e avidéz de anticorpos IgY vinte e quatro animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos. Os animais do Grupo Controle (GC, n=6) foram inoculados por via intramuscular (IM) com Tampão fosfato salina PBS 1x pH 7,4 (PBS) em hidróxido de alumínio (HA). Os grupos restantes foram inoculados com IgG humana (Sigma®, lote: 20H8990) em HA pela via IM nas seguintes concentrações: 2µg/animal (Grupo 2µg, n=6), 20µg/animal (Grupo 20µg, n=6) e 200µg/animal (Grupo 200µg, n=6). Todas as inoculações foram feitas volume de 200µL por animal, sendo 100µL de cada lado do musculo peitoral. As demais inoculações foram feitas nos dias 15, 30, 60, 105, 150 e 195 após a primeira inoculação. Antes da primeira inoculação e 7 dias após cada inoculação foram feitas coletas de sangue periférico para obtenção de soro. As amostras de soro foram armazenadas à -20°C até o momento do uso.

2. Efeito da via de inoculação sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY

Para a análise do efeito da via de inoculação sobre a produção e a avidéz de anticorpos IgY vinte e quatro animais forma aleatoriamente divididos em 4 grupos. Os animais do grupo 1, denominado de Grupo Controle (GC) (n=6), foram inoculados por via intramuscular apenas

com PBS em hidróxido de alumínio. Os grupos restantes foram inoculados com 20µg/animal de IgG humana (Sigma®, lote: 20H8990) em hidróxido de alumínio por via intramuscular (IM) (Grupo 2, n=6), via intradérmica (ID) (Grupo 3, n=6) e via subcutânea (SC) (Grupo 4, n=6). As demais inoculações foram feitas nos dias 15, 30, 60, 105, 150 e 195 após a primeira inoculação. Todas as inoculações foram feitas volume de 200µL por animal. Antes da primeira inoculação e 7 dias após cada inoculação foram feitas coletas de sangue periférico da asa, para obtenção de soro. As amostras de soro foram armazenadas à -20°C até o momento do uso.

Análise da produção e avidéz de anticorpos em galinhas poedeiras

Para a determinação do nível de produção de anticorpos IgY anti- IgG humana, inicialmente placas de poliestireno, Costar®, fundo chato, foram sensibilizadas com uma solução de tampão carbonato- bicarbonato de sódio com pH= 9,6 e antígeno (IgG humana) na concentração de 1,25µg/mL, a placa foi incubada em overnight à 4 °C. A seguir todos os procedimentos foram feitos no equipamento automático para imunoenaios ALISEI (Radim Diagnostics, Pomezia, Itália). As placas foram lavadas 2 vezes com PBS 1X, e bloqueadas com PBS leite 5% por 2 horas à 37 °C. Logo após seguiu-se o procedimento de 3X lavagem com PBS-Tween 20 à 0,05% sendo 200µL/poço. Na sequência foi adicionado a amostra de soro de galinha (100 µL/poço, 1:1000) e a placa foi incubada por 1 hora à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente como descrito anteriormente, e foi adicionado 100µL/poço de anti-IgG-Fc de galinha peroxidase (Bethyl®, lote: A30-104P-28) na concentração de 1: 40.000, seguido de incubação por 1 hora à 37 °C. Após lavagens com PBS-Tween 20 à 0,05 % foi adicionado o substrato/cromógeno (H₂O₂/TMBZ) seguido de incubação à 37 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida com H₂SO₄ a 2N e a densidade óptica foi medida a 450nm.

Para a estimativa da avidéz dos anticorpos IgY anti- IgG humana, placas de poliestireno Costar®, fundo chato, foram sensibilizadas com uma solução de antígeno (IgG humana) na concentração de 1,25µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato com pH=9,6 e incubadas *overnight* à 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas 2 vezes com PBS 1X, e bloqueadas com PBS leite 5% por 2 horas à 37 °C. As placas foram então lavadas 3X com PBS-Tween 20 à 0,05% A seguir, para cada amostra de soro analisada, 4 poços receberam 100 µL da respectiva amostra do soro (100 µL/poço, 1:1000). A placa foi incubada por 1 hora a TA. Após 3 lavagens com PBS 1X, dos quatro poços, dois poços receberam 100 µL/poço de MgCl₂ 2M (Biotec®, Lote: 35329) e dois receberam 100 µL/poço de solução salina, a partir disso o procedimento seguiu como descrito anteriormente. Avidéz foi determinada pela relação entre a absorbância da amostra testada com agente caotrópico e o controle.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos estudos mostram que a magnitude da resposta imune humoral depende da dose do imunógeno administrada (van der Zijpp 1983, Marsh 1983). A maioria dos estudos sobre a produção de anticorpos IgY utilizam doses entre 50 a 200 μg do antígeno em cada imunização pela via IM para induzir produção de anticorpos IgY (Carmenish *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 1999; Erhard *et al.*, 2000; Guang-ping *et al.*, 2005, Murphy *et al.*, 2010).

Nesse trabalho foram utilizadas as doses de 2, 20 e 200 μg de IgG humana para investigar o efeito da dose do antígeno sobre a produção de anticorpos IgY. A análise dos níveis de anticorpos específicos produzidos mostrou que após a 3^a inoculação do antígeno níveis significativos de anticorpos específicos são obtidos com as doses de 20 e 200 μg do antígeno, mas não com a dose de 2 μg (Figura 1). Por outro lado, todas as doses utilizadas resultam em níveis significativos de anticorpos após a 5^a dose do antígeno (Figura 1). E ainda mais, os resultados obtidos mostram que há uma diferença significativa entre os níveis de anticorpos específicos produzidos após a 3^a e 7^o das doses de 2 e 200 μg do antígeno (Figura 1).

