

**ISOLAMENTO TRANSCRIPTÔMICO DAS SEQUÊNCIAS VARIÁVEIS DE IgY
DE GALINHAS POEDEIRAS (*Gallus gallus*) ANTIVENENOS DE
Bitis arietans E *Crotalus durissus terrificus***

DAVID GITIRANA DA ROCHA

Dissertação submetida ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

ORIENTADOR: Dr. WILMAR DIAS DA SILVA

COORIENTADOR: Dr. JORGE HERNANDEZ FERNANDEZ

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES
FEVEREIRO – 2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ISOLAMENTO TRANSCRIPTÔMICO DAS SEQUÊNCIAS VARIÁVEIS DE IgY DE
GALINHAS POEDEIRAS (*Gallus gallus*) ANTIVENENOS DE
Bitis arietans E *Crotalus durissus terrificus***

DAVID GITIRANA DA ROCHA

Aprovado em: 19 de Fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Dra. ANA PAULA JUNQUEIRA-KIPNIS (IPTSP - UFG)

Dr. MILTON MASAHICO KANASHIRO (LBR - UENF)

Dr. JORGE HUDSON PETRETSKI (LBR - UENF)

Dr. JORGE HERNANDEZ FERNANDEZ (COORDINADOR / LQFPP - UENF)

Dr. WILMAR DIAS DA SILVA (ORIENTADOR / LIq – INST. BUTANTAN)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO - 2010

À Professora Thereza Liberman Kipnis,
grande incentivadora pessoal e um
exemplo raro de dedicação científica para
todos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos pessoais e profissionais são realmente muito complicados, sua elaboração requer acima de tudo boa memória, inspiração e uma pitada de talento literário. Fazendo uma auto-análise crítica, eu tenho uma memória razoável. A inspiração me visita poucas vezes no decorrer do ano, e o talento literário... havemos de convir que não se trata de um texto de Paulo Coelho, João Cabral de Melo Neto, Clarisse Lispector ou de outros autores não menos importantes. Mas a vida segue, e lamúrias ou descontentamentos não auxiliarão nesta pequena jornada de recordações.

Em primeiro lugar, como não poderia deixar de ser, vem o agrado ao orientador do trabalho. E o professor Wilmar merece todos os elogios, tanto no aspecto profissional quanto no pessoal. Apesar de um pouco mais distante em nível real (cerca de 600 Km), as dúvidas que surgiam no decorrer do projeto, da sua alçada, eram sanadas quase que imediatamente. Apoio ao projeto e ao pequeno protótipo de pesquisador que aqui escreve não faltou. Sem falar que é um exemplo de cientista e de ser humano.

A participação do Jorge como coorientador deste projeto foi indubitavelmente indispensável. Características como seu estilo descolado atrelado com seu perfil “linha dura” *made in* Cuba o tornam um tanto quanto intrigante, mas sem dúvida muito divertido e de boníssima convivência. O trabalho simplesmente não seria desenvolvido sem sua participação efetiva, daí sua importância.

Ainda no tangente ao trabalho pesado da rotina laboratorial, uma pessoa tem destacada importância no desenvolvimento do projeto: a senhora Cláudia Letícia. Apesar de um pouco mais estressada que o normal comigo, sem grandes motivos, é uma grande amiga e colaboradora-mor de todos os resultados desta dissertação.

Aos membros integrantes da Banca de Avaliação, que apesar de todo o atraso no cronograma provocado por este pequeno brincalhão aceitaram participar e não mediram esforços para ajudarem no necessário: Milton Kanashiro, Jorge Petretski, Ana Paula Kipnis, Elena Lassounskaia, Michelle Frazão e Cláudia Almeida. Muito obrigado!

Aos professores que sempre ajudaram e aconselharam: Renato DaMatta, Gonçalo Apolinário, Fábio Olivares e os supracitados.

Às técnicas do Genoma/UENF, Adriane e Tamiris, que tanto ajudaram na obtenção das sequências (e aguentaram alguns pequenos atrasos).

Às “flores” que coloreem este grupo de trabalho: Monique Camila, Thaís Louvain e Lynna Sentinelli.

Aos mais próximos amigos, que acompanharam de perto a saga, as delongas e as reclamações deste jovem velho: Raul, Renan, Henrique, Victor Garcia, Fabrício, Antônio, Giliane, Cristina, Nathália, Keysson, Luana, Ojana, Leandro, Saulinho, Emílio, Karine, Roberto, Tatiana Dutra, Tatiana Biá, Thatiane Resende, William, Thiago, Franz, Inarei, Juliana Azevedo, Rita Escocard e Fernando César.

Aos mais próximos amigos, membros da Luxus FC, que acompanhavam as idas ao açaí, ao braseirinho, debates sobre a essência feminina e afins: Seldon, Douglas, Rodrigo Santos, Vitor, Renan Martins, Luiz, Wellington, Adalberto, Leon, Leonardo Mader, Rodrigo Lima, Thiago Mussi, Jonas, Adriano e Rayner.

Saindo do escopo universitário, mais pessoas foram importantes para a conclusão de mais uma jornada na até então breve vida deste pequeno aprendiz:

À minha namorada, Jéssica Cunha, e à toda a sua família, por todo o apoio prestado, incondicional.

À minha mãe e irmã, que apesar de todo o caos dos últimos tempos são imprescindíveis.

À minha família campista, Dona Valdete, Seu Jorge, Felipe e Anderson, por todos os bons momentos.

Aos amigos que esqueci de citar e que reclamarão depois.

Ao Time de Guerreiros, que se superou e evitou o descenso, além de ser o campeão moral da Copa Sulamericana de 2009.

Ao Faith No More de Mike Patton e suas músicas extasiantes, por me manter acordado escrevendo este manuscrito.

ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
BSA	Albumina sérica bovina
CCK	Colicistocininas
DAB	Diaminobenzidina
DO	Densidade Óptica
ECVAM	Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima
Fc	Fração constante do anticorpo
HDGI	Histidina-Asparagina-Glicina-Isoleucina
HEAL	Histidina-Glutamato-Alanina-Leucina
HEGL	Histidina-Glutamato-Glicina-Leucina
HGF	Fator do Crescimento de Hepatócitos
HPV	Papilomavírus Humano
H₂O_{dd}	Água destilada e deionizada
Ig	Imunoglobulina
LYIS	Leucina-Tirosina-Isoleucina-Serina
OPD	Ortofenildiamida
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBST	PBS com Tween
PrP	Proteína Priônica
pl	Ponto Isoelétrico
RIE	Radioimunoensaio Sensitivo
scFv	Fração Variável de Cadeia Simples de Anticorpos
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
FD	Fator de Dispersão
TGF-β	Fator de Crescimento de Tumor β

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 – História	02
1.2 – O Sistema Imune Humoral das Aves	03
1.3 – Características Gerais da Imunoglobulina Y (IgY).....	09
1.3.1 – <i>Estrutura Molecular da IgY de Galinhas</i>	<i>09</i>
1.3.2 – <i>Parâmetros Físico-Químicos da IgY de Galinhas</i>	<i>11</i>
1.3.3 – <i>Transferência de IgY para a Gema do Ovo</i>	<i>12</i>
1.4 – Imunização de Galinhas.....	13
1.4.1 – <i>Dose do Antígeno.....</i>	<i>14</i>
1.4.2 – <i>Uso de Adjuvantes</i>	<i>14</i>
1.4.3 – <i>Modo de Aplicação do Antígeno.....</i>	<i>15</i>
1.4.4 – <i>Intervalo entre Imunizações.....</i>	<i>16</i>
1.4.5 – <i>Influência da Imunização na Capacidade de Postura de Ovos.....</i>	<i>16</i>
1.4.6 – <i>Cinética de Produção de IgY.....</i>	<i>17</i>
1.5 – Métodos para a Purificação e Quantificação de IgY.....	18
1.6 – Comparação das Propriedades de IgY e IgG	19
1.6.1 – <i>Sensibilidade e Especificidade</i>	<i>19</i>
1.6.2 – <i>Avidez.....</i>	<i>20</i>
1.7 – Vantagens do Uso de IgY	20
1.7.1 – <i>Bem-estar Animal</i>	<i>20</i>
1.7.2 – <i>Distância Filogenética</i>	<i>21</i>
1.7.3 – <i>Falta de Reatividade Cruzada com Fatores Reumatóides.....</i>	<i>22</i>
1.7.4 – <i>Falta de Reatividade com HAMA.....</i>	<i>23</i>
1.7.5 – <i>Inabilidade para ativar o Sistema Complemento de Mamíferos.....</i>	<i>23</i>
1.7.6 – <i>Falta de Hetero-Aglutininas</i>	<i>23</i>
1.8 – Aplicações de IgY na Pesquisa Biomédica, Medicinas Humana e Veterinária.....	24
1.8.1 – <i>Serpentes e Acidentes com Humanos.....</i>	<i>25</i>
1.8.2 – <i>Características Gerais da Bitis arietans.....</i>	<i>26</i>

1.8.3 – Características Gerais da <i>Crotalus durissus terrificus</i>	28
2 – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	31
2.1 – Objetivos	32
2.2 – Objetivos Específicos	32
2.3 – Justificativa.....	33
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 – Imunização das Aves	36
3.2 – Coleta do Material	37
3.3 – Obtenção das Moléculas de IgY.....	37
3.4 – Quantificação de Proteínas	38
3.5 – Análise em SDS-PAGE Desnaturante	39
3.6 – Detecção por Western Blotting	39
3.7 – ELISA dos Soros e Preparações de IgY Purificadas	40
3.8 – Análise Qualitativa do Anticorpo	41
3.9 – Ensaio de Imunoproteção.....	42
3.10 – Obtenção do mRNA e Análise por PCR.....	42
3.11 – Bactérias Competentes.....	44
3.12 – Seleção Clonal e Sequenciamento	44
3.13 – Modelagem Molecular por Homologia Estrutural	46
4 – RESULTADOS	47
4.1 – Avaliação dos Venenos em Uso.....	48
4.2 – Avaliação do Processo de Imunização por ELISA.....	48
4.3 – Ensaio de Imunoproteção.....	53
4.4 – Obtenção do mRNA e Análise das PCRs.....	53
4.5 – Clonagem das Sequências Obtidas.....	54
4.6 – Sequenciamento e Análise das Amostras.....	55
5 – DISCUSSÃO	59
6 – PERSPECTIVAS	63
7 – CONCLUSÃO.....	65
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Localização da Bursa de Fabricius	04
FIGURA 2: Rearranjo Gênico	07
FIGURA 3: CDRs	08
FIGURA 4: Sequência de aminoácidos da porção variável de IgY	09
FIGURA 5: Diferenças estruturais entre IgG e IgY	10
FIGURA 6: Árvore filogenética dos vertebrados	22
FIGURA 7: Distribuição Geográfica da <i>Bitis arietans</i>	27
FIGURA 8: Efeitos do Veneno de <i>Bitis arietans</i>	28
FIGURA 9: Eritema Provocado por Mordedura de Cascavel.....	30
FIGURA 10: Fotografia do Aviário	36
FIGURA 11: Delineamento da Obtenção de anticorpos IgY	38
FIGURA 12: Delineamento da Obtenção e Análise do mRNA-alvo	45
FIGURA 13: Gel dos venenos utilizados	48
FIGURA 14: Gel dos anticorpos obtidos.....	50
FIGURA 15: Análise das Imunizações por ELISA.....	50

FIGURA 16: Análise de Afinidade dos Anticorpos	51
FIGURA 17: Análise da Avidéz dos Anticorpospor Tempo	52
FIGURA 18: Ensaio de Imunoproteção	53
FIGURA 19: PCR das Sequências-alvo	54
FIGURA 20: Ensaio de Digestão de Vetor Pós-Clonagem.....	55
FIGURA 21: PCR de Sequenciamento.....	56
FIGURA 22: Sequências das Porções Variáveis de IgY.....	57
FIGURA 23: Modelagem de scFv das Sequências Obtidas.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Recomendações para a imunização de galinhas	13
TABELA 2: Diferenças gerais entre IgG e IgY	24
TABELA 3: Primers utilizados	43
TABELA 4: Imunização das Aves	49

RESUMO

O uso de anticorpos para o tratamento de humanos e animais de interesse econômico entoxicados ou envenenados data do final do século XIX. Sua utilização na fabricação de *kits* imunodiagnósticos também é de vital importância, no ponto de vista qualitativo. Assim, com o advento da tecnologia de produção de imunobiológicos e da biotecnologia em geral, foram observadas características indesejáveis inerentes aos anticorpos para tais finalidades, que induzem falsos resultados em *kits* rápidos e provocam reações adversas ao tratamento de pacientes acidentados. Com as ferramentas proteômicas e genômicas disponíveis, os anticorpos começaram a ser convenientemente modificados de acordo com a sua finalidade. A produção de anticorpos de camundongo humanizados e a retirada da porção Fc via enzimática são exemplos deste processo. Para a montagem de soros antivenenos há um novo passo tecnológico: a produção laboratorial das partes variáveis complementares do anticorpo em cadeia simples, de forma selecionar apenas os clones úteis ao processo, com o mesmo potencial neutralizante da imunoglobulina original, sem reações indesejáveis e controle de qualidade completo. No entanto, para tal nível de evolução tecnológica, a descoberta da sequência dos transcritos responsáveis por tais regiões de interesse se faz indispensável. A partir de um protocolo inédito de acompanhamento da expressão de mRNA pelo sangue das aves, imunizadas com os venenos de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus* (duas espécies de grande interesse econômico na África subsaariana e no Brasil, respectivamente), e seguindo o nível qualitativo apresentado pelos anticorpos obtidos nos ensaios imunienzimáticos (visando a obtenção das sequências originárias dos anticorpos de maior qualidade), isolamos os transcritos de interesse, amplificamos por PCR e clonamos em vetores de expressão. Colônias isoladas de bactérias competentes transformadas foram coletadas, tratadas, e o DNA de interesse foi sequenciado. As sequências obtidas foram analisadas em programa específico e testadas por BLAST no banco de dados do NCBI para a validação do resultado.

Palavras-Chave: IgY, Galinha, Soro Antiveneno, mRNA, PCR, Sequenciamento.

ABSTRACT

The use of antibodies for the treatment of humans and animals of economic interest intoxicated or poisoned dates from the late of century XIX. Its use in the manufacture of immunodiagnostic kits is also of vital importance in terms of quality. So, with the advent of technology for the production of immunobiological products and biotechnology in general, some undesirable characteristics inherent to the antibodies for such purposes were observed, which leads to false results in fast kits and cause adverse reactions to the treatment of injured patients. With the proteomic and genomic tools available, the antibodies began to be suitably modified according to its purpose. The production of humanized mouse antibodies and the enzymatic removal of the Fc portion are examples of this process. For the assembly of antivenom serum there is a new technological step: the laboratorial production of complementary variable parts of the antibody in single chains, so only useful clones will be selected for the procedure, with the same original neutralizing immunoglobulin potential, without undesirable reactions and with complete quality control. However, for this level of technological evolution, the discovery of the sequence of transcripts responsible for such interest areas is indispensable. Based on a novel protocol for monitoring the expression of mRNA in the blood of immunized hens with the venoms of *Bitis arietans* and *Crotalus durissus terrificus* (two species of great economic interest in sub-Saharan Africa and Brazil, respectively), and following the quality level presented by the antibodies obtained in enzyme immunoassays (aimed at obtaining the sequences of antibodies originating from higher quality), we isolate the transcripts of interest, amplifying them by PCR and cloning in expression vectors. Isolated colonies of bacterial competent cells were collected, processed, and the DNA of interest was sequenced. The obtained sequences were analyzed in specific programs and tested by BLAST in the NCBI database to validate the result.

Keywords: IgY, Chicken, Antivenom Serum, mRNA, PCR, DNA sequencing.



1 - INTRODUÇÃO

1.1 – História

O primeiro experimento de imunoproteção específica a partir da utilização de gemas de ovos, conhecida hoje como “transferência passiva de anticorpos”, foi realizada em 1893 por Klemperer. Imunizando um grupo de galinhas repetidas vezes com toxina tetânica não purificada (obtida de caldo de cultivo de *Clostridium tetani*), ele obteve um extrato de gemas de ovos com anticorpos neutralizantes em algumas semanas. O material foi utilizado na preparação de uma solução imunoprotetora, e então 4 grupos de camundongos foram imunizados com o extrato das gemas (1º grupo – 4 camundongos – 1ml; 2º, 3º e 4º grupos – 2 camundongos cada – 0,5ml, 0,25ml e 0,0ml respectivamente) e desafiados com doses letais da cultura tetânica supracitada, gerando um resultado surpreendente: enquanto os camundongos dos 3º e 4º grupos sucumbiram rapidamente, os seis camundongos dos grupos restantes (1º e 2º) sobreviveram (Klemperer, 1893).

No entanto, o que é considerado como uma descoberta de grande valor hoje, pela simplicidade da técnica e resultados obtidos, foi ignorado pelo meio científico por vários anos. Nas últimas décadas, porém, o bem-estar dos animais de laboratório foi elevado à categoria de “tema crítico” e a utilidade dos “anticorpos do ovo” começou a ser reconhecida. A publicação *The Principles of Humane Experimental Technique* (Os Princípios da Técnica Experimental Humana) de Russel e Burch, em 1959, foi o estopim para a retomada deste conhecimento e, nos 20 anos seguintes, pouco a pouco, mais pesquisadores aderiram à idéia de Klemperer (talvez pela falta de informações inerentes às características destes anticorpos, possibilidades de uso e vantagens). Este processo de adesão ainda foi incrementado pelo grande “arranque” da avicultura industrial nas últimas décadas, pois evidenciou a facilidade da manutenção destes animais quando comparado ao manejo de mamíferos de grande porte como eqüinos, caprinos e ovinos – animais usados como base de fornecimento de anticorpos imunoprotetores específicos (Schade *et al.*, 2005).

Desde a década de 1980, segundo Schade e colaboradores (2005), o uso de anticorpos do ovo (IgY) teve incremento significativo devido à aplicabilidade,

disponibilidade de reagentes secundários para *Kits* de purificação, padrões de IgY, anticorpos secundários anti-IgY (marcados com fluoresceína, fosfatase alcalina ou peroxidase).

Em 1996, a produção e uso de anticorpos IgY passou a ser internacionalmente conhecida como “Tecnologia IgY” (termo introduzido por Claus Staak em 1995). Ainda neste ano, o ECVAM (Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos) recomendou em seu *workshop* o uso de IgY no lugar de IgG, devido ao método invasivo (coleta de soro) de obtenção deste último, além de fornecer informações inerentes à criação e manejo de galinhas, técnicas de imunização, uso de adjuvantes, protocolos de extração e conservação de IgY, dentre outros. A Tecnologia IgY foi aprovada em 1999, pelo *Office Vétérinaire Federal* (Escritório Veterinário Federal do Governo Suíço), como um método alternativo que visa o bem-estar dos animais (Schade *et al.*, 2005).

Atualmente, um grande número de artigos, reportagens e afins sobre a Tecnologia IgY (criação de animais, transferência de IgY, purificação e seu uso em diagnósticos, terapia e profilaxia) são publicados.

1.2 – O Sistema Imune Humoral das Aves

Vários mecanismos tem sido desenvolvidos para proteger determinado organismo de ataques microbióticos, substâncias nocivas ou mesmo de suas próprias células defeituosas. A estes mecanismos intrincados de defesa foi conferido o nome de Sistema Imune. Em vertebrados, são subdivididos em Inato (responsável por uma resposta primária, geral) e Adquirido (resposta secundária efetiva, específica). Podemos subdividir este último em Celular e Humoral (Abbas & Lichtman, 2004).

O Sistema Imune das aves é formado por órgãos primários (Bursa de Fabricius e Timo) e secundários (Baço, Glândula Harderiana, Linfonodos, Medula Óssea e Tecido Linfóide do trato alimentar). Na Medula Óssea são originadas as células-tronco tímicas e bursais. O Timo e a Bursa são os sítios de seleção,

diferenciação e proliferação de linfócitos T e B, respectivamente. Imunoglobulinas (anticorpos) são produzidas por esta última classe de linfócitos. O local de proliferação de plasmócitos (ou plasmocitócitos – linfócitos B ativados) e células B de memória, além do armazenamento desta classe de linfócitos, é o Baço (Janeway *et al.*, 2002).