Estes resultados estão de acordo com trabalho realizado por Erhard *et al.*, 2000, que compararam o efeito de diferentes doses inoculando diferentes antígenos pela via IM sobre a produção de anticorpos IgY extraídos da gema do ovo da linhagem Lohmann-White-LSL. Os resultados obtidos pelos autores mostram doses variando de 0, 5 μg a 1000 μg podem levar a produção de níveis de anticorpos significativos dependendo do tipo de antígeno utilizado, do tipo de adjuvante e também da via de inoculação.

Em nosso estudo também investigamos o possível efeito da dose do antígeno sobre o índice de avides dos anticorpos IgY. Com relação a avides, foi observado que não há uma diferença significativa na avides devido a inoculação de diferentes doses de antígeno (Figura 2). Por outro lado, os resultados obtidos mostram que há um aumento significativo da avides dos anticorpos IgY obtidos entre a 5^a e a 7^a dose do antígeno quando os animais foram inoculados

com 2 μ g do antígeno (Figura 2). Existem poucos estudos sobre a avidéz de anticorpos IgY. Um aumento da avidéz de anticorpos IgY produzidos contra antígenos específicos foi observado em diferentes estudos apenas após múltiplas doses do antígeno (Bollen *et al.*, 1996 e Andrade *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que doses tão pequenas quanto 2 μ g do antígeno podem ser suficientes para a produção de altos níveis de anticorpos específicos com avidéz equivalente ao obtido com inoculação de antígenos nas doses comumente utilizadas.

Esses estudos corroboram a recomendação feita pelo European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM, Schade *et al.*, 1996) para utilização de doses entre 10ng a 10 μ g para obtenção de altos níveis de anticorpos específicos com alta avidéz.

Além da dose, um outro importante fator na produção de anticorpos é a via de inoculação do antígeno (Murphy *et al.*, 2010). As vias mais comuns pelas quais os antígenos são introduzidos experimentalmente ou como vacina são por injeções subcutâneas (SC), injeções entre a epiderme e as camadas da derme denominadas de intradérmica (ID), e injeções intramusculares (IM) (Erhard *et al.*, 2000; Murphy K., *et al.*, 2010; Eto *et al.*, 2012). Em aves as vias mais utilizadas são as vias SC e IM (Carmenish *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 1999; Erhard *et al.*, 2000; Guang-Ping *et al.*, 2005, Murphy *et al.*, 2010)

Neste trabalho comparamos as vias IM, ID e SC (Figura 3). Os resultados obtidos mostram que as vias ID e SC resultam em níveis significativos de anticorpos após a 3^a inoculação do antígeno. O mesmo efeito não é observado com a utilização da via IM. É importante ressaltar que a maioria dos estudos com produção de anticorpos IgY utiliza a via IM. Por outro lado, após a 5^a e a 7^a inoculação do antígeno essa diferença não é observada, e todas as vias resultam em níveis semelhantes de produção de anticorpos específicos (Figura 3). Esses resultados estão de acordo com de Erhard *et al.*, 2000, que utilizando diferentes antígenos, incluindo IgG humana, mostrou que a inoculação do antígeno pela via SC resultam em níveis

de anticorpos maiores do via a IM (Erhard *et al.*, 2000). Resultado semelhante foi obtido por Mayo *et al.*, 2003 quando avaliaram os níveis de anticorpos IgY anti-soro albumina bovina (BSA) obtiveram uma alta produção de anticorpos em galinhas imunizadas via SC. Por outro lado, o efeito da via aparentemente é dependente do tipo do antígeno. Estudos utilizando antígenos complexos como microorganismos ou células mostram que a via IM pode ser mais eficiente ou mesmo não haver diferenças entre os níveis de anticorpos produzidos pela via IM ou pela via SC. Chang *et al.*, 1999, utilizando como antígeno *Streptococcus mutans* para comparar o efeito das vias IM e SC, observaram que a produção de IgY pela via IM foi quase 10 vezes maior que pela via SC. Por outro lado Eto *et al.*, 2012, utilizando hemácias de carneiro como antígeno observaram que a via intra-venosa (IV) resultou em uma melhor resposta quando comparado com a via IM e SC, não sendo observadas diferenças significativas nos níveis de anticorpos produzidos por essas duas vias.

Quando investigamos o efeito da via de inoculação sobre a avidéz dos anticorpos IgY, não observamos diferenças significativas (Figura 4). Por outro lado, observamos que conforme os animais eram estimulados por novas doses do antígeno havia um aumento significativo do índice de avidéz. Esse efeito foi observado em todas as vias utilizadas (Figura 4).

Os nossos resultados estão de acordo ao trabalho realizado por Andrade *et al.* (2013), onde foi investigado a avidéz do anticorpo IgY anti- botrópico e anti-crotálico ao longo do tempo, neste trabalho foram utilizados animais linhagem White Leghorn e o adjuvante completo de Freund, e obtiveram os seguintes resultados, anticorpos IgY apresentaram um aumento significativo da avidéz apenas após a 5^a imunização e esse efeito se manteve ao longo do tempo.

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que dose utilizada para a produção de anticorpos específicos contra antígenos purificados podem ser mais de 25 a 100 vezes menores do que as doses normalmente utilizadas para esse fim. Isso representa uma redução significativa da

quantidade de antígeno necessária para a produção de anticorpos específicos. Considerando que a obtenção do antígeno é um fator limitante para produção de anticorpos específicos, acreditamos que estudo mostra a viabilidade da produção de anticorpos específicos mesmo com pequenas quantidades de antígeno. Além disso, este estudo mostrou que a via de inoculação não influencia de maneira significativa nos níveis e no índice de avides de anticorpos produzidos contra antígenos purificados. Portanto, a via inoculação utilizada em um estudo pode ser definida pelos autores baseando-se em variáveis como volume e adjuvante utilizados. Por outro lado, os resultados obtidos mostram que o número de doses do antígeno influencia significativamente o índice de avides de anticorpos específicos produzidos.

De um modo geral, os resultados obtidos nesse estudo mostram que para antígenos purificados doses tão pequenas quanto 2 podem ser utilizadas pelas vias IM ou SC para obtenção de níveis significativos e de índice de avides semelhantes as altas doses de antígenos utilizadas na maioria dos estudos atuais.

Agradecimentos

MPO Montini; Silva, MC; Cheirubim, AP receberam bolsa de estudo do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade FG, Eto SF, Ferraro ACNS, Marito DTG, Vieira NJ, Cheirubim AP, Ramos SP, Venancio EJ. The production and characterization of anti-boitropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experimete. *Toxicon* 2013; 66:18–24.

Bollen LS, Crowley A, Stodulski G, Hau J. 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* 1996; 191:113-120.

Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J, Spielmann P, Wenger RH, Gassmann M. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1alpha. *FASEB J.* 1999; 13(1):81-8.

Chang HM, Ou-Yang RF, Chen YT, Chen CC. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). *J Agric Food Chem.* 1999;47 (1):61-6.

de Meulenaer B, Huyghebaert A. Isolation and purification of chicken immunoglobulins: A review. *Food Agric Immunol.* 2001; 13:275-288.

Dias da Silva W, Tambourgi DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 135(3-4):173-80.

Erhard MH, Mahn K, Schmidt P, Oltmer S, Preisinger R, Zinsmeister P, Stangassinger M. Evaluation of various immunisation procedures in laying hens to induce high amounts of specific egg Yolk antibodies. *ATLA*, 2000; 28:63-80.

- Eto SF, Andrade FG, Pinheiro JW, Balarin MR, Ramos SP, Venancio EJ. Effect of Inoculation Route on the Production of Antibodies and Histological Characteristics of the Spleen in Laying Hens. *Brazilian Jour. of Poultry Science* 2012; 14(1): 63-66.
- Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 1990; 4(8):2528-32.
- Ruan GP, Ma L, He XW, Meng MJ, Zhu Y, Zhou MQ, Hu ZM, Wang XN. Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A*0201 heavy chain and light chain (beta2m). *Protein Expr Purif.* 2005; 44(1):45-51.
- Hau J, Hendriksen CFM. Refinement of Polyclonal Antibody Production by Combining Oral Immunization of Chickens with Harvest of Antibodies from the Egg Yolk. *ILAR Journal* 2005; 46(3): 294– 299.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robins & Cotran. Bases patológicas das doenças.* Rio de Janeiro, Elsevier, Cap. 26., p. 1246, 2010.
- Kweon CH, Kwon BJ, Woo SR, Kim JM, Woo GH, Son DH, Hur W, Lee YS. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (Ig Y) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *J Vet Med Sci.* 2000; 62(9):961-4.
- Larsson A, Wejåker PE, Forsberg PO, Lindahl T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J Immunol Methods.* 1992; 156(1):79-83.
- Marsh JA. Assessment of antibody production in sex-linked and autosomal dwarf chickens. *Dev Comp Immunol.* 1983 Summer;7(3):535-44
- Matsuda H, Mitsuda H, Nakamura N, Furusawa S, Mohri S, Kitamoto T. A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 23(3):189-94.
- Mayo SL, Persdotter-Hedlund G, Tufvesson M, Hau J. Systemic immune response of young chickens orally immunized with bovine serum albumin. *In Vivo* 2003; 17: 261-268.

- Murphy K, Tavares P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. Cap. 4, Apendice I., 7^a ed., Artmed® Editora S.A., Porto Alegre, RS, p. 144 e 731-736, 2010.
- Narat M. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol. Biotechnol.* 2003; 41(3): 259–267, 2003.
- Nilsson E, Larsson A, Olesen HV, Wejåker PE, Kollberg H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 2008; 43(9):892-9.
- Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter.* 2005; 10(1):43-52.
- Pauly D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poult Sci.* 2009; 88(2):281-90.
- Rosol TJ, Steinmeyer CL, McCauley LK, Merryman JI, Werkmeister JR, Gröne A, Weckmann MT, Swayne DE, Capen CC. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (1-36). *Vet Immunol Immunopathol.* 1993; 35(3-4):321-37.
- Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, Hammarström L. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001; 32(1):19-25.
- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, Larsson A, Pollmann W, van Regenmortel M, Rijke E, Spielmann H, Steinbusch H, Straughan D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY – the report and recommendations of ECVAM Workshop 21. *Altern. Lab. Anim.* 1996; 24: 925-934.

Schmidt P, Erhard MH, Schams D, Hafner A, Folger S, Lösch U. Chicken egg antibodies for immunohistochemical labeling of growth hormone and prolactin in bovine pituitary gland. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41(9):1441-6.

Smith DJ, King WF, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infect Immun.* 2001; 69(5):3135-42.

Suzuki H, Nomura S, Masaoka T, Goshima H, Kamata N, Kodama Y, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-*Helicobacter pylori*-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; Suppl 1:185-92.

Tini M, Jewell UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002; 131(3):569-74.

van der Zijpp AJ. The effect of genetic origin, source of antigen, and dose of antigen on the immune response of cockerels. *Poult Sci.* 1983 Feb;62(2):205-11.

Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H, Tohya Y, Kodama Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Can J Vet Res.* 2006; 70(1):62-4.

Woolley JA, Landon J. Comparison of antibody production to human interleukin- 6 (IL-6) by sheep and chickens. *Journal of Immunological Methods* 1995; 178(1): 253- 265.

Zhang WW. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discov Today.* 2003; 8(8):364-71.