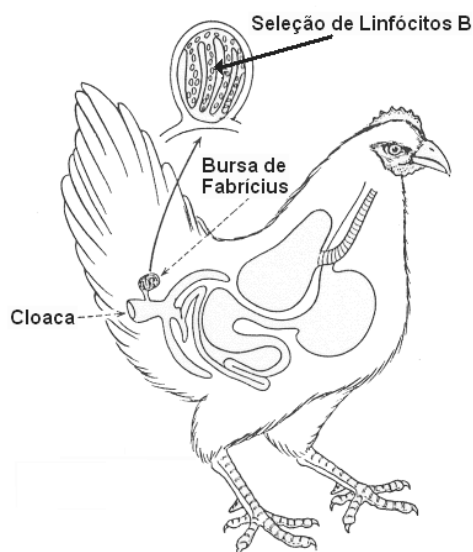


Figura 1 – Localização da Bursa de Fabricius em razão da Cloaca. Adaptado da internet (homepage2.nifty.com/cryomedicine/wdA_C.htm) em Novembro de 2007.

Enquanto em humanos são encontradas 5 classes de imunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgM e IgG), apenas 3 foram encontradas em aves, análogas aos anticorpos de mamíferos: IgA, IgM e IgY, cuja localização genômica se dá no cromossomo E18C15W15. Historicamente, esta última já foi chamada IgG, devido à concentração similar no soro e ao envolvimento na resposta imune secundária. No entanto, o nome foi considerado inadequado, especialmente pela diferença molecular entre IgG e IgY (Schade *et al.*, 2005).

Segundo Carlander e colaboradores (2002), as imunoglobulinas A e M de aves são semelhantes a IgA e IgM de mamíferos no peso molecular, estrutura e mobilidade eletroforética. A sequência gênica codificadora de IgY apresenta maior semelhança com IgE de mamíferos (em relação a IgG), além de demonstrar

relações moleculares com IgA (Ambrosius, 1996). Por outro lado, pode ser postulado que IgY seja um antecessor filogenético de IgA, IgE e IgG. Tal teoria, também proposta por Carlander, é baseada no seguinte fato: IgY, ao contrário de IgG, pode mediar reações anafiláticas.

Em mamíferos há 10^{11} especificidades possíveis de anticorpos (Davison, 2003). A partir deste dado, é coerente afirmar que não há possibilidade de um gene ser responsável por uma única espécie de anticorpo, com especificidade pré-determinada. Logo, há mecanismos intrínsecos envolvidos na diversidade de imunoglobulinas. No entanto, tais mecanismos são diferentes em aves e mamíferos.

Existem três mecanismos básicos na geração da diversidade de anticorpos (Bezzubova et al., 1994; Cohn & Langmann, 1993):

- Rearranjo Gênico – recombinação específica do sítio.
- Conversão Gênica – recombinação homóloga não-recíproca, pelo qual as modificações em um gene aceptor são copiadas de uma sequência doadora homóloga.
- Mutação Somática – substituição de um (ou dois) nucleotídeo não-derivado de uma pré-existente.

Em mamíferos, a diversidade de anticorpos é determinada por rearranjo de inúmeros segmentos gênicos para produzir a porção hipervariável da imunoglobulina e, além deste mecanismo, há mutação somática (figura 2). Assim, é possível montar anticorpos com milhões de especificidades. Em aves, no entanto, a diversidade é produzida por conversão gênica, pela junção “flexível” V-J, contando também com mutação somática pontual, assim como em mamíferos (Parvari et al., 1987 e 1988; Reynauld et al., 1989; Zhao et al., 2000). Contrastando com mamíferos, em aves há apenas um gene V_H ou V_L funcional, além de 25 pseudo-genes V, com falta da transcrição regulatória habitual e sequência-sinal de reconhecimento. Para estes genes, de 10 a mais de 120 pares de base são transferidos para o gene V funcional (figura 2). Tal processo é iniciado de 15 a 17 dias, aproximadamente, após o linfócito B imaturo migrar para a *Bursa* e sofrer o processo de seleção local para se tornar uma célula B madura competente (Schade et al., 2005).

A maior parte das diferenças sequenciais entre diferentes anticorpos está confinada a três pequenos trechos nas regiões variáveis das cadeias leve e pesada. Estas “regiões hipervariáveis” são constituídas por cerca de 10 resíduos de aminoácidos cada e, nos anticorpos, estão estruturalmente situadas na superfície ligante de antígenos (figura 3). Como tais sequências formam uma superfície que é complementar à estrutura tridimensional de ligação do antígeno, essas regiões hipervariáveis receberam o nome de Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs). A partir de cada porção amino-terminal das regiões variáveis leve e pesada, estas sequências receberam o nome de CDR1, CDR2 e CDR3 respectivamente. O CDR3 de ambas as porções é considerado o mais variável dentre os três (Abbas, A. K. & Lichtman, A. H., 2004). Os CDRs estão dispostos em forma de alça, interagindo diretamente com o antígeno. O confinamento da variabilidade à três pequenas regiões dos anticorpos explica ao mesmo tempo como diferentes moléculas destes (com sequência de resíduos de aminoácidos diferentes) possuem a mesma estrutura básica, com capacidade de reconhecimento de antígenos totalmente diferenciada.

Chiliza e colaboradores (2008) utilizaram a metodologia de produção de frações variáveis de cadeia simples de anticorpos (scFv) para o sequenciamento, identificação e análise dos CDRs em IgY de galinhas (figura 4). scFvs correspondem à junção das porções variáveis das cadeias leve e pesada (Fab) em cadeia simples, desenvolvidos a partir de metodologia que permite o rearranjo tridimensional da molécula de forma que a capacidade neutralizante do anticorpo original seja mantida.

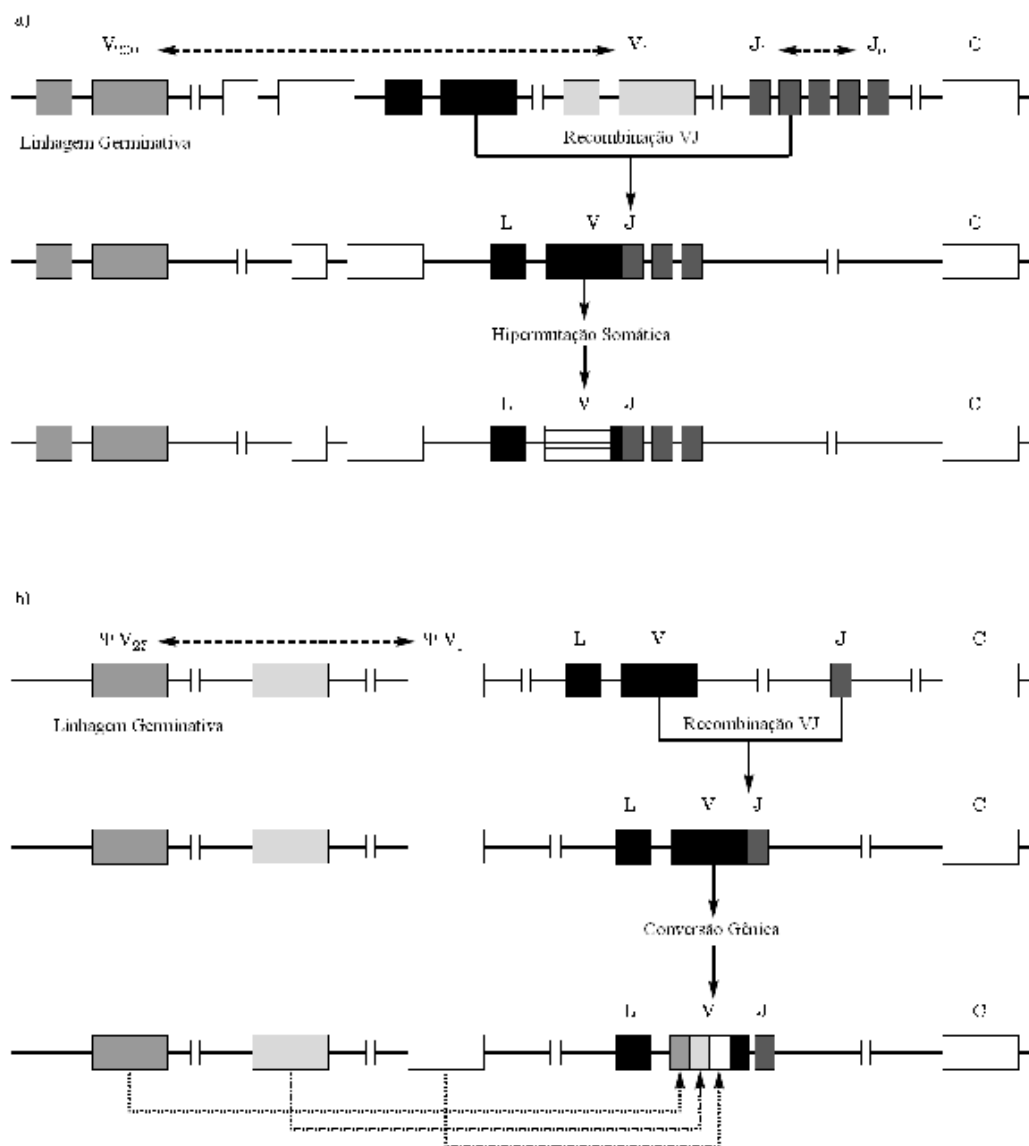


Figura 2 – a) Locus de cadeia leve de murinos; b) Locus de cadeia leve de aves.

V – segmentos gênicos codificantes do domínio variável (V_{1-200} indica o número de segmentos gênicos); J – segmentos gênicos codificantes de certa parte do domínio variável; C – segmentos gênicos codificantes do domínio constante; L – sequência-líder; ψV – segmentos do pseudo-gene V. Adaptado de Schade *et al.* (2005).

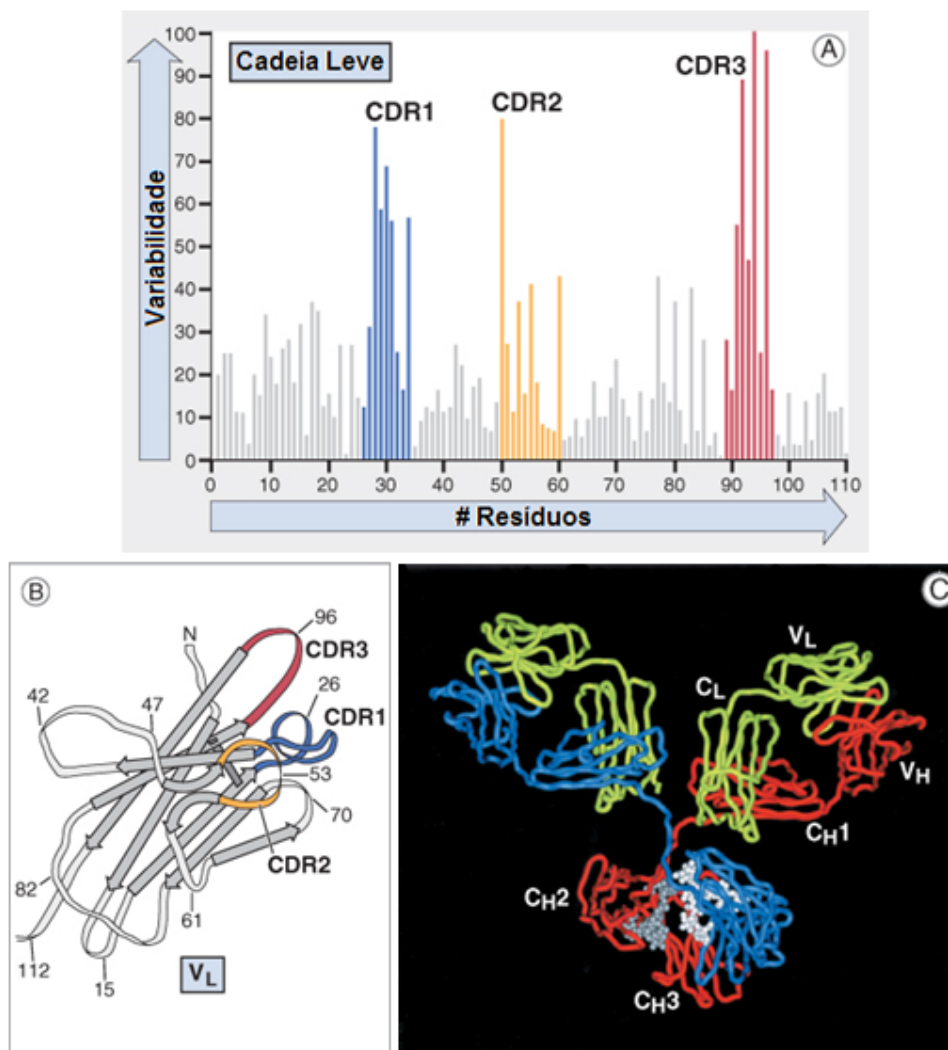


Figura 3 – Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs). 3A – *Plot* de variabilidade, indicando a posição dos 3 CDRs na porção variável da cadeia leve de uma molécula de IgG; 3B – Localização das alças dos CDRs na estrutura tridimensional respectiva à figura 3A; 3C – Desenho tridimensional de uma molécula de IgG, indicando suas porções constituintes. Adaptado de Abbas & Lichtman, 2004.

PRIMER	GERMLINE				
PRIMER 1	FW1-H			CDR 1	FW2-H
1	11	21	31	41	
LAAQPALM	AAVTLDES GG	GLQTPGRALS	LVCKASGFTF	SSYNMGWVRQ	APGKGLEFVA
	CDR 2	FW3-H			CDR 3
51	61	71	81	91	101
GIDN-TGRYT	GYGSAVKGRA	TISRDNGQST	VRLQLNNLRA	EDTGTYCAK	AAGT-----
		LINK		GERMLINE	
CDR 3	FW4-H	LINK PRIMER		FW1-L	
111	121			1	11
-AGSIDAWGH	GTEVIVSS	GALTQPSSVSANLGGTV		ALTQPSSVSA	NPGGTVKITC
CDR 1	FW2-L	CDR 2	FW3-L		
21	31	41	51	61	71
SGDSSYYGWY	WYQQKAPGSA	PVTVIYDNTN	RPSNIPSRFS	GSKSGSTATL	TITGVRADDN
		PRIMER			
	CDR 3	FW4-L	PRIMER 2		
81	91	101			
AVYYCASTDS	ST-AGIFGAG	TTLTVL	GQPNAAAEQKLISEEDLNG		

Figura 4 – scFv (Fragmento variável de cadeia simples) desenvolvido por Chiliza *et al.* (2008). A primeira porção (Primer 1 – Link Primer) representa a sequência da porção variável da cadeia pesada de IgY; a segunda porção (Link Primer – Primer 2) representa a sequência da porção variável da cadeia leve. Os CDRs e suas respectivas sequências estão marcados em vermelho.

1.3 – Características Gerais da Imunoglobulina Y (IgY)

1.3.1 – Estrutura Molecular da IgY de Aves

A estrutura molecular geral de uma IgY, constituída por duas cadeias “leves” e duas “pesadas”, é semelhante à de IgG de mamíferos. A cadeia pesada é formada por um domínio variável e quatro constantes, enquanto IgG apresenta apenas três domínios constantes (figura 5). Segundo Sun *et al.* (2001), o peso molecular (por espectrometria de massa) de uma molécula de IgY é de 167,25 KDa, enquanto IgG tem aproximadamente 160 KDa. No entanto, Sasse (1998) obteve resultado

relativamente diferente utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A cadeia leve, que por sua vez contém um domínio variável e um constante, tem um peso molecular de 18,66 KDa, a cadeia pesada, 65,1 KDa e o fragmento Fab 45,4 KDa. Há certo grau de homologia entre os domínios constantes 3 e 4 da cadeia pesada de IgY e os domínios 2 e 3 de IgG de mamíferos. O domínio 2 da cadeia pesada de IgY merece atenção especial. Este é reconhecido por representar a região “dobradiça” de IgG, que é pouco desenvolvida em IgY (Shimizu *et al.*, 1998). O pequeno desenvolvimento da região dobradiça pode resultar numa redução de flexibilidade de metade do Fab, que, por sua vez, pode ser a razão para algumas das diferenças entre IgY e IgG acerca do reconhecimento dos epítomos do antígeno (Warr *et al.*, 1995; Cser *et al.*, 1982; Noll *et al.*, 1982).

Tal como IgG, a porção Fc de IgY é o sítio de muitas funções biológicas efectoras. Segundo Shimizu *et al.* (1992), ela contém duas cadeias laterais de carboidratos, enquanto IgG apresenta apenas uma.

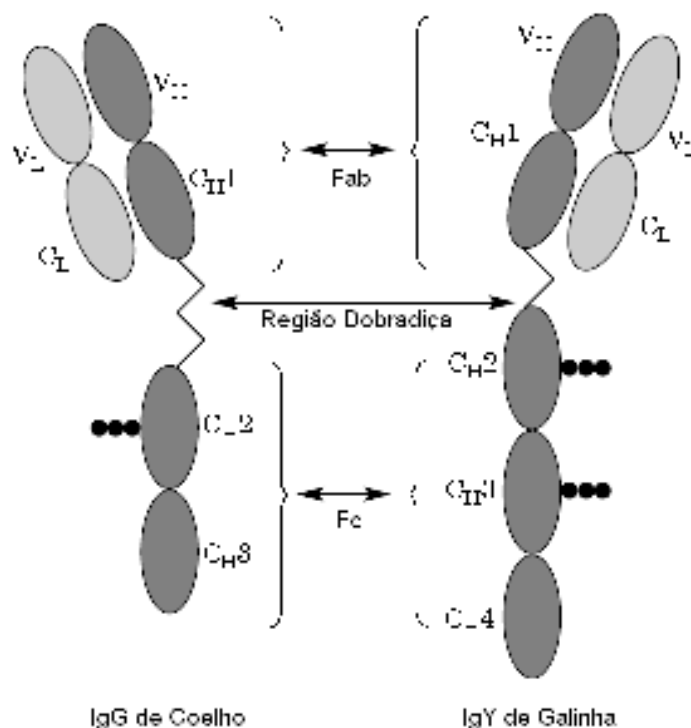


Figura 5 – Diferenças estruturais entre moléculas de IgG e IgY.

V – domínio variável (V_L – referente à cadeia leve; V_H – referente à cadeia pesada);

C – domínio constante (C_L e C_H – idem ao anterior).

Figura adaptada de Schade *et al.* (2005).

1.3.2 – Parâmetros Físico-Químicos da IgY de Aves

O ponto isoelétrico (pI) da IgY varia em uma faixa de 5,7 a 7,6, enquanto o de IgG está entre 6,1 e 8,5 (Davalos-Pantoja et al., 2000; Sun et al, 2001).

Ainda segundo Davalos-Pantoja, a molécula de IgY é mais hidrofóbica que a de IgG. Como é conhecido, a porção mais hidrofóbica de uma imunoglobulina é seu fragmento Fc. Assim, como este fragmento é maior em IgY, esta molécula termina sendo mais hidrofóbica. Tal característica pode ser demonstrada pela adsorção estável de IgY à partículas de látex. Além disso, em pH 8,0, a porção Fc é firmemente ligada à partículas de látex e mantém a atividade ligante específica (Davalos-Pantoja *et al.*, 2001).

IgY é mais sensível à desnaturação ácida que IgG de coelho, e perde mais rapidamente a atividade entre pH 3 e 4 (Shimizu et al., 1992). Segundo Lee *et al.*, a adição de 50% de sorbitol foi capaz de suprimir quase totalmente a inativação de IgY induzida por ácido em pH 3.

A Imunoglobulina Y perde grande especificidade sob atividade de proteases pancreáticas, tripsina e quimotripsina. A adição de um agente alcalino como bicarbonato de sódio, ou solução rica em proteínas como clara e gema de ovo, aumenta consideravelmente a resistência de IgY à inativação ácida ou proteolítica (Schmidt *et al.*, 1989). IgY é menos resistente que IgG bovina à digestão com pepsina, porém mais resistente quanto às atividades de tripsina e quimotripsina (Hatta *et al.*, 2003).

Jaradat e Marquardt (2000) demonstraram que IgY é estável a 60 °C, que pode ser incrementada para 70 °C pela adição de açúcares, como 30 % de lactose, trealose ou sucrose, além da gema do ovo. Não é possível designar padrões para a recuperação da atividade de IgY em baixos pHs, que assegurem uma ação específica no sítio designado para sua ação (Shimizu *et al.*, 1993).

1.3.3 – Transferência de IgY para a Gema do Ovo

Segundo Rose *et al.* (1974), pequenas quantidades de IgA e IgM são transferidas para a clara do ovo. No entanto, Yamamoto *et al.* (1975) demonstraram quantidades substanciais de IgM e IgA na gema do ovo e IgY na clara. IgY é transferida preferencialmente para a gema por processos mediados por receptores (Mohammed *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 2001). A quantidade de IgY transferida é relativa à concentração de IgY sérica, e todas as populações desta imunoglobulina são transferidas.

Estes dois últimos grupos mostraram ainda que a porção Fc e a região da dobradiça são essenciais para a transferência de IgY do soro para a gema do ovo. Aparentemente, duas regiões têm importância crucial neste transporte: os resíduos de aminoácidos 251-254 (*Leu-Tyr-Ile-Ser* ou LYIS, situados na interface entre os domínios 2 e 3 da cadeia pesada) e 429-432 (*His-Glu-Ala-Leu* ou HEAL, no domínio 3 da mesma cadeia). Os carboidratos laterais associados à cadeia não interferem no transporte. Todas as imunoglobulinas encontradas na gema têm a sequência HEAL. Interessantemente, segundo Schade e colaboradores (2005), IgA humana apresenta a sequência HEAL, enquanto IgA de aves (que não são transferidas para a gema) têm a sequência HDGI (*His-Asp-Gly-Ile*), e IgG2b de humanos a HEGL (*His-Glu-Gly-Leu*).

Mohammed *et al.* (1998) postularam ainda que a passagem transovariana de IgY ocorre em cerca de 5 dias. A meia-vida de IgY circulante em uma galinha adulta é de, aproximadamente, 36 a 65 horas (Patterson *et al.*, 1962), consideravelmente menor que a meia-vida de IgG de ovelha, cerca de 15 dias (Woolley e Landon, 1995). A quantidade de IgY transferida para a gema é independente do tamanho do ovo (Dohms *et al.*, 1978; Bollen e Hau, 1997). No entanto, como IgY não é a única proteína selecionada do soro para a gema, a quantidade de ovos postos pela galinha no decorrer da análise pode interferir na formação de uma curva analítica exata (Patterson *et al.*, 1962).

Dependendo do ensaio usado e sua sensibilidade, a concentração estimada total de IgY na gema varia entre 100 e 200 mg por ovo. Há uma controvérsia

concernente às concentrações de IgY na gema e sérica. Enquanto alguns autores afirmam que não há diferenças entre ambas, outros dizem que a concentração na gema é superior com razões de até 1.23, segundo Woolley e Landon (1995). A concentração de IgY varia significativamente entre indivíduos e linhagens genéticas (como *Comb White Leghorn*, *SLU-1329* e *Rhode Island Red*).

1.4 – Imunização de Galinhas

Não é possível determinar com precisão os resultados do desenvolvimento e produção de anticorpos a partir de imunizações. Quatro fatores devem ser levados em consideração na resposta imune de galinhas imunizadas: a dose do antígeno, o adjuvante utilizado, a via de aplicação e a própria galinha (condições de manejo e criação, idade, linhagem e capacidade de postura de ovos). Há algumas recomendações (tabela 1) da Organização Mundial da Saúde para o processo de imunização de galinhas.

Dose, Volume e Intervalo de Imunização			Comentários
Antígeno	0,10-1,00mg		certas vezes apenas 10µg
Adjuvante	AIF	0,10-0,25ml	mais usado em i.m. ou s.c. s.c. preferivelmente s.c. apenas com imunógenos fracos
	Especol	0,5ml	
	PCSL	250µg	
	ACF	0,10-0,25ml	
Injeção	Volume	0,5-1,0ml	
	Intervalo	4-8 semanas	
	Número	2 (mais se necessário)	
	Rota	i.m., s.c. ou i.v.	

Tabela 1 – Recomendações para a imunização de galinhas.

AIF e ACF – Adjuvante Incompleto e Completo de Freund; PCSL – *Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄*; i.m. – intramuscular; i.v. – intravenoso; s.c. – subcutâneo. Adaptado de Schade *et al.* (2005)

1.4.1 – Dose do Antígeno

A dose do antígeno usada na imunização influencia diretamente na resposta imune resultante e, conseqüentemente, na titulação de anticorpos. Bons resultados são obtidos a partir de concentrações de antígenos entre 10µg e 1mg, segundo diversos pesquisadores (Mahn, 1998).

Larsson *et al.* (1998) demonstraram, imunizando grupos de três galinhas com BSA (Albumina Sérica Bovina) em diferentes concentrações, que não houve diferenças significativas entre os grupos imunizados com 100, 10 e 1µg desta proteína quanto à titulação de anticorpos no plasma e na gema dos ovos. Surpreendentemente, neste experimento, o grupo imunizado com 0,1µg de BSA gerou resposta imune detectável.

Para cada antígeno há uma dose ótima requerida para o sucesso da imunização, e esta é obtida por testes experimentais. Como regra prática, pequenas moléculas como peptídeos (menores que 10KDa) devem ser ligados à proteínas transportadoras (como BSA).

1.4.2 – Uso de Adjuvantes

A produção de anticorpos policlonais é facilitada pelo uso de moduladores (como adjuvantes) que estimulem linfócitos B. Embora a estimulação seja independente do antígeno e portanto não-específica, a adição de adjuvantes na imunização aumenta a magnitude da resposta imune gerada. No entanto, a imunização de galinhas sem o uso de adjuvantes também gera resultados aceitáveis na titulação de anticorpos (Calzado *et al.*, 2001).

Há muitos adjuvantes disponíveis para utilização, que diferem em suas características químicas, eficácia na estimulação do Sistema Imune e efeitos secundários associados na inoculação de galinhas (Leenars *et al.*, 1999). De acordo com Schade *et al.* (2005), o Adjuvante Completo de Freund (FCA) é o mais efetivo.

No entanto, esta vantagem relativa (aos demais adjuvantes) está ligada à potência de dano tecidual deste. O Adjuvante Incompleto de Freund (FIA) é menos eficaz que o FCA, mas proporciona menores efeitos colaterais quando é cuidadosamente misturado, para produzir uma emulsão coloidal própria.

Gassman *et al.* (1990) afirmam que galinhas apresentam maior resistência ao dano tecidual que coelhos quando submetidos à tratamentos com adjuvantes. No entanto, há dados que contradizem esta afirmação (Leenars *et al.*, 1999; Olbrich *et al.*, 2002).

Novas pesquisas estão sendo dirigidas para a formulação de novos adjuvantes, com a mesma eficácia que ACF e menores efeitos colaterais.

1.4.3 – Modo de Aplicação do Antígeno

A rota mais comum para a injeção de antígenos em galinhas é a intramuscular. Segundo os estudos de Schwarzkopf e colaboradores (2000), não é possível definir se a via intramuscular gera uma titulação de anticorpos maior que a via subcutânea. Não é permitido o uso de adjuvantes para imunizações via intravenosa. Schade e colaboradores (2005) afirmam que a combinação de injeções (de antígeno) intramusculares com uma dose final intravenosa aumenta significativamente a titulação de anticorpos. Contudo, injeções intravenosas (sem adjuvantes) muito vagarosas (cerca de 500µl por 15 minutos) podem levar a uma reação anafilática. Em 1983, Klemperer usou a rota intraperitoneal para inoculação da toxina tetânica durante seu experimento. No entanto, esta raramente é usada hoje (Lösch *et al.*, 1986). Outra rota de imunização possível é a via oral. Klipper e colaboradores (2001 e 2000) demonstraram titulação significativa de anticorpos contra antígenos protéicos (como BSA) no soro e bile de galinhas com duas semanas de idade após algumas administrações de antígenos via oral. Heldlund e Hau (2001) obtiveram consideráveis níveis de titulação de anticorpos ao imunizarem galinhas com IgG humana (usando Softigen® e a subunidade B da toxina da *Cholera*

como adjuvantes) via oral. No entanto, o mesmo experimento realizado com imunização via intramuscular apresentou resultados claramente menores.

1.4.4 – Intervalo entre Imunizações

O sucesso de uma imunização depende, dentre outros fatores, do intervalo entre a primeira e a segunda dose e entre as administrações subseqüentes. A recomendação geral para o intervalo entre as duas primeiras inoculações do antígeno é de 4 semanas. No entanto, diversos protocolos com intervalos reduzidos já foram criados, como imunizações quinzenais (Tini *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2001), semanais (imunização por 7 semanas consecutivas – Calzado *et al.*, 2003), com intervalos de 10 dias (Ohnishi *et al.*, 2000), dentre outros. A definição do protocolo influenciará diretamente na memória imunológica do animal, assim como em seu tempo de desenvolvimento. Há evidências de que imunizações freqüentes em curtos períodos de tempo resultem em depressão, em vez de ativação, da resposta imune (Calzado *et al.*, 2003).

1.4.5 – Influência da Imunização na Capacidade de Postura de Ovos

Segundo Schade e colaboradores (2005), a performance de postura é ligeiramente afetada por uma simples inoculação de antígenos, mas essa capacidade pode decrescer dependendo do tipo de antígeno inoculado. Schade e colaboradores (1994) demonstraram que galinhas imunizadas com certos antígenos de *Ascaris suum* tiveram postura consideravelmente afetada ou até mesmo paralizada em 3 semanas, provavelmente devido à toxicidade das substâncias originárias de um parasita intestinal. O uso de ACF também pode causar depressão significativa na postura (Bollen e Hau, 1999), leve queda (Mittermeier, 1995) ou até mesmo falha (Hlinak e Schade, 2000). A diferença de resultados provavelmente foi causada pelas diferenças nas condições experimentais.

1.4.6 – Cinética de Produção de IgY

Após a imunização de um mamífero, como humanos, o Sistema Imune monta uma resposta primária geral, seguida de uma resposta secundária iniciada após a segunda dose do antígeno. As duas fases têm características distintas. Na primeira, apenas os anticorpos do isotipo IgM são sintetizados pelos linfócitos B, e o aumento na titulação de anticorpos é pequeno ou médio (dependendo da dose aplicada do antígeno). Durante a segunda, há a montagem estável de anticorpos mais específicos, como a IgG, e alta titulação sérica destes por várias semanas.

Em galinhas, uma resposta imune similar é observada, com algumas diferenças. Os anticorpos IgY aparecem no soro destas aves cerca de 4 dias após a inoculação do antígeno, chegando ao ápice da titulação entre os dias 6 e 8, e caindo em seguida. A titulação de IgY sérica pode ser incrementada por reforços (*boosters*) do mesmo antígeno. De acordo com Patterson *et al* (1962), algumas galinhas respondem com uma cinética de titulação semelhante a alguns mamíferos, enquanto outras “falham” após a segunda imunização.

A cinética de titulação de anticorpos mais freqüentemente observada em galinhas depois da primeira imunização demonstra um incremento passageiro na titulação de IgY da primeira fase, e a segunda é caracterizada por um incremento inicial na mesma titulação por aproximadamente 10 dias, seguidos por um platô de cerca de 10 dias e queda em seguida. O desenvolvimento desta titulação é provavelmente uma consequência do tempo de meia-vida de IgY em relação à IgG. Há alguns autores, no entanto, que demonstram altas titulações estáveis por várias semanas (Hlinak *et al.*, 1996; Hommel e Behn, 2000). As razões para tais diferenças experimentais permanecem inexplicadas.

1.5 – Métodos Para a Purificação e Quantificação de IgY

Em fato, IgY pode ser extraída a partir do soro ou plasma. No entanto, sua extração a partir da gema dos ovos é indubitavelmente a mais indicada (Rose *et al.*, 1974). Ovos podem ser coletados diariamente da mesma galinha e processados individualmente ou em razão de um grupo cuja imunização tenha sido similar. Mais de 100 mg de IgY purificada podem ser obtidas a partir de um simples ovo (Tressler e Roth, 1987). Galinhas poedeiras especializadas tem uma capacidade de produção de ovos superior a 10 meses, possibilitando a obtenção de quantidade colossal de IgY específico contra determinado antígeno.

Diferentes métodos são correntemente utilizados para o isolamento da IgY a partir da gema do ovo. Um método simples ganhou destaque nas publicações mais recentes (Bhanushali *et al.*, 1994): a gema do ovo é diluída 10 vezes em água destilada, pH 5,5, e a suspensão é incubada *overnight* a 4°C. O sobrenadante contendo IgY é coletado por centrifugação (10.000 x g, 4°C, 30 min), à temperatura de 20°C, e é adicionado sulfato de amônio até uma concentração final de 29% (p/v). As proteínas precipitadas são recuperadas por centrifugação (10.000 x g, 4°C, 30 min), redissolvidas em NaCl 0,15 M e dialisada contra a mesma solução. O material pode ser purificado na sequência por método cromatográfico para a remoção de proteínas não-imunoglobulinas. Quando anticorpos IgY purificados específicos são requeridos, uma cromatografia de imunoafinidade é usada. No entanto, segundo Almeida *et al.* (1998, 2008), a aplicação de processos cromatográficos ao produto dialisado não apresenta resultados significativos.

IgY, tal como IgG de mamíferos, é uma proteína reconhecidamente estável. Uma vez diluída em salina com substâncias que preservem a estrutura protéica, pode ser estacada em 2-4°C sem perda de atividade. Quando liofilizada, a IgY pode ser estocada sem perda de atividade a -20°C por vários meses, ou por até 1 mês a 37°C. IgY pode ser estocada por mais de 10 anos em NaCl 0,15 M contendo 0,02%

NaN₃ a 4°C (Shimitzu *et al.*, 1994). As moléculas de IgY, assim como as de IgG, podem ser marcadas com biotina ou peroxidase (Larsson *et al.*, 1999).

1.6 – Comparação das Propriedades de IgY e IgG

1.6.1 – Sensibilidade e Especificidade

Ohnishi *et al.* (2000) desenvolveu um ELISA para a detecção do Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF) e Fator de Dispersão (SF) na urina e soro humanos e comparou a especificidade dos anticorpos de galinha e coelho. O limite de detecção do ensaio de coelho foi de 2pg/ml, em contraste com 20pg/ml no ensaio de galinhas. Ligações não-específicas foram menores no ensaio com IgY em relação ao ensaio com IgG. Assim, demonstrou-se que IgY foi mais específica que IgG. O limite de detecção para o teste comercial (de HGF) é de apenas 100pg/ml.

Di Lonardo *et al.* (2001) produziram anticorpos anti-oncoproteína E7 do Papilomavírus Humano tipo 16 (HPV16) em coelhos e galinhas. O mapeamento de peptídeos revelou que IgY reagiu com todos os epítomos presentes, enquanto IgG de coelhos reconheceu apenas 2 dos 8 epítomos. Nos ensaios imunohistoquímicos, anticorpos IgY foram mais efetivos que IgG. Assim, neste experimento, os anticorpos de galinha foram claramente superiores aos de coelho.

Schade *et al.* (2000) compararam a especificidade e sensibilidade dos anticorpos de coelho e galinha contra alguns derivados de colecistocininas (CCK). No geral, IgG de coelhos apresentaram bons sinais para longos derivados de CCK (8 resíduos de aminoácidos), enquanto IgY de galinhas reconheceram apenas seqüências curtas de CCK (4-5 resíduos de aminoácidos). Os dois anticorpos desenvolvidos puderam ser utilizados de maneira satisfatória e similar em radioimunoensaio sensível (RIA).

Straumann-Kunz *et al.* (1991) compararam anticorpos monoclonais anti-*Chlamydiae* com IgY correspondente e observaram que, em ensaios imunohistoquímicos, a segunda foi mais específica.

Bawens *et al.* (1988) compararam a sensibilidade de RIAs de anticorpos de galinha e coelho para a quantificação de 1,2,5-diidroxi-vitamina D em soro ou plasma. O limite de detecção para IgY foi de 5pg/tubo, enquanto o de IgG foi de 2pg/tubo.

Cipolla *et al.* (2001) produziram anticorpos anti-*Campylobacter fetus* em galinhas e coelhos. Os dois tipos de anticorpos foram avaliados por imunofluorescência direta em dois laboratórios. Pôde ser demonstrado, então, uma eficácia comparável quanto à especificidade e sensibilidade. No entanto, IgY gerou um sinal mais “limpo” que o de IgG.

1.6.2 – Avidéz

Segundo a literatura disponível, em princípio, não há diferenças significativas entre afinidade e avidéz quando da realização de um ensaio com anticorpos (Bollen *et al.*, 1996; Woolley e Landon, 1995) e afinidade (Perez *et al.*, 1994). Avidéz está relacionada à velocidade de ligação, enquanto a afinidade corresponde à força da ligação a determinado antígeno. Perez *et al.* (1994) corroboraram em seus ensaios de radioimunoanálise a íntima relação entre afinidade e avidéz de um anticorpo. Assim, quanto mais afim de um determinado antígeno, consequentemente mais “ávido” estará o anticorpo em determinada reação.

1.7 – Vantagens do Uso de IgY

1.7.1 – Bem-estar Animal

O principal objetivo é a redução das manipulações dolorosas. Com a implantação da Tecnologia IgY, comparativamente, a manipulação dolorosa de galinhas (como extração de sangue para análise de titulação) é consideravelmente menor que a de coelhos ou cavalos na metodologia de extração de IgG.

Além disso, a produção de uma galinha corresponde à de um mamífero de médio porte, como cabras e ovelhas. Assim, uma quantidade extraordinária de anticorpos pode ser produzida por uma única galinha (de 17-35g de IgY/galinha/ano, dos quais 1-10% é IgY específica). Esta grande capacidade de produção abre “novos campos” para a Tecnologia IgY, como imunoterapia e imunoprevenção de várias infecções bacterianas e virais nas medicina veterinária e humana (Schade *et al.*, 2005).

1.7.2 – Distância Filogenética

É a razão para as diferenças descritas entre as especificidades de anticorpos de mamíferos e galinhas. Além das diferenças características entre os sistemas Imunes de aves e mamíferos, as diferenças no desenvolvimento filogenético (figura 6) destas duas classes animais contribuem para as diferenças de especificidades acima citadas. Alguns autores afirmam também que galinhas produzem anticorpos contra proteínas e peptídeos altamente conservados de mamíferos de forma mais eficiente do que coelhos. Desta forma, antígenos altamente conservados (como TGF- β 3) podem “passar despercebidos” pelo Sistema Imune de Coelhos e outros mamíferos, gerando uma “resposta silenciosa”, o que não ocorre em galinhas. Outro dado que reforça o papel da distância filogenética entre mamíferos e aves foi fornecido por Hau *et al.* (1980 e 1981): IgY produzida contra proteínas associadas à gravidez humana também reconhece proteínas associadas à gravidez murina.