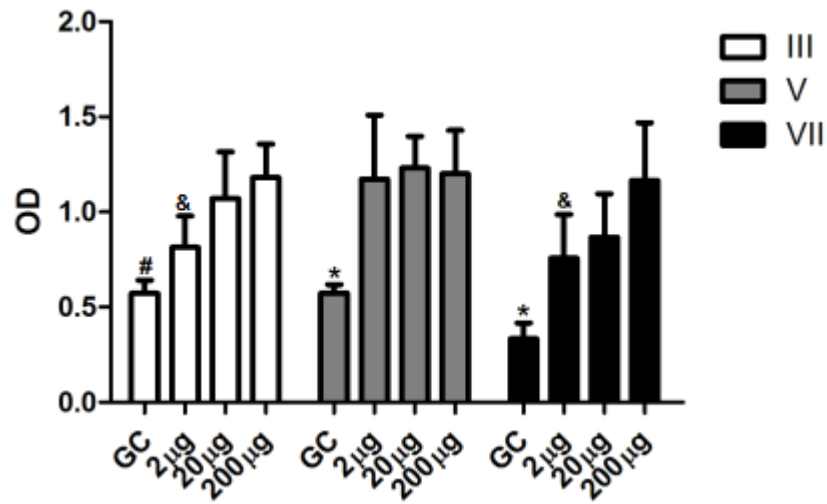


Figura 1.

Autor: Emerson José Venancio

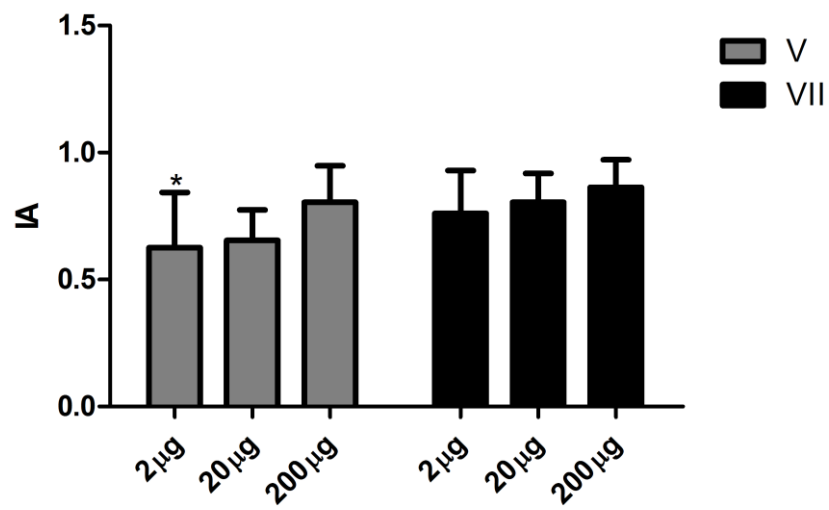


Figura 2.

Autor: Emerson José Venancio

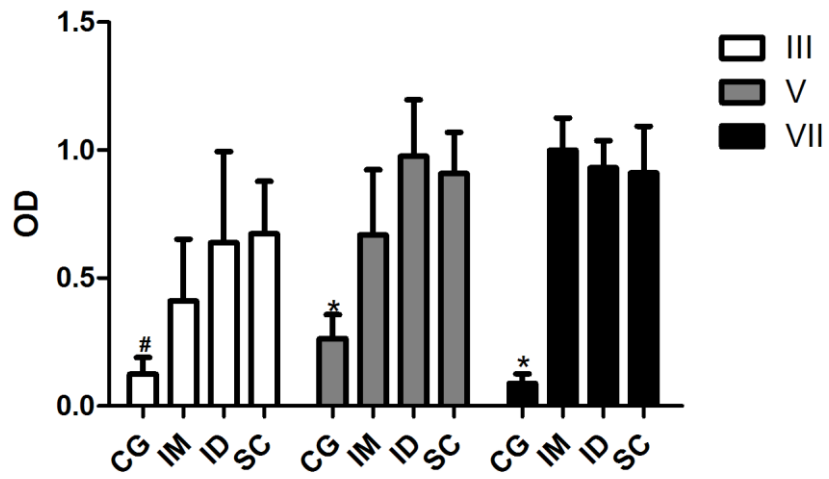


Figura 3.

Autor: Emerson José Venancio

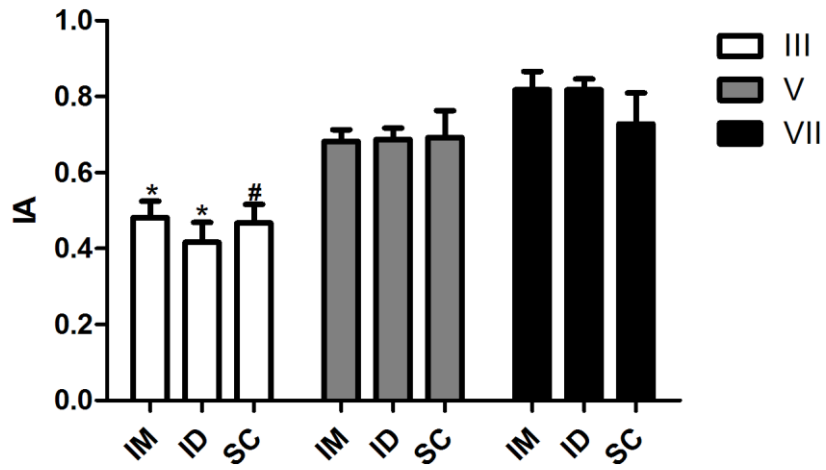


Figura 4.