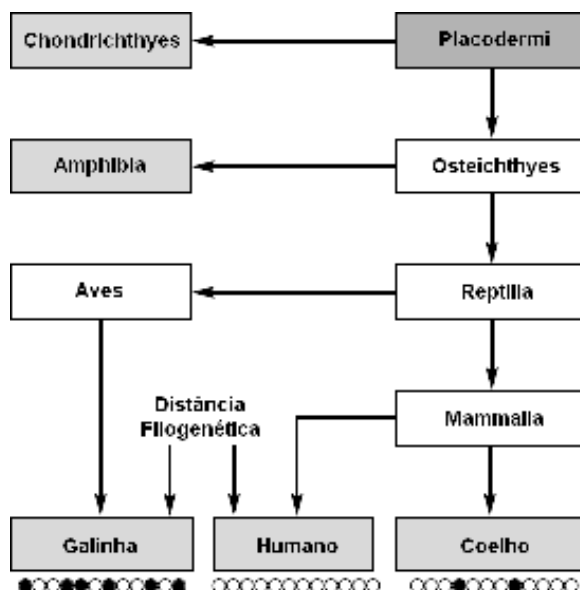


Figura 6 – Árvore filogenética dos vertebrados e distância filogenética. A cadeia de pontos representa uma proteína hipotética. Os pontos pretos representam trocas de aminoácidos. Devido à distância filogenética, observam-se mais trocas de aminoácidos em galinhas, com relação à proteína de humanos. O Sistema Imune de galinhas, mais que o de coelhos, reconhece a proteína humana como estranha. O mesmo acontece com a proteína priônica (PrP) bovina, com duas trocas de aminoácidos em ovelhas, uma em camundongos e vinte em galinhas. Adaptado de Schade *et al.* (2005).

1.7.3 – Falta de Reatividade Cruzada com Fatores Reumatóides

Fatores Reumatóides (FR) são anticorpos naturais, característicos de indivíduos com febre reumatóide, capazes de reconhecer e ligar à porção Fc de outros anticorpos de indivíduos da mesma espécie. Estes impedem a precisão de diversos exames, como ELISAs (Ensaio de Imunoadsorção Ligado à Enzima). No entanto, como IgY não tem a porção Fc correspondente à de mamíferos, não é capaz de proporcionar reatividade cruzada com Fatores Reumatóides (Schade *et al.*, 2005).

1.7.4 – Falta de Reatividade Cruzada com Anticorpos de Humanos anti-Camundongos (HAMA)

Muito utilizados em imunoensaios baseados em anticorpos monoclonais de camundongos. O desenvolvimento de outros anticorpos humanos contra diversas espécies de mamíferos tem sido reportados, como para vacas, cavalos e ovelhas (Kricka, 1999). No entanto, tal como com Fatores Reumatóides, provocam interferências e geram falsos resultados em exames como ELISAs. IgY, pelo mesmo motivo apresentado no caso dos FRs, é uma boa alternativa.

1.7.5 – Inabilidade para Ativar o Sistema Complemento de Mamíferos

IgY é capaz de ativar o Sistema Complemento em aves, mas não ativa a cascata correspondente em mamíferos (Carlander *et al.*, 2002). A escala de interferência da ativação do complemento induzida por anticorpos, por ELISA, tem sido subestimada. Como a interferência é um problema significativo, principalmente quando soro fresco é usado, o soro usado não é diluído. A troca do anticorpo de mamíferos por anticorpos de galinha pode solucionar o problema. Além disso, a diluição e estocagem das amostras de soro causam progressiva inativação do Sistema Complemento.

1.7.6 – Falta de Hetero-Aglutininas (Soro de Coombs, classificação do Grupo Sangüíneo)

Soro de Coombs é um antissoro contra imunoglobulina humana, e é usado para a detecção de anticorpos humanos incompletos. É usualmente produzido em mamíferos e pode conter hetero-aglutininas, que podem interferir com o sistema de detecção correspondente. Calzado *et al.* (2003) demonstraram que o uso de IgY com especificidade contra IgG humana sem hetero-aglutininas é uma boa opção. Os

mesmos autores obtiveram sucesso na classificação do grupo sanguíneo humano com IgY.

	IgG de Coelho	IgY de Galinha
Amostra de anticorpo	invasivo	não-invasivo
Quantidade da amostra	200mg/40ml de sangue	50-100mg/ovo 5-7 ovos/semana
Quantidade de anticorpos/mês	200mg	1000-2800mg
Interferência com imunoglobulinas de mamíferos (fatores reumatóides)	sim	não
Interferência com HAMA	sim	não
Interferência com Complemento de mamíferos	sim	não
Ligante de proteína A/G	sim	não

Tabela 2 – Diferenças gerais entre IgG de Coelho e IgY de Galinha. Adaptado de Schade *et al.* (2005).

1.8 – Aplicações de IgY na Pesquisa Biomédica, Medicina Humana e Veterinária

Várias publicações têm descrito o sucesso do uso de anticorpos IgY em uma variedade de campos de pesquisa. Imunoensaios baseados em IgY têm sido usados para mensurar a concentração de proteínas ou peptídeos por ELISA, RIA e outros ensaios em análises clínicas e pesquisa básica. Eles também têm sido usados com sucesso em imunohistoquímica para detecção de antígenos virais, bacterianos, animais e de plantas, medir a incidência de parasitas intestinais e contaminação de comida com toxinas ou drogas. Também têm sido gerados anticorpos (IgY) neutralizantes contra *Escherichia coli*, retrovírus, coronavírus, parvovírus, venenos de diversas serpentes e outros animais peçonhentos, dentre outros.

1.8.1 – Serpentes e Acidentes com Humanos

O conceito de serpente venenosa baseia-se na existência de uma glândula de veneno relativamente aperfeiçoada e capaz de secretar veneno no animal analisado. A partir de tal análise, fatores como dentição da serpente, tamanho médio da espécie e toxicidade do veneno, determinam o nível de periculosidade da mesma.

No continente africano, existem duas grandes famílias: os Elapídeos, caracterizados por veneno neurotóxico e dentição proteróglifa (Najas são os membros mais conhecidos); e os Viperídeos, caracterizados por veneno hemolítico (com algumas exceções) e dentição solenóglifa (os membros desta família, tais como as víboras e crotalíneos, são serpentes com veneno altamente tóxico e diversos hábitos, como terrestres, semiaquáticas, arborícolas e subterrâneas) (Venom Supplies Pty Ltda., 2007).

Os países africanos, tais como São Tomé, Angola e Moçambique, não são providos de infra-estrutura básica (saneamento básico, moradia, transporte público, dentre outros aspectos), e a população (além de animais domésticos e de interesse comercial) tem um contato maior com este tipo de animais, levando a uma alta incidência de acidentes. No entanto, pela situação econômica destes países, muitos não têm a capacidade financeira para adquirir soros antiofídicos, ou mesmo produzi-los.

Dados não-oficiais obtidos pelo Dr. Wilmar Dias da Silva junto ao Museu de Maputo (Moçambique) apontam as 10 serpentes “mais perigosas” do continente (em número de acidentes), dentre as quais constam: *Bitis arietans* (a víbora do Gabão, com hábitat peridomiciliar, responsável por cerca de 80% dos acidentes na África sub-saariana), *Bitis nasicornis* (a víbora dos três chifres), *Bitis rhinoceros*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*.

Em parceria com o Instituto Butantan, apoiado pelo Pró-África CNPq, a UENF tem produzido anticorpos IgY a partir de imunizações de galinhas com os venenos das serpentes supracitadas, com os objetivos de auxílio humanitário e implantação de tecnologia no continente africano. O projeto é coordenado pelo Dr. Wilmar Dias

da Silva e encontra-se em desenvolvimento. Os anticorpos gerados e extraídos são utilizados na formação de dois soros antiofídicos gerais, específicos para os grupos *Bitis* e *Naja*. Atualmente, estes são utilizados no tratamento eficaz de animais de interesse econômico acidentados. A utilização de IgY em humanos para o tratamento deste tipo de acidentes está em processo de implantação, visto os benefícios do uso desta molécula.

No Brasil, os acidentes envolvendo serpentes venenosas também são frequentes em regiões rurais. Dois grupos merecem um foco especial quanto à produção de soros antivenenos: botrópico, responsável por 68,8% dos acidentes registrados pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/MS); e crotálico, responsável por 7,2% dos 25.478 acidentes registrados em 2004. O veneno crotálico, por suas características neurotóxicas, merece atenção especial. Em parceria com o Instituto Butantan, nosso laboratório também produz anticorpos IgY anti-toxinas de veneno crotálico, sob coordenação do Dr. Wilmar Dias da Silva, e a produção é destinada à utilização no tratamento de acidentados das áreas consideradas críticas.

1.9.2 – Características Gerais da *Bitis arietans*

Também conhecida como Víbora do Gabão e Víbora ligeira, *Bitis arietans* é encontrada em toda a África subsaariana (figura 7). Com hábitat preferencial em pastos e savanas, podendo ocupar arbustos de médio porte, é uma serpente peridomiciliar típica (Venom Supplies Pty Ltda., 2007), uma vez que a região supracitada não apresenta as condições sanitárias básicas (visto a saúde financeira dos países em questão, como Angola, São Tomé, Moçambique, dentre outros). Assim, apesar da não-existência de uma contagem oficial de casos, os acidentes são corriqueiros – e pela falta de condições para um tratamento adequado, levam a um considerável número de óbitos.



Figura 7 – Distribuição geográfica da *Bitis arietans* no continente africano.

Seu veneno, altamente complexo, é composto basicamente por metaloproteinases, como a bitiscetina e a bitiscetina-2 (responsáveis pela degradação de laminina, fibronectina, componentes do colágeno IV e junções entre células endoteliais), fosfolipase A₂ miotóxica e hialuronidases (Warrel *et al.*, 1975; Hobert *et al.*, 2006).

Os acidentes provocados por *Bitis arietans* tem por característica uma forte necrose local (figura 8), febre e vômito. Além destes aspectos gerais, podem ser observados trombose, hemorragia sistêmica, epistaxe, hipotensão, depressão miocárdica, vasodilatação, taquicardia e bradicardia. Em nível celular, por sua vez, são comuns leucocitose de neutrófilos, anemia, hemólise microangiopática e trombocitopenia. A capacidade de coagulação do sangue, no entanto, parece não ser significativamente alterada.



Figura 8 – Criança picada por *Bitis arietans* na região palmar. A – após 1 hora; B – após 8 horas, sem tratamento; C – dias após, com o devido tratamento, sem sequelas aparentes. Adaptado de Warrel et al., 1975

1.8.3 – Características Gerais da *Crotalus durissus terrificus*

Também conhecida como cascavel sul-americana, é uma espécie típica da zona tropical sul-americana, frequentemente encontrada no sul brasileiro – principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, onde são registrados o maior número de acidentes.

Por ter como hábitat as regiões de pasto e savana, os acidentes envolvendo *Crotalus durissus* spp. (com destaque especial para a subespécie *terrificus*) são corriqueiros em determinadas regiões, correspondendo a aproximadamente 10% dos acidentes registrados em 2001 pelo Ministério da Saúde (Sano-Martins et al., 2001). No entanto, com a taxa de letalidade de 1,9% dos casos relatados, a maior observada dentre os gêneros de serpentes brasileiras, *Crotalus durissus terrificus* ganha destacada importância dentre as demais espécies (Bucaretychi et al., 2002).

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* contém uma variedade de proteínas tóxicas, incluindo crotamina, crotoxina, giroxina, convulxina, fator agregador de plaquetas (PAF) e enzima semelhante à trombina (TLE). Clinicamente, a crotoxina – uma potente neurotoxina pré-sináptica, composta por uma subunidade fosfolipase A₂ covalentemente ligada a uma proteína ácida estrutural (crotapotina) – ganha particular destaque, visto o pronunciado bloqueio neuromuscular provocado por sua atividade sobre as junções neuromusculares, que gradativamente conduzem à paralisia flácida (síndrome miastênica aguda) de intensidade variável. Não obstante, casos de rabdomiólise (injúria das fibras musculares esqueléticas dos tipos I e IIA, levando à mialgia – aumento massivo de mioglobulina sérica e creatino-quinase – e mioglobinúria) também são observados em decorrência da atividade oxidativa da toxina (Oguiura *et al.*, 2000; Sano-Martins *et al.*, 2001; Bucarechi *et al.*, 2002; Beghini *et al.*, 2008).

Outros efeitos degenerativos também podem ser observados em pacientes envenenados. Hipofibrinogenemia causada por TLE leva à incoagulabilidade parcial ou completa. Afibrinogenemia e trombocitopenia – raramente observada – são decorrentes do efeito do PAF. Minton & Minton (1971) sugerem que a paralisia dos músculos flexores cervicais, característica marcante em indivíduos acidentados, é um sinal da atividade da crotamina.

Os sintomas locais da picada são inchaço, parestesia (formigamento ou anestesia) e eritema (figura 9), mas com pouca ou nenhuma necrose. O envenenamento sistêmico é caracterizado por ptose simétrica, oftalmoplegia externa, diplopia e paralisia facial, resultado das atividades neurotóxica e miopática. Ainda podem ser observadas taquicardia, diaforese, anisocoria e falha renal aguda. Em casos fatais, pode ser observada midríase. Raramente, o envolvimento do diafragma envolve falha respiratória. Distúrbios na coagulação sanguínea, no entanto, envolvem cerca de 50% dos pacientes envenenados (Sano-Martins *et al.*, 2001; Bucarechi *et al.*, 2002).

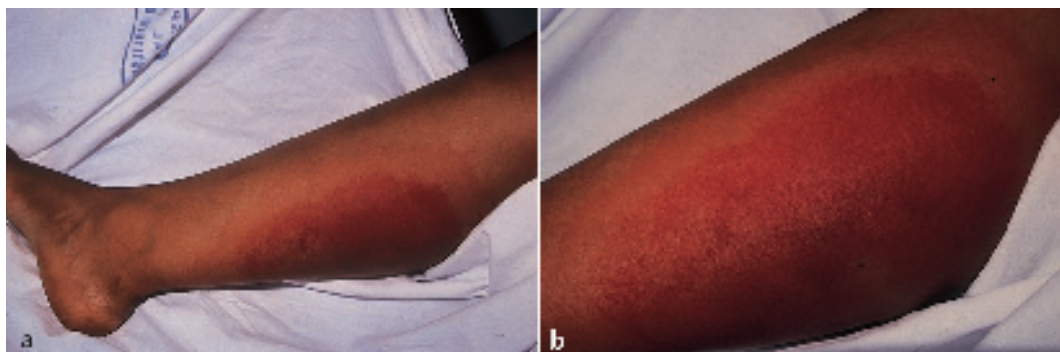


Figura 9 – Eritema extensivo em paciente, 3 horas após a picada por *Crotalus durissus terrificus* no Estado de São Paulo.

Em nível celular, os macrófagos têm sua atividade consideravelmente alterada. Segundo Cruz *et al.* (2005), em camundongos da linhagem BALB/c, a citotoxicidade celular foi consideravelmente incrementada (com uma dosagem de 25µg/ml de veneno) e a capacidade fagocítica reduzida, tal como a taxa de circulação (espalhamento). Também foi observado aumento na produção de H₂O₂ e de NO. A produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, também foi notada, com picos de produção em 48 e 24 horas respectivamente, seguido de decréscimo. O nível de INF-γ – citocina-chave na resposta contra patógenos intracelulares – também foi elevado. Já a produção de IL-10, uma citocina de atividade caracteristicamente antiinflamatória em macrófagos e células dendríticas (antagonista de IL-1, IL-6 e TNF-α), não foi significativamente alterada. Sampaio *et al.* (2003) observaram também um aumento significativo no metabolismo de glicose e glutamina, e postularam que tais efeitos, seguidos da redução da capacidade fagocítica e de circulação dos macrófagos, são resultados relacionados à atividade da crotoxina.



2 - OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

2.1 – Objetivo Geral

Este projeto tem por objetivo a obtenção da sequência de aminoácidos constituinte da porção variável das cadeias leve e pesada de anticorpos IgY de galinhas (*Gallus gallus*) antiveneno de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus*, de alta afinidade, a partir de análises moleculares de amostras sanguíneas dos animais imunizados, possibilitando análises futuras de variabilidade e seleção de clones desejáveis para a montagem de soros antiofídicos.

2.2 – Objetivos Específicos

- Imunização das aves para a obtenção de anticorpos IgY e seus mRNAs.
- Coleta dos ovos e análise dos anticorpos da gema para avaliação de afinidade dos mesmos.
- Desenvolvimento de um protocolo de obtenção da sequência de mRNA correspondente às porções variáveis das cadeias leve e pesada dos anticorpos IgY a partir de amostras de sangue, coletadas a cada ponto de imunização.
- Amplificação das sequências obtidas por PCR.
- Clonagem das sequências obtidas e transformação de bactérias competentes para a posterior seleção de clones isolados das porções variáveis de anticorpos.
- Sequenciamento dos clones isolados e análise por BLAST para validação das sequências.
- Modelagem molecular das sequências, visando a formação de scFvs (Frações variáveis de cadeia simples).

2.3 – Justificativa

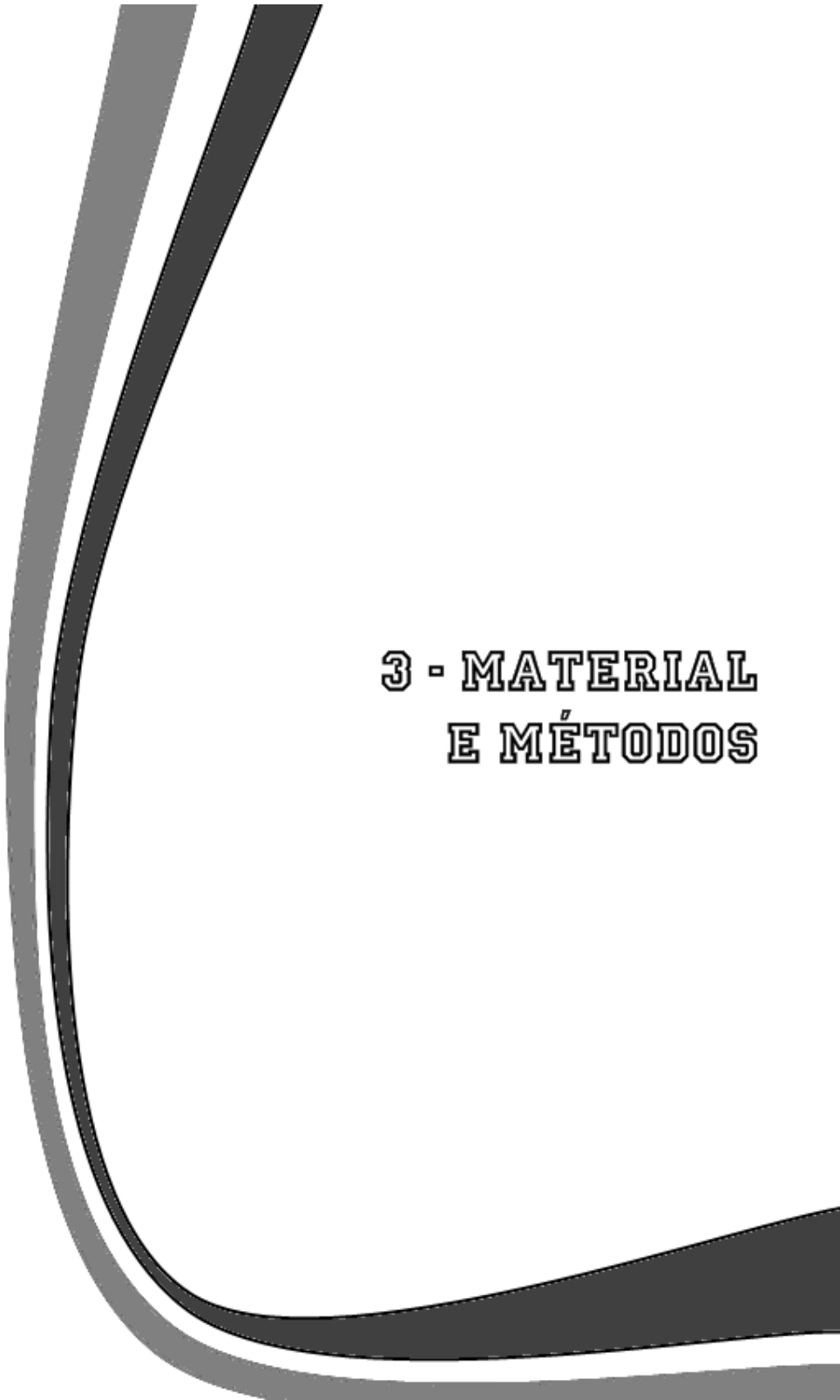
O primeiro antiveneno usado com sucesso no tratamento de acidentados por animais peçonhentos foi produzido por Albert Calmette, no final do século XIX. O método estabelecido – e, apesar dos avanços na imunologia, até hoje utilizado – para preparar antivenenos foi introduzido no Brasil por Vital Brazil no início do século XX e posteriormente aperfeiçoado por outros pesquisadores. A primeira solução testada para imunizar animais com base em IgY, por sua vez, também foi no final do século XIX. No entanto, pela simplicidade do experimento, caiu no esquecimento científico por anos, voltando a ser citado apenas em 1959, por Russel e Burch.

Os antivenenos aprovados pela OMS e pelos órgãos de saúde dos diferentes países, de uso corrente, são produzidos em animais hiperimunizados com veneno integral colhido de animais peçonhentos, incluído em adjuvantes. Apesar da grande heterogeneidade entre as diversas subunidades dos venenos animais, o número de componentes tóxicos restringe-se a uma pequena fração dos mesmos. Isto significa que a imunização com o veneno integral induz tanto a formação de clones de anticorpos específicos contra frações tóxicas do veneno como a formação de clones de anticorpos desnecessários. A esta última população de anticorpos acresce-se uma população de anticorpos dirigidos para domínios atóxicos das proteínas tóxicas. Anticorpos que apresentam outras especificidades, somados às proteínas que escapam no processo de purificação e contaminam a preparação final do antiveneno, respondem pelos riscos de indução das reações adversas imediatas e tardias.

Além disso, os antivenenos produzidos hoje são um *pool* de IgGs de mamíferos. Em relação à utilização de IgY, seu correspondente funcional em aves, a similaridade no tangente à avidéz e afinidade apresenta este segundo como um excelente método alternativo de produção. No entanto, segundo Hau *et al.* (1980 e 1981), IgY de galinha é mais eficiente no reconhecimento de antígenos altamente conservados de mamíferos que IgG, por uma simples questão de distância filogenética dos grupos. Schade *et al.* (2005) ainda afirma que, por ser mais

hidrofóbica que IgG, a ligação de IgY ao antígeno é mais estável (Davalos-Pantoja *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001).

A partir da tecnologia de produção de porções variáveis de cadeia simples (scFvs), aplicada para a minimização de reações secundárias em testes com base em moléculas de IgG, a produção de soros pode ter um *upgrade* em tecnologia e qualidade do produto final. Com a aplicação da técnica em IgY, reconhecidamente mais afim de antígenos altamente conservados (como venenos) que moléculas de IgG, a produção de soros poderá ser feita apenas com a seleção molecular de clones de anticorpos úteis para a montagem de soros de alta afinidade e sem reações adversas à sua aplicação no tratamento de acidentados. Outra vantagem desta aplicação, além do avanço tecnológico e médico, é o bem-estar animal, visto que aves não mais precisariam ser imunizadas, e a produção de anticorpos dependeria apenas de um sistema confiável de expressão protéica, mais uma garantia de qualidade do produto final. No entanto, para atingirmos tal estágio, dependemos da obtenção da sequência gênica dos anticorpos IgY, inexistente no GeneBank, e da criação de um protocolo estável para o acompanhamento de galinhas imunizadas e coleta de mRNA em pontos pré-definidos (também inexistente, visto que os protocolos disponíveis para tal fim, hoje, dependem da coleta do baço das galinhas imunizadas e, portanto, da eutanásia das mesmas), possibilitando a futura criação de uma biblioteca de sequências de anticorpos e o desenvolvimento completo da técnica descrita, além da disponibilização de novas sequências no banco de dados.



3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Imunização das Aves

As aves, da linhagem não-isogênica Hysex Brown, foram adquiridas com 3 meses de idade e mantidas sob condições adequadas em nosso biotério especializado (aviário/CBB – P4). Para as imunizações, foi aguardado o início da postura, com cerca de seis meses de vida, característica distintiva do início da fase adulta das mesmas. Estas foram então divididas em grupos de cinco: um grupo controle e outros dois imunizados com o veneno de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus*. Segundo as recomendações do ECVAM Meeting de 1996, a primeira imunização foi realizada com o uso de um adjuvante completo – Montanide ISA 720 (SEPPIC, Paris) suplementado com BCG. A segunda, por sua vez, teve a utilização do Adjuvante Montanide ISA 720 incompleto e, a partir da terceira, o veneno foi diluído apenas em PBS.

As aves imunizadas com o veneno de *Bitis arietans* receberam 20 µg deste por imunização; as imunizadas com o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, por sua vez, receberam 50 µg. As galinhas foram acompanhadas diariamente, para a verificação da produção de ovos e do bem-estar das mesmas.



Figura 10 - Fotografia do biotério de aves (aviário)-CBB-UENF.

As galinhas foram acomodadas em gaiolas individuais, com acesso livre à ração (em calhas de zinco) e água, sempre mantendo contato com as companheiras.

3.2 – Coleta de Material

Os ovos coletados, por todo o período de imunização das aves, para a extração de anticorpos IgY da gema, e armazenados a 4°C.

Amostras de sangue foram coletadas periodicamente e armazenadas, após a terceira imunização das aves (período onde, segundo Almeida *et al.* – 2008 – as aves começam a desenvolver uma melhor resposta imune ao antígeno pretendido), para a extração de mRNA. O sangue foi armazenado com 350 µl de tampão RA1 (Quick Prep Total RNA Extraction Kit, GE Healthcare), até o devido manufaturamento e análise das sequências-alvo.

Análises do Baço foram feitas a partir de extrações de mRNA do órgão macerado, para a comparação com os dados obtidos a partir da coleta de mRNA a partir do sangue. Para tanto, as aves foram sacrificadas periodicamente, uma por vez, para extração do baço, enriquecimento das células B no *pool* e subsequente obtenção das moléculas-alvo. Neste caso, até a devida utilização do órgão, o mesmo foi armazenado a -80°C em TRIzol.

3.3 – Obtenção das moléculas de IgY

As gemas foram previamente separadas da clara e lavadas com água destilada (H₂O_{dd}). A gema então foi retirada por punção com pipeta Pasteur e transferido para *beckers* estéreis. Em seguida, foram armazenadas a -20°C, ou diluídos com água destilada na proporção de 1:10 e acidificada (até atingir pH 5,0). A solução de gema foi deixada em repouso por um período de 14-16h (*overnight*) a

4°C (neste ponto ocorre a separação da porção lipídica da gema, que é descartada). O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000g por 30 min. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio, sob agitação, até atingir 29% de saturação. A solução foi mantida em temperatura ambiente, com pH reajustado para 7,4-7,5, sob agitação por 2h, e recentrifugada a 10.000g por 30 min (Almeida *et al.*, 1998). O material resultante passou por um processo de diálise, para purificação do anticorpo, seguido de aliquotamento e armazenagem a 4°C, para análises posteriores.

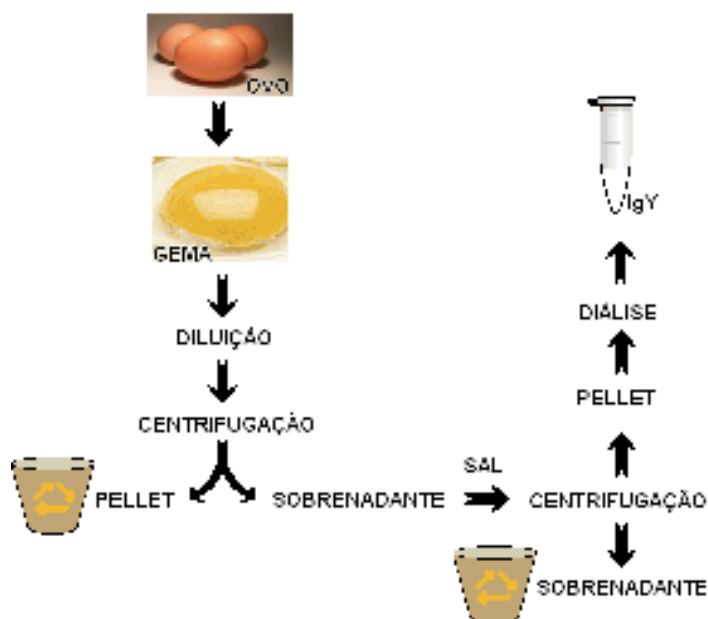


Figura 11 - Fluxograma para a obtenção e purificação de IgY de galinha(*Gallus gallus*).

3.4 – Quantificação de Proteínas

O conteúdo protéico da solução contendo IgY purificada foi determinado pelo método do ácido bicinonínico (BCA - adaptado de Lowry, 1959), utilizando BSA (Albumina Sérica Bovina) para gerar a curva padrão de análise.

3.5 – Análise em SDS-PAGE Desnaturante

Foram separadas amostras da solução contendo IgY após o processo de diálise, e estas submetidas a SDS-PAGE 12% com gel contendo acrilamida (Laemmli, 1970). As amostras foram então preparadas em tampão de amostra, aplicadas no gel em volumes pré-definidos, e submetidas à uma corrente/amperagem iniciais de 80V/400mA por 80 a 100 min (PowerPac Basic, Bio-Rad). Após a corrida, o gel foi corado com Azul de Coomassie (Hoefer Caliber) e descorado em seguida.

3.6 – Detecção por Western Blotting

Amostras da solução acima descrita foram submetidas à eletroforese desnaturante (descrita acima). O gel foi submetido à etapa de eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose de 0,45µm (Millipore) segundo metodologia descrita por Towbin (1979).

O gel, a membrana de nitrocelulose e os outros componentes do sistema de transferência úmida foram imersos em tampão de transferência previamente resfriado a 4°C. O equipamento usado para esta etapa foi o *Mini Trans Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). O sistema montado foi submetido a uma corrente/amperagem de 10V/400mA por 2h. Após o processo de transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada por vermelho de Ponceau a 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) para verificar o sucesso da etapa, e descorada com água destilada. Em seguida, a membrana foi imersa em uma solução bloqueadora (PBS + 0,1% Tween + 5 % Leite em pó desnatado) *overnight* a 4 °C (ou 1h a temperatura ambiente). Passado este período, a membrana foi incubada com IgY específico das aves imunizadas sob agitação constante por 2h, a temperatura ambiente. Logo após, a membrana foi lavada 4 vezes com PBST 0,1 (PBS pH 7,4 + 0,1 % Tween 20) e incubada com o segundo anticorpo, IgG de carneiro conjugado com peroxidase anti-IgY de galinha

(Calbiochem-Novabiochem Corp. – Califórnia, USA) diluído 800 vezes (em PBST), e incubado por 1h em temperatura ambiente. Depois, foram feitas mais 4 lavagens com PBST e a reação foi revelada com DAB (3,3'diaminobenzidina – Sigma Chemical Co.). A reação foi parada pela adição de água quando o perfil do material detectado foi visualizado na coloração castanha.

3.7 – ELISA dos Soros e das Preparações de IgY Purificadas

As placas de ELISA (96 poços, Microlon 200 – Greiner, ALE) foram sensibilizadas com o veneno específico (1µg/poço), em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, por um período de 14-16h a 4 °C. Em seguida, os poços foram lavados com PBST 0,05 (PBS 1X + 0,05 % Tween, pH 7,4) e bloqueados com PBS 1X (NaCl, Na₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄ – pH 7,2) com 1% de Gelatina por 1h a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST 0,05 e os poços preenchidos com 100 µl de soro ou preparações contendo IgY purificada, com seus respectivos controles, em diluições variando entre 1:1.000 e 1:40.000 (IgY) e entre 1:100 e 1:12.800 (soro), em solução bloqueadora, por 45 min a 37 °C. Subsequentemente, nova lavagem com PBST-1 e incubados por 45 min (a 37 °C) com 50 µl de anticorpo secundário (IgG de carneiro anti-IgY conjugado com peroxidase, Calbiochem-Novabiochem Corp.) na diluição de 1:500. Finalizando, a reação foi revelada pela adição de 50µl de solução ácida com substrato enzimático contendo água oxigenada (H₂O₂) OPD (ortofenildiamida, Sigma Chemical Co.) e submetida a incubação em temperatura ambiente por 10-15 min, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de 50µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 3N. As placas foram lidas no espectrofotômetro (Dynatech MR 5000, ENG) a 492nm.

3.8 – Análise Qualitativa do Anticorpo

A IgY obtida foi verificada em SDS-PAGE para a análise de integridade molecular. Com o material em estado satisfatório, este foi dividido em diluições sequenciais para análise de reconhecimento e neutralização do veneno específico em ensaios de ELISA indireto. Segundo Almeida *et al.* (2008), resultados inferiores a 0,1 de absorbância óptica indicam uma neutralização ineficiente ou inexistente; resultados iguais ou superiores a 0,2, por sua vez, passam a ser considerados para as análises de potência e afinidade, sendo portanto um limiar qualitativo. Estes resultados foram posteriormente avaliados a partir do cálculo da unidade de ELISA (U-ELISA), para indicar os níveis comparativos de afinidade e avides em relação à quantidade de anticorpos.

$$\text{U-ELISA} = \{[(\text{DO} - 0,200) \cdot (\text{Dil}) / \text{DO}] \cdot 10, \text{ onde}$$

DO = Densidade Óptica; Dil = Diluição utilizada.

Esta fórmula, arbitrária, possibilita a quantificação da molaridade dos anticorpos presentes no sistema analisado. Este dado é essencial para a análise da constante de afinidade dos anticorpos em relação ao veneno estudado.

Com tais constantes em mãos, a validação do resultado foi conferida através de uma modificação do modelo de equilíbrio de diálise, apresentado por Eisen em 1970, onde também podemos inferir a avides das moléculas em questão. Em placas de ELISA, foram avaliadas as taxas de neutralização dos anticorpos em função do tempo.

Após tal validação, foi avaliada a taxa mínima (concentração) de anticorpos necessária para a neutralização eficaz de 5 DL₅₀.

3.9 – Ensaio de Imunoproteção

Camundongos da linhagem Swiss (SW) foram separados em três grupos por veneno aplicado: um controle negativo, que não recebe IgY para imunoproteção; e dois grupos com a imunoproteção de IgY (3ª e 9ª imunizações).

Os animais foram inoculados com soluções de 600µl dos venenos (0,34 mg/ml) diluídos em solução salina (0,9 % NaCl) estéril. O grupos imunoprotegidos receberam uma dose de 600µl de uma solução P (2,4ml de veneno a 0,34mg/ml diluído em salina + 2,4ml de IgY específica a 10mg/ml diluído em salina).

3.10 – Obtenção do mRNA e Análise por PCR

Ao sangue foram adicionadas 15 UI de heparina e imediatamente levado para tratamento. A partir de um gradiente de Ficoll-Paque plus, onde as células foram separadas por densidade, separamos os leucócitos e, a partir destes, continuamos o protocolo de extração de mRNA.

Com o baço, o tratamento foi ligeiramente diferenciado. Assim que foi retirado, o órgão foi dividido em 2 partes e armazenado a -80°C com TRIzol. Na hora do uso, apenas uma das bandas foi usada (a outra segue armazenada para o caso de erros no processamento). O órgão foi então cortado em pequenos cubos, macerado em N₂ líquido, e as células foram separadas em gradiente de densidade por Ficoll-Paque plus. A partir deste passo, o protocolo seguido foi o mesmo usado para o material sanguíneo.

Com a utilização do “Quick Prep Total RNA Extraction Kit” (GE Healthcare), o RNA das células foi extraído. Neste passo, o experimento foi interrompido e os os leucócitos tamponados foram armazenados a -20°C com o reagente RA1 do kit (como anteriormente mencionado), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Uma vez extraído, o RNA foi armazenado a -80°C. Por se tratar de uma molécula de alto grau de degradação quando em meio aquoso, o congelamento

foi feito na menor escala de tempo possível. O próximo passo foi a transformação destes em cDNA, mais estável e necessário para os passos seguintes. No processo, com a utilização do “illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads” (GE Healthcare), o primer usado foi um poli-T (de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, que permite o descarte do RNA que é desnecessário ao experimento – rRNA – ao amplificar somente o mRNA, transformando-o em cDNA).

Com o cDNA pronto, o protocolo segue com a PCR. Neste ponto, usamos o “illustra Ready-To-Go PCR Beads” (GE Healthcare), nas seguintes condições: 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, seguidos de extensão final de 5 minutos a 72°C. Os primers usados para a amplificação da região de interesse (porção variável das cadeias leve e pesada dos anticorpos IgY) – VHF1/VHR1e VLF1/VLR1 – foram obtidos a partir de estudo realizado por Chiliza *et al.* (2008).

PRIMER	SEQUÊNCIA
VLF1	GACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAG
VLR1	TGATGGTGGCGGCCGCATTGGGCTG
VHF1	CTGATGGCGGCCGTGACGTTGGAC
VHR1	CCGCCTCCGGAGGAGACGATGACTTCG

Tabela 3 – *Primers* utilizados para a amplificação das sequências-alvo.

Os produtos esperados (aproximadamente 330 e 390 pares de base para as cadeias leve e pesada, respectivamente) foram avaliados em gel de agarose 2% e purificados com o kit illustra MicroSpin S-300 HR Columns (GE Healthcare).

3.11 – Bactérias Competentes

Bactérias precisam ser capacitadas para receber vetores e mantê-los internalizados, em processo de replicação. Neste caso, usamos a cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Coletamos 1 colônia da cepa em STAB (Extrato de Carne, Bacto-Triptona, NaCl, Na₂HPO₄, Ágar) e inoculamos em 5 ml de meio LB (Luria Bertani) líquido, incubando-as a 37°C, *overnight*. Um volume de 120 μ l do cultivado foi colhido e inoculado em 12 ml de meio LB líquido. Incubamos sob forte agitação (cerca de 150 rpm) a 37°C por 2 h, até atingir uma D. O. (600 nm) entre 0,3 e 0,4. As células foram centrifugadas a 2.500 g por 15 min a 4°C. A partir desta etapa, as células não podem sofrer traumas, como agitações fortes. O sobrenadante foi descartado, e as bactérias foram ressuspendidas em 6 ml de tampão Tris-Cálcio. As células foram incubadas por 30 min em gelo, seguida de nova centrifugação, a 2.000 g por 15 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspendido em 1 ml de tampão Tris-Cálcio, e adicionado de glicerol. As bactérias competentes foram então armazenadas em N₂ líquido, em alíquotas de 200 μ l, até a devida utilização.

3.12 – Seleção Clonal e Sequenciamento

Com a PCR concluída, passamos ao ponto de transformação das bactérias competentes e seleção clonal. Para tanto, inserimos a sequência amplificada no vetor “pGEM T Easy” (Promega), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, transformamos DH5 α competentes com o produto obtido. Neste passo, as bactérias (em 200 μ l de meio LB com glicerol, previamente estocadas em N₂ líquido) foram incubadas por 30 min em gelo. O vetor foi adicionado, e o sistema passou por um choque térmico (42°C por 30 s, seguido de incubação em gelo por 90 s). Após a adição de 800 μ l de meio LB, incubamos a 37°C por 1h. Uma vez transformadas, as DH5 α foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 μ g/ml de Ampicilina (agente de seleção indicado pelo fabricante do vetor) e X-Gal (cromóforo indicador de transformação de bactérias) *overnight*, e

colônias simples selecionadas foram coletadas e recultivadas em meio LB líquido *overnight*.

Os plasmídeos foram recuperados a partir do uso do “GeneJet Extraction Kit” (Fermentas), e a sequência-alvo foi separada do plasmídeo a partir de ensaio de digestão com a enzima EcoRI (Fermentas), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante da enzima.