Autor: Emerson José Venancio

Figura 1. Efeito da dose do antígeno sobre a produção de anticorpos específicos. Os níveis de anticorpos séricos (IgY) anti- IgG humana foram determinados por ELISA indireto a partir de amostras de soro dos animais do grupo controle (GC) e dos grupos inoculados com 2 µg (2 µg), 20 µg (20µg) e 200 µg (200µg) de IgG humana coletadas 7 dias após a 3^a (III), 5^a (V) e 7^a (VII) inoculação do antígeno. Os dados estão mostrados na forma de média e desvio-padrão. # Diferença significativa entre GC os grupos 20µg e 200 µg (ANOVA $p < 0,0001$, Teste de Bonferroni). * Diferença significativa entre GC os grupos 2 µg, 20 µg e 200 µg (V, Kruskal-Wallis, $p = 0,0045$, Teste de Dunn; VII, ANOVA, $p < 0,0001$, Bonferroni). & Diferença significativa entre grupo 2µg e 200µg (ANOVA, $p < 0,0001$, Bonferroni)

Figura 2. Influência da dose do antígeno sobre o índice de avidéz de anticorpos específicos. O índice de avidéz (IA) foi determinado por ELISA indireto usando a relação entre a DO da amostra de soro tratada com agente caotrópico ($MgCl_2$ 2M) e a DO da mesma amostra tratada com salina. Foram analisadas amostras de soro dos animais do grupo controle (GC) e dos grupos inoculados com 2 µg (2 µg), 20 µg (20µg) e 200 µg (200µg) de IgG humana coletadas 7 dias após a 5^a (V) e 7^a (VII) inoculação do antígeno. Os dados estão mostrados na forma de média e desvio-padrão. * Diferença significativa entre a 5^a e a 7^a incoluação nos animais do grupo 2 µg (Teste T pareado $p = 0,0064$)

Figura 3: Efeito da via de inoculação do antígeno sobre a produção de anticorpos específicos. Os dados estão mostrados em média e desvio-padrão. Os níveis de anticorpos séricos (IgY) anti-IgG humana foram determinados por ELISA indireto a partir de amostras de soro dos animais do grupo controle (GC) e dos grupos inoculados por via intramuscular (IM), intradérmica (ID) e subcutânea (SC) coletadas 7 dias após a 3^a (III), 5^a (V) e 7^a (VII) inoculação do antígeno. # Diferença significativa entre GC e os grupos ID e SC (Kruskal-Wallis, $p < 0,0071$, Dunn). * Diferença significativa entre GC e os grupos IM, ID e SC (ANOVA, $p < 0,0001$, Bonferroni).

Figura 4. Influência da via de inoculação do antígeno sobre o índice de avidéz de anticorpos específicos. O índice de avidéz (IA) foi determinado por ELISA indireto usando a relação entre a DO da amostra de soro tratada com agente caotrópico ($MgCl_2$ 2M) e a DO da mesma amostra tratada com salina. Foram analisadas amostras de soro dos animais dos grupos inoculados por via intramuscular (IM), intradérmica (ID) e subcutânea (SC) coletadas 7 dias após a 3^a (III), 5^a (V) e 7^a (VII) inoculação do antígeno. Os dados estão mostrados na forma de média e desvio-padrão. * Diferença significativa entre amostras coletadas após a 3^a e as 5^a e 7^a inoculações (IM, ANOVA medidas repetidas, $p = 0,003$, Bonferroni; ID, ANOVA, $p < 0,0001$, Bonferroni). # Diferença significativa entre amostras coletadas após a 3^a e a 7^a inoculações (ANOVA medidas repetidas, $p = 0,0025$, Bonferroni).

5. CONCLUSÕES

Considerando que a obtenção de Ag é um fator limitante para a produção de Ac específicos acreditamos que nosso estudo demonstra a viabilidade da produção de Ac específicos mesmo com pequenas quantidades do Ag, pois os resultados apresentados mostram que a dose utilizada para a produção de Ac específicos contra Ag purificados podem ser de 25 a 100x menor do que os normalmente utilizados. Reduzindo a quantidade de Ag necessária para a produção de Ac. Além disso, demonstrou que a via de inoculação não influencia significativamente nos índices de avides dos Ac produzidos com Ag purificados. Portanto a via de inoculação utilizada em um estudo pode ser definida pelos autores baseando-se em variáveis como volume e adjuvante. Por outro lado, demonstrou que o número de inoculações do Ag influencia significativamente no índice de avides de Ac específicos.

Em geral os resultados obtidos nesse estudo mostram que para antígenos purificados doses tão pequenas quanto 2 μ g podem ser utilizadas pelas vias IM e SC para obtenção de níveis significativos e de índice de avides semelhantes as altas doses de Ag utilizada na maioria dos estudos atuais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7^a ed. Rio de Janeiro- RJ, editora: Elsevier, 2011.
- ABRAHAMIAN, F.; AGRAWAL, S.; GUPTA, S. **Immunological and clinical profile of adult patients with selective immunoglobulin subclass deficiency: response to intravenous immunoglobulin therapy**. *Clinical and Experimental Immunology*, v.159, p.344–350, 2009.
- ANDRADE, F.G.; ETO, S. F.; FERRARO, A. C. N. S.; MARITO, D. T. G.; VIEIRA, N. J.; CHEIRUBIM, A. P.; RAMOS, S. P.; VENÂNCIO, E. J. **The production and characterization of anti-boitropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experimete**. *Toxicon*, v.66, p.18–24, 2013.
- BOES, M. **Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses**. *Molec. Immunol.*, v.37, p.1141–1149, 2000.
- CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P-E.; LARSSON, A. **Peroral Immunotherapy with Yolk Antibodies for the Prevention and Treatment of Enteric Infections**. *Immunologic Research*, v.21, n.1, p.1–6, 2000.
- CAMENISCH, G.; TINI, M.; CHILOV, D; KVIETIKOVA, I.; SRINIVAS, V.; CARO,J.; SPIELMANN,P.; WENGER, R. H.; GASSMANN. M. **General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α** . *The FASEB Journal.*, v.13, p.81-88, 1999.
- CHACANA, P.A; TERZOLO H.R.; GUTIÉRREZ CALZADO, E.; SCHADE R. **Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina**. *Rev. Med. Vet.*, v. 85, n. 5, p.179-189, 2004.
- CHAN, T. D.; BRINK, R. **Affinity-based selection and the germinal center response**. *Immunological Reviews*, v. 247, p.11–23, 2012.
- CHANG, H.M., OU-YANG. R.F.; CHEN, Y.T.; CHEN, C.C. **Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY)**. *J. Agric. Food Chem.*, v.47, p.61–66, 1999.
- CHOI, J.W.; KIM, J-W; SEO, H.W; CHO, B.W.; SONG, G.; HAN, J.Y. **Molecular cloning and comparative analysis of immunoglobulin heavy chain genes from *Phasianus colchicus*, *Meleagris gallopavo*, and *Coturnix japonica***. *Vet. Immunol. and Immunopat.*, v.136, p.248–256, 2010.
- COOK M.E.; TROTT D.L. **IgY – immune component of eggs as a source of passive immunity for animals and humans**. *World's Poult. Sci. J.*, v.66, p.215-225, 2010.

CHOI, J.W.; KIM, J.K.; SEO, H.W.; CHO, B.W.; SONG, G.; HAN, J.Y. Molecular cloning and comparative analysis of immunoglobulin heavy chain genes from *Phasianus colchicus*, *Meleagris gallopavo*, and *Coturnix japonica*. *Vet. Immunol. and Immunopat.*, v.136, p.248–256, 2010.

DÁVALOS- PANTOJA, L., ORTEGA-VINUESA, J.L, BASTOS-GONZÁLES, D., HIDALGO-ALVAREZ, R. **Colloidal stability of IgG- and IgY-coated látex microspheres.** *Colloids and surfaces b: Biointerfaces.* v.20, p.165-175, 2001.

DE MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. **Isolation and purification of chicken immunoglobulins: A review.** *Food Agric Immunol.*, v.13, p.275-288, 2001.

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

EISEN, H.N.; SISKIND, G.W. **Variation in affinities of antibodies during the imune response.** *Biochem.*, v.3, p.996-1008., 1964.

ERHARD, M.H.; MAHN, K.; SCHMIDT, P.; OLTMER, S.; PREISINGER, R; ZINSMEISTER, P., STANGASSINGER, M. **Evaluation of various immunisation procedures in laying hens to induce high amounts of specific egg Yolk antibodies.** *ATLA*, v.28, p. 63-80, 2000.

ERHARD, M.H.; SCHMIDT, P.; ZINSMEISTER, P.; HOFMANN, A; MÜLLER, U.; KASPERS, B.; WIESMÜLLER, K-H.; BESSLER, W.G.; STANGASSINGER, M. **Adjuvant Effects of Various Lipopeptides and Interferon- γ on the Humoral Immune Response of Chickens.** *Poultry Scienc.*, v.79, p.1264–1270, 2000.

ETO, S. F.; ANDRADE, F.G.; PINHEIRO, J. W.; BALARIN, M. R.; RAMOS, S. P.; VENANCIO, E. J. **Effect of Inoculation Route on the Production of Antibodies and Histological Characteristics of the Spleen in Laying Hens.** *Brazilian Jour. of Poultry Scienc.*, v.14, n.1, p.63-66, 2012.

GASSMANN, M., THOMMES, P., WEISER, T., HUBSCHER, U. **Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein.** *FASEB J*, v.4, p.2528-2532, 1990.

GUANG-PING, R.; LI, M.; XIAO-WEI, H.; MIN-JIE, M.; YONG, Z.; MING-QIAN, Z.; ZHI-MING, H.; XIAO-NING, W. **Efficient production, purification, and application of egg Yolk antibodies against human HLA-A* β 2m).** *Protein Expres. and Purif.*, v.44, p.45–51, 2005.

HAMAL, K.R.; BURGESS, S.C.; PEVZNER, I.Y.; ERF, G.F. **Maternal Antibody Transfer from Dams to Their Egg Yolks, Egg Whites, and Chicks in Meat Lines of Chickens.** *Poultry Science*, 85:1364-1372, 2006.

HATTA, H., TESUDA, K., AKACHI, S., KIM, M., YAMAMOTO, T. **Productivity na Some Properties of Egg Yolk Antibody (IgY) against Human Retrovirus Compared with Rabbit IgG.** *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.57, n.3, p. 450- 454, 1993.

HAU, J.; HENDRIKSEN, C.F.M. **Refinement of Polyclonal Antibody Production by Combining Oral Immunization of Chickens with Harvest of Antibodies from the Egg Yolk.** *ILAR Journal*, v.46, n.3, p.294– 299, 2005.

IMAI, K.; TAKAOKA, A. **Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer.** *Nature Review/ cancer*, v.6, p. 714-727, doi:10.1038/nrc1913, 2009.

KLEMPERER, F. **Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie.** *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, v.31, p.356–382, 1893.

KIM, D.P.; SAEGERMAN, C; DOUNY, C.; DINH, T.V.; XUAN, B.H.; VU, B.D.; HONG, N.P.; SCIPPO, M-L. **First Survey on the Use of Antibiotics in Pig and Poultry Production in the Red River Delta Region of Vietnam.** *Food and Public Health*, v.3, n.5, p.247-256, 2013.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. **Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity.** *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, v.3, p.163–182, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N; ASTER, J.C. **Robins & Cotran. Bases patológicas das doenças.** Rio de Janeiro, Elsevier, Cap. 26., p. 1246, 2010.