O material foi então levado para o sequenciamento. Esta reação assemelha-se a uma PCR, pois amplifica a sequência-alvo a partir do uso de um primer (específico para sequenciamento), dNTPs e uma polimerase. Neste caso, a grande diferença está na presença de ddNTPs (dNTPs terminadores de sequência e marcados com fluorescência). Uma vez terminada a amplificação, o produto é purificado para a retirada de sais, nucleotídeos e primers, em protocolo baseado na precipitação por isopropanol 60%, lavagem do material com etanol 70%, secagem a 60°C por 10 min e ressuspensão em formamida. O material puro foi então submetido à uma eletroforese de capilar e lido pelo sequenciador automático de DNA.

Com o sequenciamento completo, a sequência obtida foi importada para um programa de análise, onde possíveis proteínas resultantes foram mostradas. Então, estas foram avaliadas em BLASTp para a validação da sequência correta. Uma vez em posse da sequência correta, a modelagem da mesma pode ser feita.

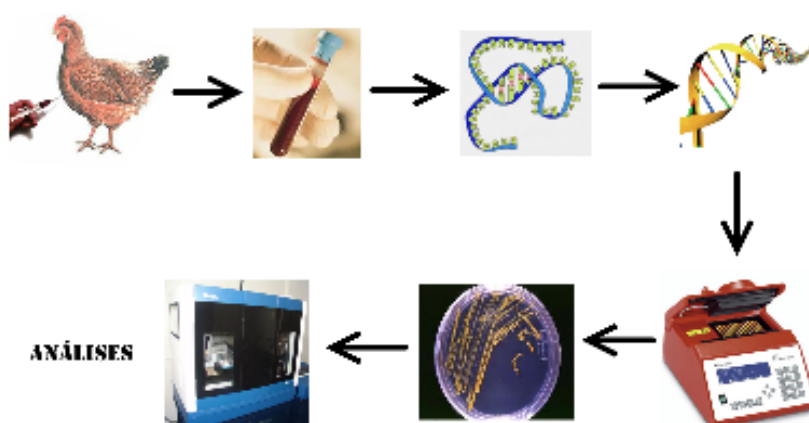


Figura 12 – Delineamento experimental da obtenção e análise das sequências-alvo.

3.13 – Modelagem Molecular por Homologia Estrutural

A estratégia baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na sequência, em geral, resultam apenas em modificações sutis na estrutura tridimensional. Quando uma sequência homóloga para a qual a estrutura resolvida esteja disponível é encontrada, como no caso observado entre as estruturas de IgY e IgG, o método de escolha para a predição da estrutura tridimensional de uma proteína-alvo é a própria modelagem comparativa ou por homologia (Höltje *et al.*, 2003).

Esta estratégia foi constituída por quatro passos básicos: busca de proteínas homólogas (conhecimento estrutural, similaridade funcional, expressão pelo mesmo *set* gênico ou correlação evolutiva. O molde usado foi a estrutura do anticorpo IgG-F10 – pdb 3 FKU, Wang *et al.*, 2009), alinhamento das sequências (correlação ótima dos resíduos de aminoácidos de cada sequência, com pelo menos 30% de identidade), construção e otimização dos modelos (Modeller – Marti-Renom *et al.*, 2002 – usando o comando ALIGN2D; a otimização molecular se deu basicamente pela aplicação de um campo de força, a mecânica molecular), e a validação dos mesmos (o Procheck – Laskowski *et al.*, 1993 – avaliou diversos parâmetros estereoquímicos, como ângulos torsionais da cadeia principal, das cadeias laterais, maus contatos estéricos, energia das ligações de hidrogênio, planaridade das ligações peptídicas, desvios em relação à geometria tetraédrica dos carbonos- α , dentre outros. Para a observação das estruturas protéicas foi usado o NOCN) (Hillish *et al.*, 2003).



4 - RESULTADOS

4.1 – Avaliação dos Venenos em Uso

A integridade dos venenos de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus* foi analisada pelo perfil eletroforético em SDS-PAGE 15% (figura 13), e o material não apresentou sinal de degradação.

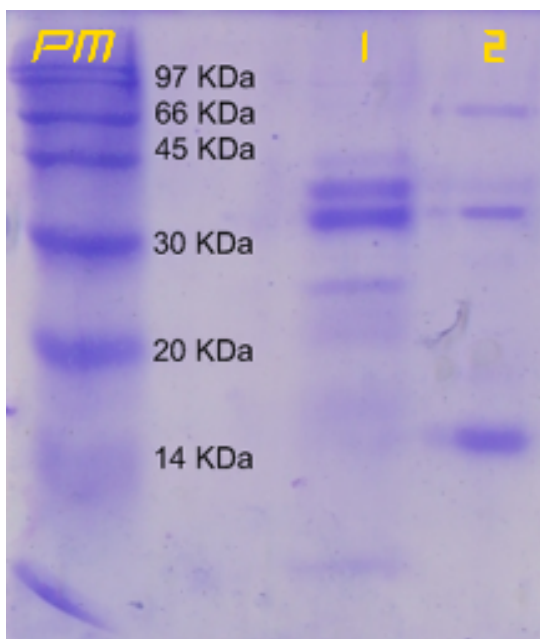


Figura 13 – Análise em SDS-PAGE 15% do perfil eletroforético dos venenos em estudo. 1 – *Bitis arietans*; 2 – *Crotalus durissus terrificus*; PM – Peso Molecular.

4.2 – Avaliação do Processo de Imunizações por ELISA

Para a análise do comportamento e reação das aves pós-imunização, quatro galinhas foram escolhidas ao acaso e receberam a primeira dose do respectivo veneno. Após uma semana de observação, as mesmas não apresentaram mudanças fisio-comportamentais significativas, descartando assim possíveis intoxicações decorrentes do processo. As imunizações foram efetuadas com intervalos de vinte e um dias, conforme apresentado na tabela 4.

IMUNIZAÇÃO	DATA
1	02/mar
2	23/mar
3	13/abr
4	04/mai
5	25/mai
6	15/jun
7	06/jul
8	27/jul
9	17/ago
10	07/set

Tabela 4 – Datas referentes à imunização das aves. Ano: 2009.

Como indicado em estudos anteriores do grupo (Almeida *et al.*, 2008), um total de nove imunizações foram necessárias para a obtenção de um anticorpo com qualidade suficiente para seu uso na produção de soros antiofídicos. Com base em tal dado, foram realizadas dez imunizações. Os anticorpos foram extraídos da gema dos ovos através do protocolo de precipitação com sulfato de amônio e diálise em salina, e a integridade foi avaliada pelo perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% (figura 14).

A avaliação funcional do anticorpos obtidos foi feita por *Western blotting*, onde os mesmos reconheceram os respectivos venenos previamente transferidos para uma membrana de nitrocelulose (figura 14).

Os anticorpos obtidos ao longo das imunizações foram armazenados a -20°C. Uma alíquota de cada solução dialisada de anticorpos (das diferentes imunizações) foi utilizada no ensaio de ELISA, para análises de afinidade (figura 15) e avidéz. As amostras foram normalizadas e diluídas, visando os cálculos de U-ELISA e utilizando-se um limiar de reconhecimento efetivo 0,2 de absorbância (Almeida *et al.*, 2008). Foi considerado como resultado final a média de dois ELISAs idênticos, com amostras em triplicatas (Figura 16).

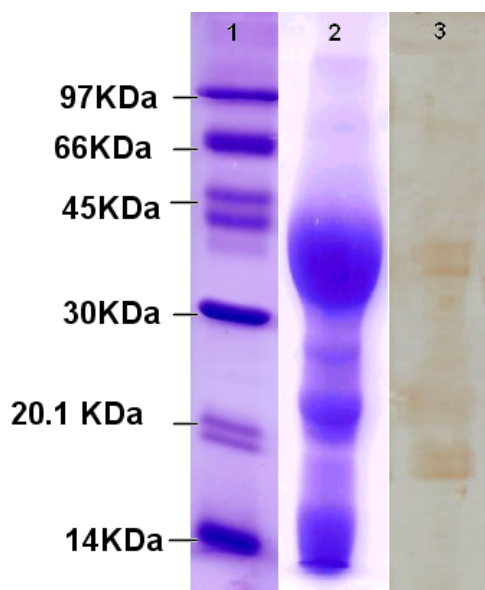


Figura 14 – Perfil molecular dos anticorpos obtidos a partir do protocolo de extração empregado. 1 – Peso molecular; 2 – Perfil da IgY obtida no processo de imunização; 3 – *Immunoblotting* de reconhecimento das porções do veneno de *Bitis arietans*, indicando o sucesso do protocolo em uso.

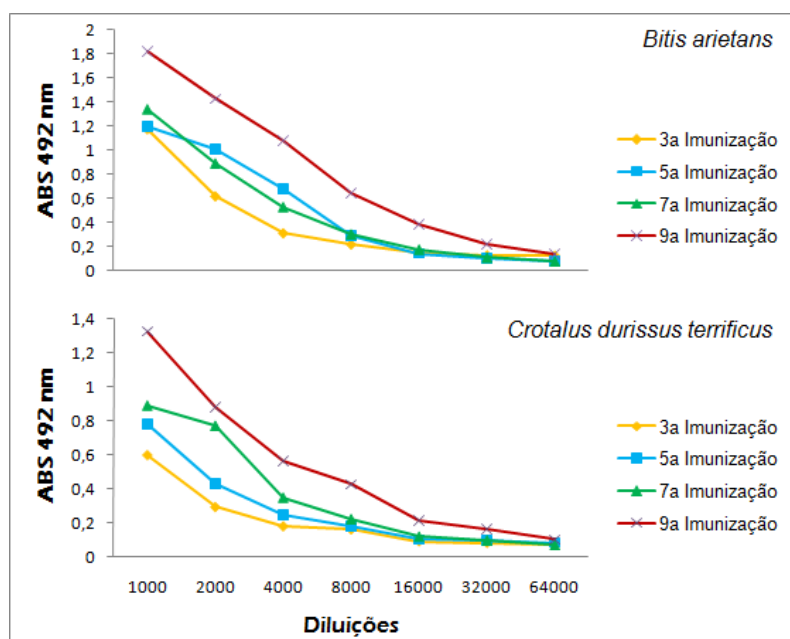


Figura 15 – Médias dos resultados obtidos nos ensaios imunoenzimáticos dos anticorpos relativos às suas respectivas imunizações. Os anticorpos IgY das 5 aves de cada grupo foram purificados em conjunto, tornando a avaliação global. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Como pode ser observado na figura 15, os anticorpos relativos à 9ª imunização apresentaram maior afinidade aos venenos usados no experimento. Para corroborar o resultado obtido, empregamos o cálculo de U-ELISA, que determinou unidades arbitrárias de afinidade com base na diluição máxima relativa ao limiar mínimo de absorbância considerado no experimento (Abs. = 0,2). Como esperado, os anticorpos obtidos na 9ª imunização apresentaram maior grau de afinidade em relação aos demais (figura 16).

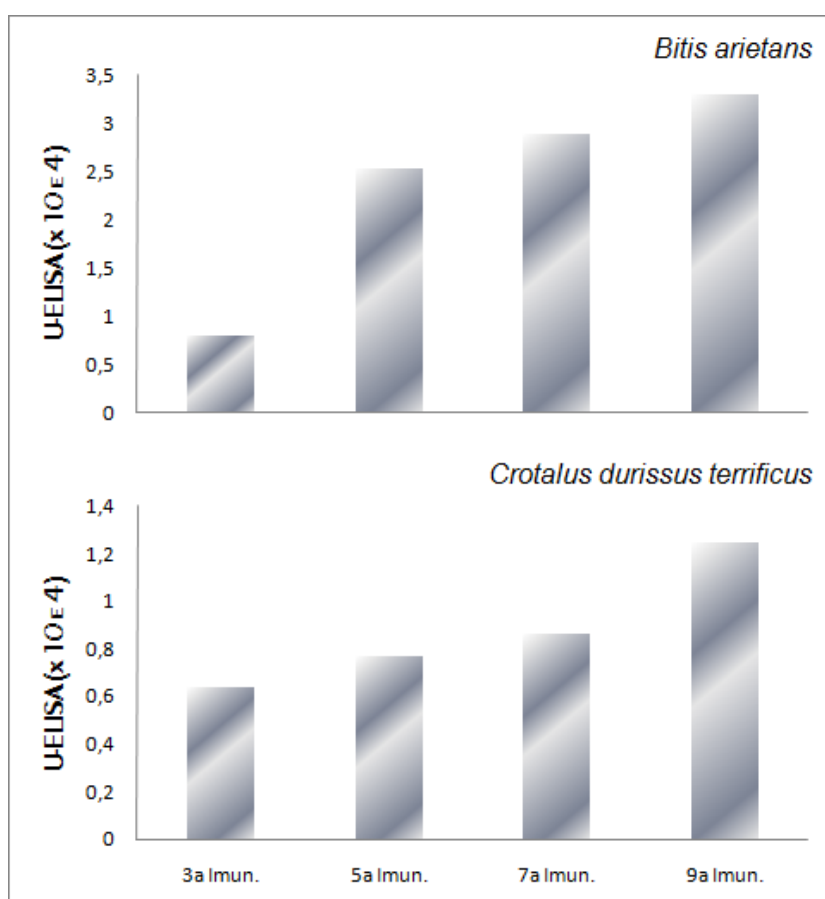


Figura 16 – U-ELISA referente aos anticorpos obtidos no decorrer das imunizações. O cálculo leva em consideração a maior diluição onde o ELISA ultrapassa o limiar de 0,2 de densidade óptica, considerado como média mínima para a confirmação de reconhecimento e ligação ao antígeno.

Os anticorpos anti-*Bitis arietans* obtidos na 3ª imunização puderam ser diluídos a uma taxa de 1:8.000, enquanto os anticorpos obtidos na 9ª imunização

chegaram a um nível de 1:32.000. Já nos resultados dos anticorpos anti-*Crotalus durissus terrificus*, a diferença entre as 3ª e 9ª imunizações também foi considerável: 1:4.000 e 1:16.000, respectivamente.

Para a avaliação da avidez dos anticorpos obtidos na 9ª imunização, o protocolo de ELISA descrito no item 3.8 foi modificado. A diluição de 1000 vezes foi a escolhida para a avaliação da ligação dos anticorpos antivenenos em intervalos de 5 minutos. Anticorpos seriam considerados de “altas afinidade e avidez” e aptos para a montagem de soros anti-ofídicos caso ultrapassassem o limiar de 1,0 de absorbância em um intervalo de tempo menor que 1 hora. Como pode ser observado na figura 17, os anticorpos anti-*Bitis* e anti-*Crotalus* mostraram alta avidez no ensaio. A boa qualidade da capacidade de neutralização do material pode ser inferida ainda pela formação de um platô logo aos 5 minutos de contato anticorpo-veneno (Figura 17).

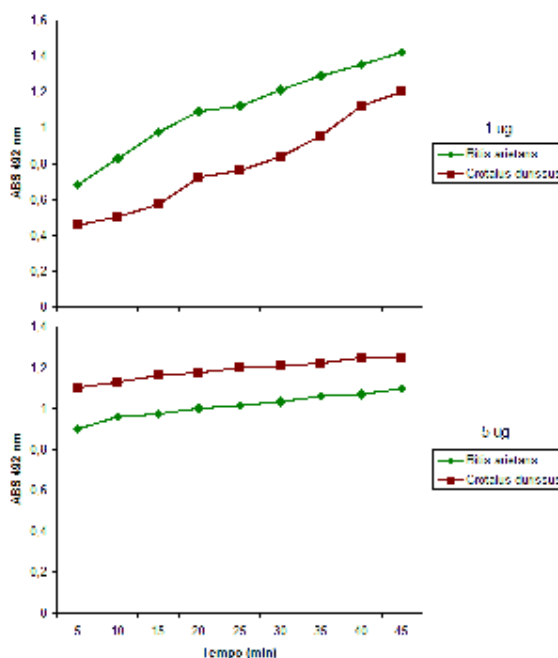


Figura 17 – *Timing* ELISA. ELISA indireto, com lavagens de parada de reação em intervalos regulares de 5 minutos, para avaliação da taxa de avidez de cada anticorpo em relação ao respectivo antígeno (venenos completos).

4.3 – Ensaio de Imunoproteção

Para corroborar os dados dos ensaios imunoquímicos, que determinaram que a IgY obtida na 9ª imunização foi de alta afinidade em relação às demais, foi feito o ensaio de imunoproteção. Como esperado, os camundongos imunoprottegidos com IgY da 9ª imunização (alta afinidade) apresentaram uma taxa de 100% de sobreviventes ao final do experimento, enquanto os grupos imunoprottegidos com IgY da 3ª imunização e IgY controle não apresentaram sobreviventes depois de 50 horas (figura 18).

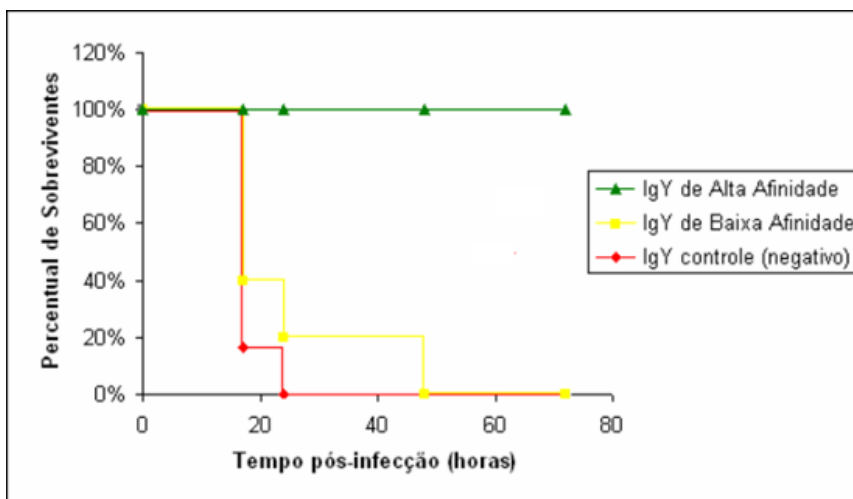


Figura 18 – Ensaio de imunoproteção com camundongos SW. Os camundongos foram avaliados a cada 8 horas, durante 3 dias, para a análise do efeito protetor dos anticorpos testados. IgY de Alta Afinidade – 9ª imunização; IgY de Baixa Afinidade – 3ª imunização; IgY controle – obtido de galinhas não-imunizadas.

4.4 – Obtenção do mRNA e Análise das PCRs

Com base nos dados obtidos na análise imunoquímica quanto à qualidade dos anticorpos produzidos pelas aves, a 9ª imunização foi escolhida como ponto de análise para a obtenção das sequências da porção variável das cadeias leve e

pesada da IgY. A partir do sangue e baço coletados, mRNA foi extraído a partir de uma fração enriquecida em linfócitos, transformado em cDNA e amplificado em PCR segundo modificações da metodologia descrita por Chiliza e colaboradores (2008). O resultado obtido na PCR (figura 19) demonstrou a boa qualidade do mRNA obtido e da nova metodologia em geral. As amostras amplificadas relativas à porção variável da cadeia pesada apresentaram cerca de 400 pares de base. Já na porção variável da cadeia leve, as amostras apresentaram cerca de 340 pares de base (Figura 19), de acordo com o resultado aguardado (Chiliza et al., 2008).