KRAMER, T. T., e CHO, H. C. **Transfer of Immunoglobulins and Antibodies in the Hen's Egg.** *Immunology*, v. 19, p.157- 167,1970.

KWEON, C.H.; KWON, B. J.; WOO, S.R.; KIM, J.M.; WOO, G.H.; SON, D.H.; HUR, W.; LEE, Y. S. **Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets.** *J. Vet. Med. Sci.*, v.62, p.961–964, 2000.

LANNING, D.K.; ZHAI, S-K.; Knight, K.L. **Analysis of the 3' C μ region of the rabbit Ig heavy chain locus.** *Gene*, v.309, p.135–144. 2003.

LARSSON, A.; KARLSSON-PARRA, A.; SJOQUIST, J. **Use de chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors.** *Clinical Chemistry*, v.37, n.1, p.411-414, 1991.

LARSSON, A.; WEJAKER, P-E.; FORSBERG, P-O.; LINDAHL, T. **Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA.** *Jour. of Immun. Methods*, v.156, p.79-83, 1992.

LESLIE, G.A., MARTIN, L.N. **Studies on the secretory immunologic system of fowl. 3. Serum and secretory IgA of the chicken.** *J. Immunol.*, v.110, p.1–9, 1973.

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C.F.M. **Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations.** *ILAR Journal*, v.46, n.3, 2005.

LÉVESQUE S, MARTINEZ G; FAIRBROTHER J.M. **Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY.** *Poult. Sci.* v.86, p.630–635, 2007.

LI, X.Y.; JIN, L.J.; LU, Y.N.; ZHEN, Y.H.; LI, S.Y.; WANG, L.H.; XU, Y.P. **Chitosan-alginate microcapsules for oral devilery of egg yolj immunoglobilun (IgY): effects of chitosan concentration.** *Appl Biochem Biotechnol.*, v.159, n,3, p.778-787, 2009.

LÓPEZ-MUEDANO, C.; KIRTON, R. S.; KUMBLE, K. D.; TABERNER, A. J. **Inexpensive optical system for microarray ELISA.** *Talanta*, v.100, p.405–409, 2012.

MACRE, M.S. **Avaliação da quantificação da avidéz dos anticorpos maternos na abordagem laboratorial da toxoplasmose congênita.** Dissertação, Mestrado departamento de parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, 2002. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-02122004-094234/pt-br.php> Acessado em: 27/01/ 2014.

MAHDAVI, A.H.; RAHMANI, H.R.; NILI, N.; SAMIE, A.H.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; JAHANIAN, R. **Effects of dietary egg yolk antibody powder on growth performance, intestinal Escherichia coli colonization, and immunocompetence of challenged broiler chicks.** *Poultry Science*, v.89, p.484–494, 2010.

MATSUDA, H.; MITSUDA, H.; NAKAMURA, N.; FURUSAWA, S.; MOHRI, S.; KITAMOTO, T. **A chicken monoclonal antibody with speciçcity for the N-terminal of human prion protein.** *FEMS Immunol. and Medical Microbiol.*, v.23, p189-194, 1999.

MAYO, S.L.; PERSDOTTER-HEDLUND, G.; TUFVESSON M.; HAU J. **Systemic immune response of yong chickens orally immunizaed with bovine sérum albumin.** *In vivo*, v. 17, n. 3., p.261- 268, 2003.

MICHAEL, S.; MEENATCHISUNDARAM, S.; PARAMESWARI, G.; SUBBRAJ, T.; SELVAKUMARAN R.; RAMALINGAM, S. **Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies.** *Indian Jour. of Sci. and Technol.*, v.3, n.4, 2010.

MOHAMMED, S.M.; MORRISON, S.; WIMS, L.; TRINH, K. R.; WILDEMAN, A. G., BONSELAAR, J.; ETCHES, R. J. **Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens.** *Immunotechnology*, v.4, p.115–125, 1998.

MORRISON S.L., MOHAMMED M.S., WIMS L.A., TRINH R., ETCHES R. **Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk.** *Mol. Immunol.* v.38, p.619–625, 2002.

MURPHY, K.; TAVARES, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway.** Cap. 4, *Apendice I.*, 7ª ed., Artmed® Editora S.A., Porto Alegre, RS, p. 144 e 731-736, 2010.

NARAT, M. **Production of Antibodies in Chickens.** *Food Technol. Biotechnol.* v.41, n.3, p.259–267, 2003.

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

NILSSON, E.; LARSSON A.; OLESEN, H.D.; WEJAKER, PER-ERIK; KOLLBERG, H. **Good Effect of IgY Against *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis Patients.** *Pediatric Pulmonology,* v.43, p.892–899, 2008.

PATTERSON, R.; YOUNGER, J.S.; WEIGLE, W.O.; DIXON, F.J. **Antibody production and transfer to egg yolk in chickens.** *Jour. of Immun.,* v.89, p.272–278, 1962.

PAULY D.; DORNER, M.; ZHANG, X.; HLINAK, A.; DORNER, B.; SCHADE, R. **Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period.** *Poult. Sci.,* v.88, p.281-290, 2009.

ROSE, M.E.; ORLANS, E.; BUTTRESS, N. **Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white.** *Eur. J. Immunol.,* v.4, p.521–23, 1974.

ROSOL, T.J.; STEINMEYER, C.L.; MCCAULEY, L.K.; MERRYMAN, J.I. WERKMEIS, J.R.; WECKMANN, M.T.; SWAYNE, D.E.; CAPEN, C.C. **Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein.** *Vet. Immunol. and Immunopat.,* v.35, n.1, p.321-337, 1993.

SANCHEZ, M.C.A.; FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Testes Sorológicos. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto- imunes.** Editora Guanabara e Koogan S.A., Rio de Janeiro –RJ, 2ª edição, cap.2, p.9-48, 2001.