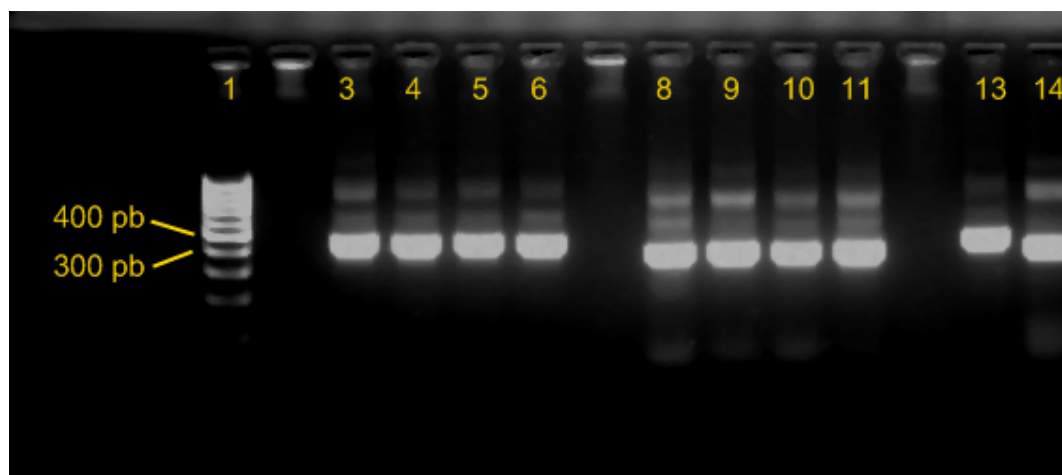


Figura 19 – Gel de agarose 2% revelando o resultado de uma reação de polimerização em cadeia. Foram aplicados 5 µl de cada amostra por poço. 1 – marcador molecular 100 pb; 3 a 6 e 13 – amostras relativas à porção variável da cadeia pesada da IgY; 8 a 11 e 14 – amostras relativas à porção variável da cadeia leve da IgY.

4.5 – Clonagem das Sequências Obtidas

No isolamento de sequências específicas do *pool* de anticorpos foi utilizada a técnica de clonagem em plasmídeo e transformação de bactérias competentes. Colônias isoladas crescidas em meio LB sólido foram coletadas, e os plasmídeos extraídos. A endonuclease EcoRI foi utilizada na digestão do plasmídeo para

confirmar a presença da sequência clonada no vetor (figura 20). As bandas superiores representam o plasmídeo digerido, e as inferiores o inserto de interesse.

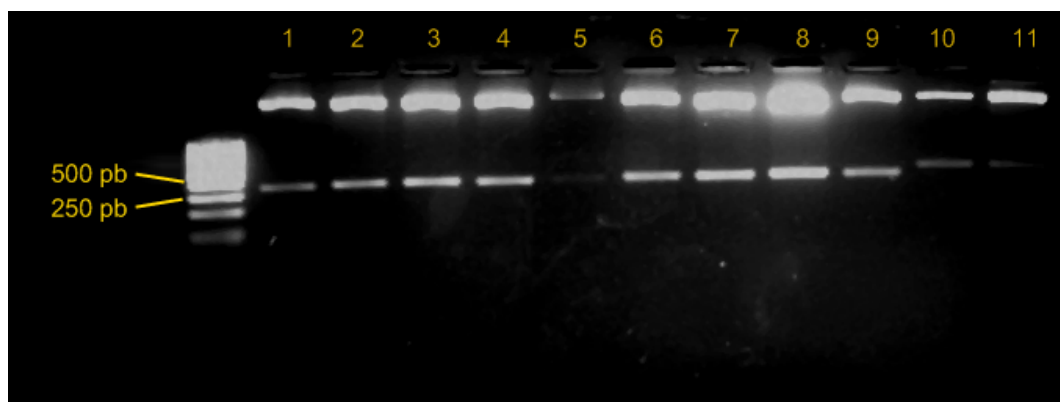


Figura 20 – Reação de digestão de diferentes clones inseridos no vetor pGEM T *easy* com EcoRI. 5 μ l de cada amostra foram aplicados no gel de agarose (2%). 1 a 9 – cadeia leve; 10 e 11 – cadeia pesada.

4.6 – Sequenciamento e Análise das Amostras

O sequenciamento das amostras escolhidas (duas de cada cadeia da IgY) foi feito com o BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma PCR-controle foi feita para a avaliação da reação de sequenciamento (figura 21), e indicou uma boa amplificação na presença dos quatro primers disponíveis (M13F, M13R, SP6 e T7). Os escolhidos para a reação de sequenciamento foram: M13F para a leitura normal, e M13R para a leitura reversa. Cada clone foi seqüenciado duas vezes, e as sequências obtidas foram analisadas no programa *GeneRunner* para a identificação do início e do final do fragmento clonado, e do *frame* correto de leitura. Os *frames* escolhidos foram analisados por BLASTp, alcançando entre 50% e 65% de homologia estrutural com sequências de IgG e IgE de mamíferos postadas no *GeneBank* (NCBI – Centro Nacional para Informação de Biotecnologia).

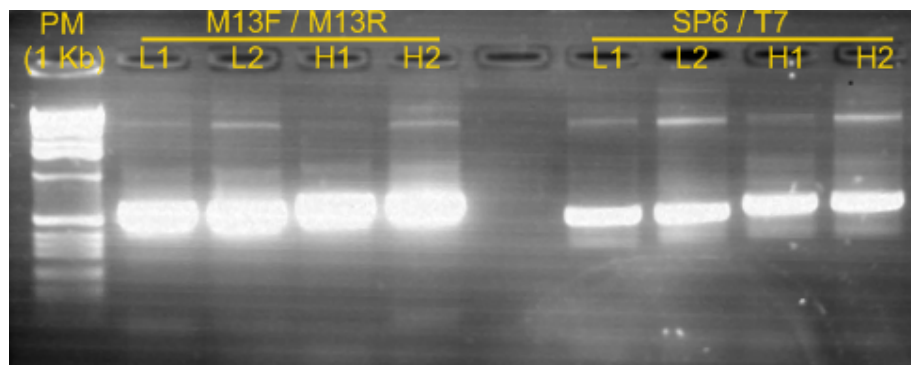


Figura 21 – Gel-teste de agarose 2% para a avaliação prévia da reação de sequenciamento. Os primers usados (M13F/M13R e SP6/T7) foram indicados pelo fabricante do vetor utilizado. L – porção variável da cadeia leve; H – porção variável da cadeia pesada.

Duas das sequências obtidas foram postadas no *GeneBank* (figura 22), sob os números GU815098 (Porção variável da cadeia pesada de IgY de galinha) e GU815099 (Porção variável da cadeia leve de IgY de galinha).

Com as sequências analisadas e a obtenção dos *frames* corretos, o processo de modelagem para a construção de scFvs foi iniciado (Ítem 3.13). Como sugerido no trabalho publicado em 2008 por Chiliza *et al.*, uma PCR *pull-through* é necessária para a junção das sequências pesada e leve, formando assim uma cadeia simples, capaz de adquirir a estrutura tridimensional da alça de reconhecimento do anticorpo original. O projeto de construção de um scFv antiveneno (figura 23) foi feito, simulando a junção do PCR *in silico*.

> Fv H chain IgY Sequence

```

CTG ATG GCG GCC GTG ACG TTG GAC GAG TCC GGG GGC GGC CTC CAG ACG CCC GGA GGA GCG CTC AGC
      E S G G G L Q T P G G A L S
CTC GTC TGC AAG GCC TCC GGC TTC ACC TTC AGC AGT TAT GGC ATG GGT TGG GTG CGG CAG GCG CCC GGC
L V C K A S G F T F S S Y G M G W V R Q A P G
AAA GGG CTG GAG TGG GTA GCT GGT ATT GGC AGT GGC GGT GGT ACC ACA TGG TAC GCG ACG GCG GTG AAG
K G L E W V A G I G S G G G T T W Y A T A V K
GGC CGT GCC ACC ATC TCG AGG GAC AAC GGG CAG AGC ACA GTG AGG CTG CAG CTG AAC AAC CTC AGG GCT
G R A T I S R D N G Q S T V R L Q L N N L R A
GAG GAC ACC GGC ACC TAC TAC TGC GCC AAA GAT GCT TAC GGT TTT AGC GGT GAC AGT AAT TGG TAC GCT
E D T G T Y Y C A K D A Y G F S G D S N W Y A
AAT GGT GAT AAC ATC GAC GCA TGG GGC CAC GGG ACC GAA GTC ATC GTC TCC TCC GGA GGC GGA CGA AGT
N G D N I D A W G H G T E V I V S S G G G
CAT CGT CTC CTC CGG AGG CGG

```

> Fv L chain IgY Sequence

```

GA CTC AGC CGT CCT CGG TGT CAG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TCA GCA AAC CCG GCA GGA ACC GTC GAG ATC
      T Q P S S V S A N P A G T V E I
ACC TGC TCC GGG AGT AGT GGC AGC TAT GGC TGG TTC CAG CAG AAG TCA CCT GGC AGT GCC CCT GTC ACT CTG
T C S G S S G S Y G W F Q Q K S P G S A P V T L
ATC TAT GCT GAC AAC AAC AGA CCC TCG GAC ATC CCT TCA CGA TTC TCC GGT TCC CGA TCC GAC TCC ACA GCC
I Y A D N N R P S D I P S R F S G S R S D S T A
ACA TTA GTC ATC ACT GGG GTC CAA GCC GAG GAC GAG GCT GTC TAT TTC TGT GGT GGC TAC GAC GGC AAC TAT
T L V I T G V Q A E D E A V Y F C G G Y D G N Y
TTT GGT TTA TTT GGG GCC GGG ACA ACC CTG ACC GTC CTA GGC CAG CCC AAT GCG GCC GCC ACC ATC CAG GGG
F G L F G A G T T L T V L G Q P N A A A T I
AAT GCG GCC GCC ACC ATC A

```

Figura 22 – Sequência de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos correspondentes. Nucleotídeos: sequência azul – porção variável da cadeia pesada; sequência verde – porção variável da cadeia leve; sequência preta – *primers* utilizados. Aminoácidos: sequência vermelha – localização dos CDRs. Análise dos resultados revelou grande homologia com os resultados obtidos por Chiliza *et al.* (2008).

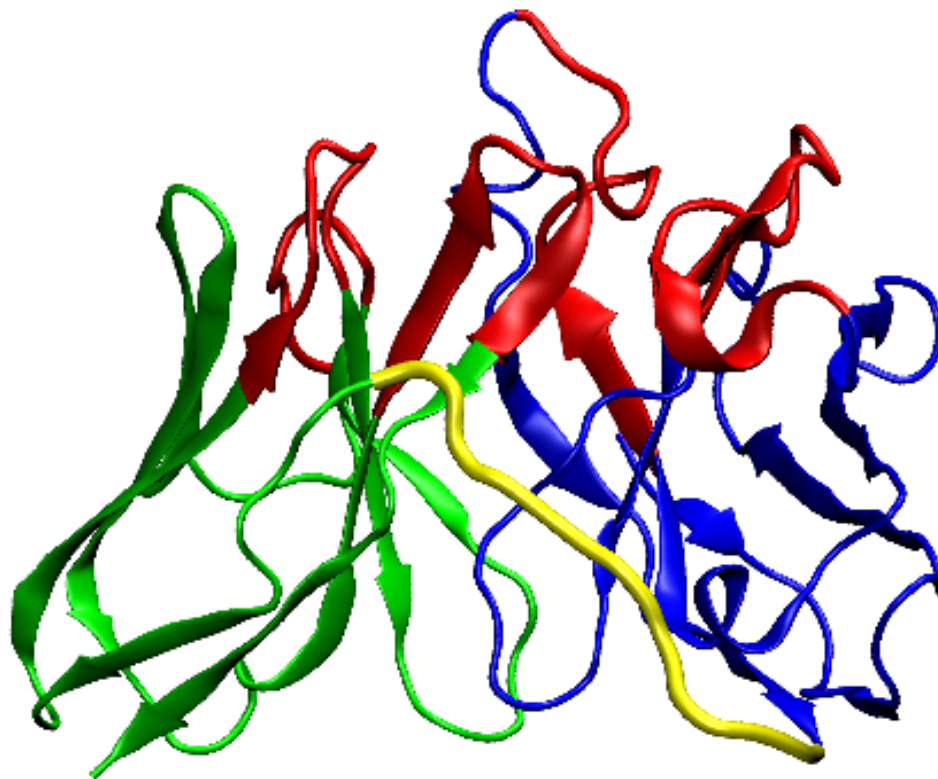
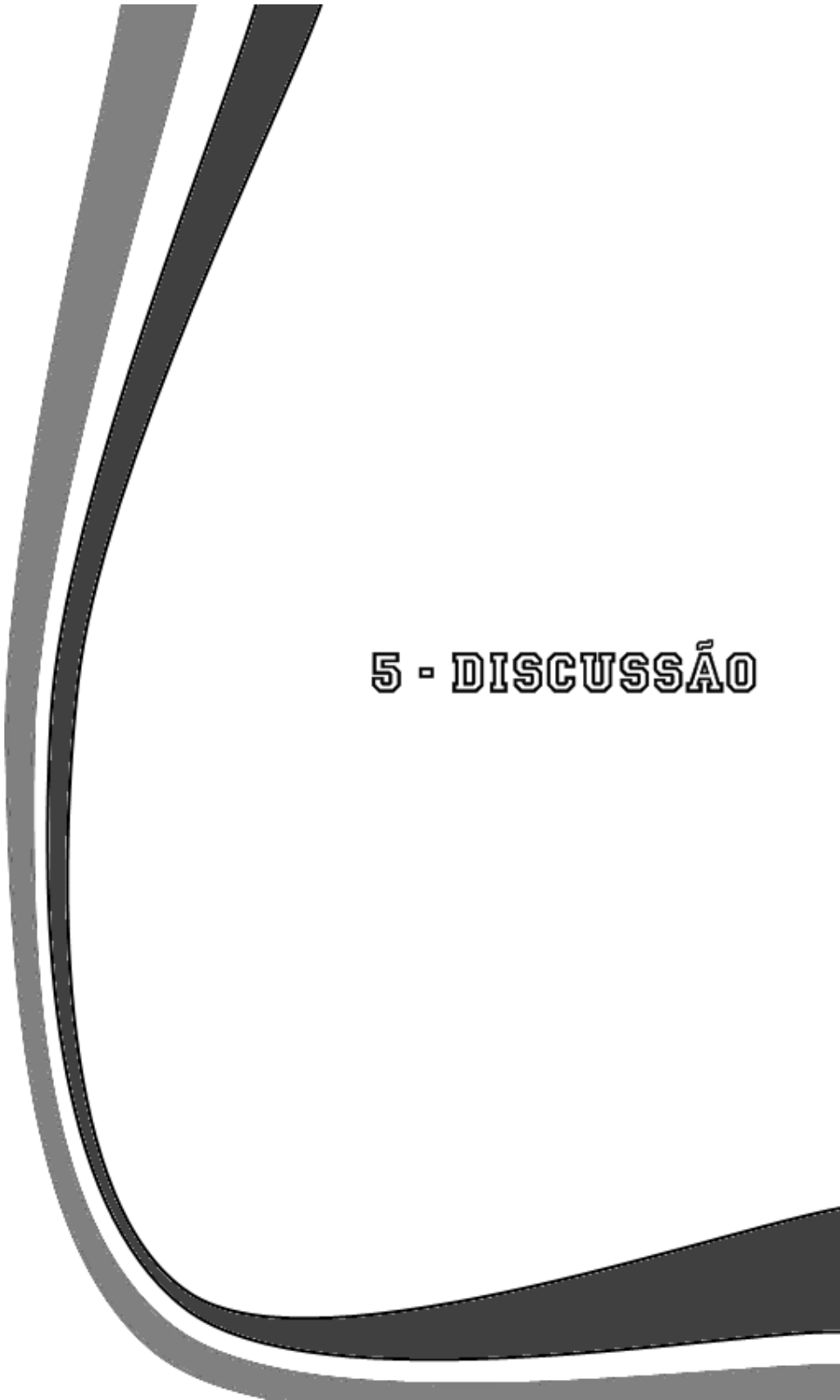


Figura 23 – Modelagem da fração variável de cadeia simples (scFv) de IgY a partir das sequências acima descritas. A fração azul representa a porção variável da cadeia pesada; a verde, da cadeia leve; o *link* entre as sequências, que possibilita o rearranjo tridimensional da forma desejada, está em amarelo; os CDRs de ambas as porções estão em vermelho, ilustrando a alça de reconhecimento característica dos anticorpos.



5 - DISCUSSÃO

Antissoros são classicamente produzidos a partir do plasma de grandes mamíferos hiperimunizados com algumas doses não-letais de determinado veneno. Há também as novas metodologias, baseadas na purificação de extrato de gemas de ovos de aves imunizadas, com a mesma finalidade (Schade *et al.*, 2005). Tal técnica, uma inovação pensada no século XIX e indevidamente esquecida por ser simples (Klemperer, 1893), tem apresentado resultados similares, senão melhores, nos tratamentos de animais de valor econômico e humanos acidentados com animais peçonhentos (Schade *et al.*, 2005).

Estudos comprovam a ligação filogenética que aponta IgY de aves com IgE e IgG de mamíferos (Schade *et al.*, 2005). No entanto, a molécula de IgY ainda não tem seu mecanismo de ação completamente desvendado. Um claro exemplo é a função da porção Fc da molécula, que começa a ser desvendada. Pürzel e colaboradores (2009) observaram que a ligação de IgY ao seu receptor CHIR-AB1 (receptor expresso na superfície de monócitos de aves) depende da interface de seus domínios Cu3 e Cu4, de forma semelhante à ligação de IgA ao seu receptor Fc α RI. Segundo Taylor e colaboradores (2009), a estequiometria de ligação de IgY ao CHIR-AB1 é de 2:1, enquanto a ligação de IgG e IgE aos receptores de Fc de leucócitos é de 1:1, indicando um grau de evolução filogenética no reconhecimento e, portanto, na resposta.

Enquanto o papel de IgY na resposta imune das aves ainda precisa ser elucidado, a sua utilização como ferramenta em imunodiagnóstico e imunoterapia é cada vez mais comum. Uma característica marcante de IgY contribui para tal. Segundo van Wyngaardt e colaboradores (2004), por uma questão prática, a construção de uma biblioteca de anticorpos IgY de galinhas visando a formação de scFvs semi-sintéticos para variados fins é mais fácil, quando comparado a outros possíveis doadores de imunoglobulinas, como gado, cavalos, ovelhas e coelhos. Isso porque a variabilidade em aves fica confinada à conversão gênica resultante da incorporação de pseudogenes V ao rearranjo VJ da cadeia leve e VDJ da cadeia pesada. Como resultado, todas as regiões variáveis tem virtualmente sequências de aminoácidos idênticas em ambos os terminos. Assim, com um único PCR, todo o repertório de IgY nativa pode ser convenientemente amplificado (Wyngaardt *et al.*, 2004; Chiliza *et al.*, 2008).

A partir do trabalho de Wyngaardt e colaboradores (2004), que compararam a tecnologia de montagem de bibliotecas da porção variável de anticorpos dentre os possíveis doadores, alguns grupos de pesquisa começaram a utilizar a tecnologia de produção de scFvs, principalmente para fins imunodiagnósticos. Chiliza e colaboradores (2008) montaram uma biblioteca de scFvs de IgY para o reconhecimento de epítomos de parasitas e vírus. Shin e colaboradores (2009) desenvolveram anticorpos IgY policlonais anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aplicáveis no reconhecimento, concentração e quantificação da MAP. Wemmer e colaboradores (2010) desenvolveram uma biblioteca de scFvs semi-sintéticos de IgY anti-HSP65 de *Mycobacterium bovis* para utilização em imunodiagnósticos. Também com a tecnologia de construção de scFvs de IgY, Miyamoto e colaboradores (2007) identificaram um epítipo envolvido na mudança da proteína priônica comum para sua conformação *scrapie*.

Para a produção de soros antiofídicos, a utilização de IgY já é amplamente distribuída. Implementada pelo ECVAM em 1996 e em 1999 pelo governo suíço como técnica inovadora para a produção de soros (Schade *et al.*, 2005), a Tecnologia IgY é bem distribuída na Europa, além de países como Índia, Japão, Estados Unidos e Brasil. Warrel e colaboradores (1975) relataram a importância da aplicação de soros antiofídicos no tratamento de acidentados com serpentes peçonhentas, e a produção de IgY para este fim é bem descrita na literatura.