SARKER, S.A.; CASSWALL, T.H.; JUNEJA, L.R.; HOQ, E.; HOSSAIN, E.; FUCHS, G.J.; HAMMARSTRÖM, L. **Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of Hyperimmunized Chicken Egg Yolk Immunoglobulin in Children With Rotavirus Diarrhea.** *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition,* v.32, p19–25, 2001.

SCHADE R., STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARAD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; REGENMORTEL, M.V.; RIJKE, E.; SPILMEMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRUGHAN, D. **The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY.** *ATLA,* v.24, p. 925- 934, 1996.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. **Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine.** *ATLA,* v.33, p.1–26, 2005.

SCHIMIDT, P.; ERHARD, M. H.; SCHAMS, D.; HAFNER, A.; FOLDER, S., LÖSCH, U. **Chicken egg antibodies for immunohistochemical labeling of growth hormone and prolactin in bovine pituitary gland.** *The Jour. of Histochem. and Cytochem.*, v.41, n.9, p.1441-1446, 1993.

SHIMITZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K.; SUZUKI, T. **Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations.** *J. Food Sci.*, v.59, p.763–772, 1994.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K., HATTA, H. **Molecular stability of Chicken and Rabbit Immunoglobulin G.** *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.56, n.2, p. 270- 274, 1992.

SHIN, JI- HYUN; YANG, M.; NAM, S. W.; KIM, T.; MYUNG, N. H.; BANG, WON-GI; ROEI, H. **Use of Egg Yolk-Derived Immunoglobulin as an Alternative to Antibiotic Treatment for Control of *Helicobacter pylori* Infection.** *Clinical and Diag. Labor. Immunology*, v.9, n.5, p.1061–1066, 2002.

SMITH, D.J.; KING, W.F.; GODISKA, R. **Passive Transfer Immunoglobulin IgY against Experimental Dental Caries Binding Protein B Can Confer Protection Antibody to *Streptococcus mutans* Glucan.** *Infect. Immun.*, v.69, n.5, p. 3135-3142, 2001.

SOUZA, V.A.U.F.; PANNUTI, C.S.; SUMITA, L.M.; ANDRADE-JUNIOR, H.F. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-IgG Antibody Avidity Test for Single Sample Serologic Evaluation of Measles Vaccines.** *Jour. of Medic. Virol.*, v. 52, p.275–279, 1997.

SUN, S., MO, W., JI. Y., LIU, S. **Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus.** *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v.15, p.708- 712, 2001.

SUN, Y.; WEI, A.; LI, N.; ZHAO, Y. **A comparative overview of immunoglobulin genes and the generation of their diversity in tetrapods.** *Develop. and Comp. Immunol.*, v.39, p.103–109, 2013.

SUNWOO, H.H.; LEE, E.N.; MENNINEN, K.; SURESH, M.R.; SIM, J.S. **Growth Inhibitory Effect of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7.** *Journal of Food Science*, v.67, n.4, p.1486- 1494, 2002.

SUI, J.; CAO, L.; LIN, H. **Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation.** *Jour. Sci Food Agric*, v.91, p.1946–1950, 2011.

SPILLNER, E.; Braren, I.; Greunke, K.; Seismann, H.; Blank, S.; Plessis, D. **Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy.** *Biologicals*, v.40, p.313-322. 2012.

TESAR, D.B.; CHEUNG E.J.; BJORKMAN, P. J. **The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells.** *Mol. Biol. Cell.*, v.19, p.1587–1593, 2008.

TINI, M.; JEWELL, U.R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. **Generation and application of chicken egg-yolk antibodies.** *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, v.131, p.569- 574, 2002.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária- uma introdução.** Editora: Elsevier, Rio de Janeiro, 8ª edição, cap. 14, p. 177, 2008.

TURNER, J.L.; DRITZ, P.S.S.; MINTON, J.E. **REVIEW: Alternatives to Conventional Antimicrobials in Swine Diets.** *The Profes. Anim. Scient.*, v.17, p. 217- 226, 2001.

THACKER, P.A. **Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review.** *Journal of Animal Science and Biotechnology*, n.4, v.35 p. 1-12, 2013.

VEGA C, BOK, M., CHACANA P., SAIF L., FERNANDEZ F., PARRENO, V. **Egg Yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves.** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.142, p.156–169, 2011.

XU, Y.; LI, X.; JIN, L.; ZHEN, Y.; LU, Y.; LI, S.; YOU, J.; WANG, L. **Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review.** *Biotechnology Advances*, v.29, p.860–868, 2011.

WANG, Q.; HOU,X-J; CAI, K.; LI, T.; LIU, Y-N; TU, W.; XIAO, L.; BAO, S-Z; SHI, J.; GAO, X.; LIU, H.; TIAN, R-M.; WANG, H. **Passive protection of purified Yolk Immunoglobulin administered against Shiga toxin 1 in mouse models.** *Canadian Jour. of Microbiol.*, v.56, n.12, p.1003-1010, 2010.

WATSON, D.L. **Biological Half-life of ovine antibody in neonatal lamb and adult sheep following passive immunization.** *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.30. 221.

WARR, G.W.; MAGOR, K.E.; HIGGINS, D.A. **IgY: clues to the origins of modern antibodies.** *Immunol. Today*, v.16, p.392–398, 1995.

WOOLLEY, J.A.; LANDON, J. **Comparison of antibody production to human interleukin- 6 (IL-6) by sheep and chickens.** *Journal of Immunological Methods*, v.178, n.1, p.253- 265, 1995.

ZHANG, W-W. **The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery.** *Drug Discovery Today*. Ed. Elsevier, v.8, n.8, 2003.