Almeida e colaboradores (1998) trataram sobre o desenvolvimento de anticorpos antivenenos em galinhas e sua purificação a partir dos ovos. O protocolo é simples, baseado na quebra de ovos, coleta das gemas, diluição, precipitação com sulfato de amônio 29% e diálise. Desde então, inúmeros grupos tem produzido soros antivenenos baseados em IgY. Com protocolo similar, Paul e colaboradores (2007) produziram IgY antiveneno de *Echis carinatus*. De forma semelhante, na Índia, Meenatchisundaram e colaboradores (2008) produziram IgY antivenenos de *Naja naja*, *Bungarus caeruleus*, *Vipera russeli* e *Echis carinatus*. Em nosso grupo, foram produzidos IgY antivenenos de *Bitis arietans*, *Bitis nasicornis*, *Bitis rhinoceros*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica* (Almeida *et al.*, 2008) e *Crotalus durissus terrificus* (dados não-publicados). Araújo e colaboradores (2010), também no Brasil,

produziram IgY antiveneno de *Bothrops atrox*, visando a produção de soros antivenenos para consumo nacional.

No entanto, não há publicações tratando sobre a produção de soros antivenenos com base em scFvs de IgY. Como citado previamente, o trabalho publicado por Chiliza e colaboradores (2008) foi a base para a obtenção de dados visando a formação de biblioteca de scFvs de IgY antivenenos de *Crotalus durissus terrificus* e *Bitis arietans*. Para tal, a obtenção da sequência do mRNA da porção variável das cadeias leve e pesada de IgY foi necessária, visto que tal dado não existia no *GeneBank*.

Os protocolos de extração de mRNA de aves disponíveis eram limitados à extração do baço (Chiliza *et al.*, 2008), impossibilitando o acompanhamento da expressão dos transcritos durante o processo de imunização. Como pode ser observado nos itens 3.10 e 4.4, a nova metodologia proposta tem resultados similares aos apresentados na literatura. Assim, um novo protocolo foi gerado para a observação da evolução da resposta imune humoral contra determinado antígeno.

Enquanto as análises transcriptômicas eram feitas visando a obtenção da sequência das frações variáveis das cadeias leve e pesada, análises moleculares visando a obtenção de anticorpos IgY extraídos da gema dos ovos de galinhas imunizadas foram realizadas segundo metodologia estabelecida no laboratório (Almeida *et al.*, 2008). Os anticorpos de alta afinidade foram usados na montagem de soros antivenenos, envasados no Instituto Butantan e enviados para os países africanos beneficiados pelo Pró-África/CNPq.

As sequências de DNA obtidas neste trabalho (figura 22) são referentes às porções variáveis constituintes da IgY obtida na 9ª imunização, consideradas de alta afinidade e avidéz segundo os ensaios imunoenzimáticos e de imunoproteção, de acordo com Almeida e colaboradores (2008). Estas foram submetidas ao *GeneBank* (item 4.6), e já estão disponíveis para consulta. São as únicas sequências de transcritos relativos à fração variável de IgY em todo o banco de dados.

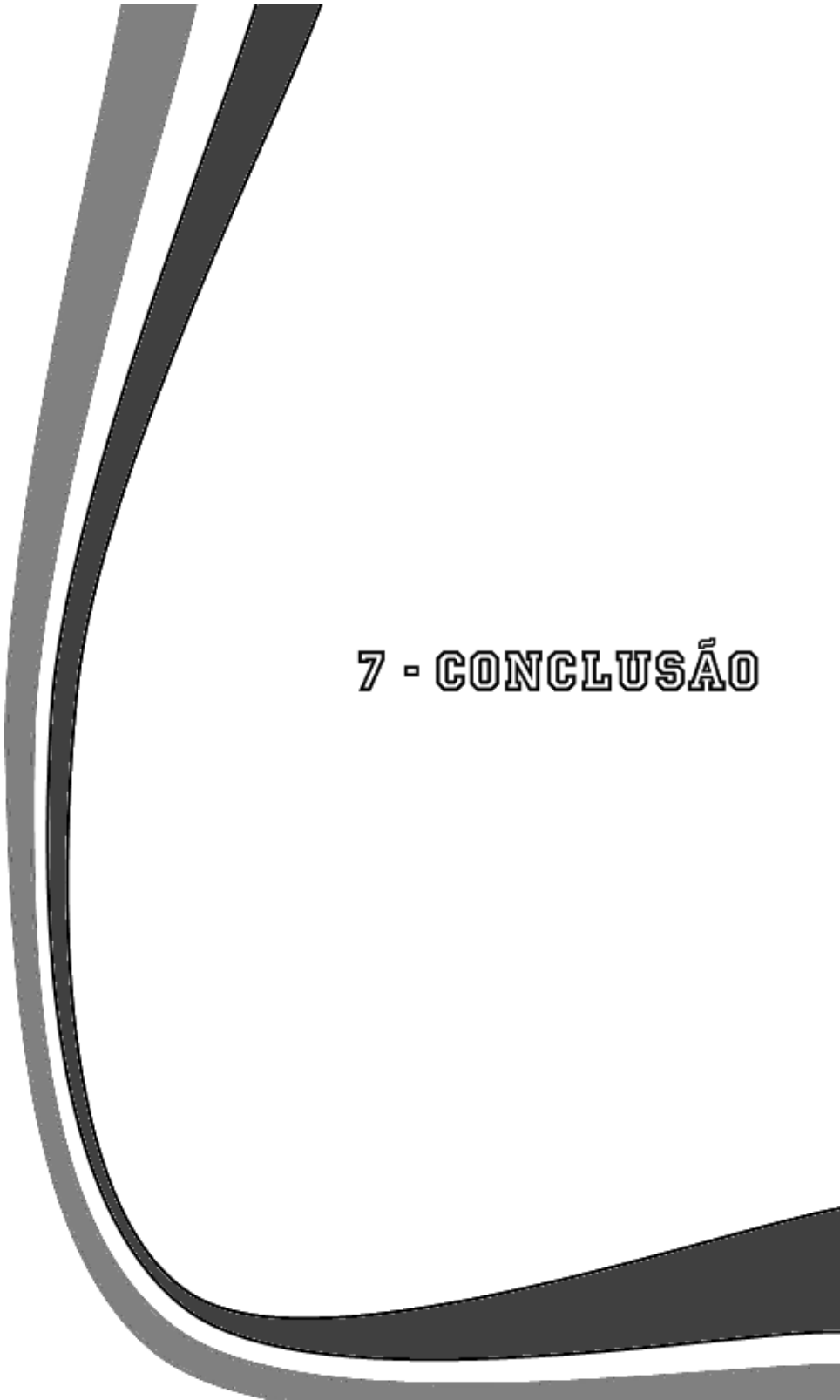


6 - PERSPECTIVAS

Esta dissertação teve por objetivo a obtenção das bases de conhecimento e prática para a produção de scFvs anti-toxinas de venenos. Esta tecnologia, como dito anteriormente, capacita a produção de “anticorpos” desejáveis de altas afinidade e avidéz sem a necessidade de novas imunizações. A produção é baseada na expressão da proteína, em sistema bacteriano ou em fagos, em escalas variadas (de acordo com a necessidade de produção, variando de mini-escala laboratorial a escala industrial).

Durante este trabalho, obtivemos material suficiente para futura análise de variabilidade, em sequenciamentos já programados. Estes resultados servem como base para a montagem de uma biblioteca de clones anticorpos contra variados epítomos de proteínas de interesse, componentes dos venenos estudados. Tal montagem é possível a partir da análise de reconhecimento de bandas conhecidas em 2DE-PAGE de cada clone obtido, em estudo de caracterização. Os clones selecionados tem múltiplas utilidades: podem ser utilizados em imunoensaios sensitivos contra determinadas proteínas, gerando resultados de alta fidelidade; no tratamento de pacientes entoxicados cmo determinadas proteínas; na montagem de soros antivenenos de alta eficiência, com total controle da produção e, consequentemente, da qualidade do produto final; dentre outras.

Todo o material produzido e o futuramente obtido será submetido à publicação no *GeneBank*, a fim de disponibilizar esta informação até então em posse de poucos grupos à toda a comunidade científica, possibilitando o acesso total à tecnologia disponível.



7 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- As aves responderam muito bem às imunizações, gerando anticorpos de alta afinidade, ideais para a formação de um soro antiofídico clássico.
- Um protocolo de análise contínua da expressão de mRNA de IgY em galinhas foi desenvolvido, a partir do sangue das aves.
- As sequências obtidas correspondem ao descrito na literatura disponível, tanto no número de nucleotídeos componentes quanto na homologia com imunoglobulinas de mamíferos.
- A modelagem das sequências obtidas comprova que a aplicação da tecnologia de scFvs para IgY é uma realidade.
- A partir deste trabalho, a montagem de uma biblioteca de cDNA de IgY começará a ser montada, visando a produção de scFvs com aplicabilidade na composição de antissoros de alta qualidade, ou mesmo em testes que exijam alto grau de sensibilidade.



8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K. & Lichtman, A. L. (2004) – Cellular and Molecular Immunology. Updated Edition.

Acevedo, M.C., Mederos, J. & Garcia, C. (1999). Produccion de IgY especifica contra el virus de la enfermedad de Gumboro en ponedoras libres de patógenos específicos (SPF). *Revista Cubana de Ciencia Avícola* **23**,157–161.

Ambrosius, H. (1996). Developmental aspects of immunoglobulins and antibodies. *ALTEX* **13**, Suppl. 1, 10–14.

Almeida, C.M.C., da Silva, C.L., Pena Couto, H., Escocard, R.C.M., Rocha, D.G., Sentinelli, L.P., Kipnis, T.L., Dias da Silva, W., 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. *Veterinary Record* **143**, 579–584.

Araújo, A. S., Lobato, Z. I. P., Chávez-Olórtegui, C., Velarde, D. T. (2010). Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon* **55**, 739-744

Bauwens, R.M., Devos, M.P., Kint, J.A. & De Leenheer, A.P. (1988). Chicken egg yolk and rabbit serum compared as sources of antibody for radioimmunoassay of 1,25-dihydroxyvitamin D in serum or plasma. *Clinical Chemistry* **34**, 2153–2154.

Beghini, D. G.; Damico, D. C. S.; da Cruz-Höfling, M. A.; Rodrigues-Simioni, L.; Delatorre, M. C.; Hyslop, S.; Marangoni, S. (2008). Ability of rabbit antiserum against crotapotin to neutralize the neurotoxic, myotoxic and phospholipase A2 activities of crotoxin from *Crotalus durissus cascavella* snake venom. *Toxicology in vitro*, **22** (1):240-8

Bezzubova, O.Y. & Buerstedde, J-M. (1994). Gene conversion in the chicken immunoglobulin locus: a paradigm of homologous recombination in higher eukaryotes. *Experientia* **50**, 270–276.

Bhanushali, J.K., Gilbert, J.M., McDougal, L.R., 1994. Simple method to purify chicken immunoglobulin. *G. Poult. Sci.* **73**, 1158-1161.

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. *Journal of Immunological Methods* **191**, 113–120.

Bollen, L.S. & Hau, J. (1997). Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. *In Vivo* **11**, 395–398.

Bollen, L.S. & Hau, J. (1999). Freund's complete adjuvant has a negative impact on egg laying frequency in immunised chickens. *In Vivo* **13**, 107–108.

Brambell, R., 1970. The transmission of passive immunity from mother to young. *Front. Biol.* **18**, 20-41.

Bucaretychi, F.; Herrera, S. R. F.; Hyslop, S.; Baracat, E. C. E.; Vieira, R. J. (2002). Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **44** (3): 133-138.

Calzado, E.G., Marino, E.C., Chavez, T.S., Vazquez, E.L., Ochoa, Z.C. & Schade, R. (2003). Extraction of a monospecific Coombs-reagent from chicken eggs. *ALTEX* **20**, 21–25.

Carlander, D. (2002). *Avian IgY Antibody*. In *Vitro and In Vivo*. Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1119, 153pp. Uppsala, Sweden: University of Uppsala.

Carlander, D., Olesen, H., Kollberg, H., Johanesson, M., Wejaker, P-E. & Larsson, A. (2002). *Avian Antibodies can Eliminate Interference due to Complement Activation in ELISA*. Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1119, pp. 1–8. Uppsala, Sweden: University of Uppsala.

Carlander, D., Stalberg, J. & Larsson, A. (1999). Chicken antibodies. a clinical chemistry perspective. *Uppsala Journal of Medical Science* **104**, 179–190.

Cipolla, A., Cordeviola, J., Terzolo, H., Combessies, G., Bardón, J., Noseda, R., Martínez, A., Medina, D., Morsella, C. & Malena, R. (2001). *Campylobacter fetus* diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. *ALTEX* **18**, 165–170.

Cohn, M. & Langmann, R.E. (1993). A theory of the ontogeny of the chicken humoral immune system: the consequences of diversification by gene hyperconversion and its extension to rabbit. *Research Immunology* **144**, 422–446.

Cser, L., Gladkih, I.A., Hädige, D. & Ambrosius, H. (1982). X-ray small-angle scattering study of general structure of chicken immunoglobulin Y. *Immunology Letters* **4**, 15–19.

- Davalos-Pantoja, L., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-Gonzalez, D. & Hidalgo-Alvarez, R. (2000). A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *Journal of Biomaterial Sciences and Polymer Edition* **11**, 657–673.
- Davalos-Pantoja, L., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-Gonzalez, D. & Hidalgo-Alvarez, R. (2001). Colloidal stability of IgG- and IgY-coated latex microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **20**, 165–175.
- Davison, T.F. (2003). The immunologists debt to the chicken. *British Poultry Science* **44**, 6–21.
- Di Lonardo, A., Marcante, M.L., Poggiali, F., Hamsoikova, E. & Venuti, A (2001). Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papilloma virus type 16. *Archives of Virology* **146**, 117–125.
- Dohms, J.E., Saif, Y.M. & Bacon, W.L. (1978). Studies on metabolism and concentration of immunoglobulin G in the newly hatched turkey poult. *American Journal of Veterinary Research* **39**, 1466–1471.
- Erhard, M.H., Ozpinar, H., Bilal, T., Abas, I., Kutay, C., Eseceli, H. & Stangassinger, M. (2000). The humoral immune response and the productivity of laying hens kept on the ground or in cages. *ATLA* **28**, 699–705.
- Fölsch, D.W. (1990). Grundlegende ethologische und ökologische Aspekte für die Haltung von Haustieren, speziell von Hühnern. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* **97**, 217–264.
- Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T. & Hübscher, U. (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. In: *Forschung ohne Tierversuche* (ed. H. Schöffl, H. Spielmann, F.P. Gruber, H. Appl, F. Harrer, W. Pfaller & H.A. Tritthart), pp. 263–268. Vienna, Austria & New York, USA: Springer.
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. & Yamamoto, T. (1993). Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **57**, 450–454.
- Hau, J., Westergaard, J.G., Svendsen, P., Bach, A. & Teisner, B. (1980). Comparison of the pregnancy- associated murine protein-2 and human pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility* **60**, 115–119.

- Hau, J., Westergaard, J.G., Svendsen, P., Bach, A. & Teisner, B. (1981). Comparison of pregnancy-associated murine protein-1 and human pregnancy zone protein. *Journal of Reproductive Immunology* **3**, 341–349.
- Hedlund, G.B. & Hau, J. (2001). Oral immunization of chickens using cholera toxin B subunit and Softigen® as adjuvants results in high antibody titre in the egg yolk. *In Vivo* **15**, 381–384.
- Hlinak, A. & Schade, R. (2000). Possibilities of keeping laying-hens to obtain antibodies. No *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY Technology* (ed. R. Schade, I. Behn, M. Erhard, A. Hlinak & C. Staak), pp. 9–24. Berlin, Germany, Heidelberg, Germany, & New York, NY, USA: Springer Lab Manuals.
- Hlinak, A., Schrödl, W., Witt, S., Schade, R. & Krüger, M. (1996). Production of egg yolk antibodies against human cell-associated antigens. *ALTEX* **13**, Suppl. 1, 76–79.
- Hillisch, A.; Pineda, L.F.; Hilgenfeld, R. (2004). Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discovery Today*. v. 09, p. 659-669.
- Höltje, H. D.; Sippl, W.; Rognan, D.; Folkers, G. (2003). Introduction to comparative protein modeling. In *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Hommel, U. & Behn, I. (2000). Einsatz aviärer vitelliner Antikörper als Sekundärreagenzien in immunologischen Testsystemen. In: *Forschung ohne Tierversuche* (ed. H. Schöffl, H. Spielmann, F.P. Gruber, H. Appl, F. Harrer, W. Pfaller & H.A. Tritthart), pp. 263–268. Vienna, Austria, New York, USA: Springer.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*, 5^a ed., 777pp. Heidelberg & Berlin, Germany: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jaradat, Z.W. & Marquardt, R.R. (2000). Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. *Food and Agricultural Immunology* **12**, 263–272.
- Klemperer, F. (1893). Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **31**, 356–382.
- Klipper, E., Sklan, D. & Friedman, A. (2000). Immune responses of chickens to dietary protein antigens. I. Induction of systemic and intestinal immune responses following oral administration of soluble proteins in the absence of adjuvant. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **74**, 209–223.

Klipper, E., Sklan, D. & Friedman, A. (2001). Response, tolerance and ignorance following oral exposure to a single dietary protein antigen in *Gallus domesticus*. *Vaccine* **19**, 2890–2897.

Kricka, L.J. (1999). Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical Chemistry* **45**, 942–956.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.

Larsson, A., Carlander, D. & Wilhelmsson, M. (1998). Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Food and Agricultural Immunology* **10**, 29–36.

Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S. & Thornton J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.

Leenars, P.P.A.M., Hendriksen, C.F.M., de Leeuw, W.A., Carat, F., Delahaut, P., Fischer, R., Halder, M., Hanly, W.C., Hartinger, J., Hau, J., Lindblad, E.B., Nicklas, W., Outschoorn, I.M. & Stewart-Tull, D.E.S. (1999). The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM workshop 35. *ATLA* **27**, 79–102.

Loeken, M.R., Roth, T.F. (1983). Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology* **49**, 21-28.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

Lösch, U., Schraner, I., Wanke, R. & Jürgens, L. (1986). The chicken egg, an antibody source. *Journal of Veterinary Medicine B* **33**, 609–619.

Mahn, K. (1998). *Etablierung eines Immunisierungsschemas für Legehennen*. Veterinary Medicine Doctoral Thesis, University of Munich. 110pp. Munich, Germany: University of Munich.

Marti-Renom, Yerkovich & Sali. (2002). Comparative protein structure prediction. Current Protocols in Protein Science 2.9.1-2.9.22.

Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Michael, A., Ramalingam, S. (2008). 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. (2008). Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. *International Immunopharmacology* **8**, 1067-1073.
- Miyamoto, K., Kimura, S., Nakamura, N., Yokoyama, T., Horiuchi, H., Furusawa, S., Matsuda, H. (2007). Chicken antibody against a restrictive epitope of prion protein distinguishes normal and abnormal prion proteins. *Biologicals* **35**, 303-308.
- Mittermeier, P. (1995). *Das Lipopeptid Pam3Cys-Ser-(Lys)4-eine Alternative zu Freundschem komplettem Adjuvans (FCA) bei der Immunisierung von Legehennen zur Gewinnung von Dotterantikörpern*. Inaugural Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig Maximilians Universität. 99pp. Munich, Germany: Ludwig Maximilians University.
- 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.
- Morrison, S.L., Mohammed, S.M., Wims, L.A., Trinh, R. & Etches, R. (2001). Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology* **38**, 619–625.
- Noll, F., Lutsch, G. & Bielka, H. (1982). Structure of IgG and IgY molecules in ribosome-antibody complexes as studied by electron microscopy. *Immunology Letters* **4**, 117–123.
- Oguiura, N., Camargo, M.E., da Silva, A.R.P., Horton, D.S.P.Q. (2000). Quantification of crotamine, a small basic myotoxin, in south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. *Toxicon* **38**, 443-448
- Ohnishi, T., Kakimoto, K., Hashida, S., Fujii, M., Hirono, S., Nishiayma, K., Amita, Y., Ishikawa, E., Tsubouchi, H. & Daikuhara, Y. (2000). Development of highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF): determination of HGF/SF in serum and urine from normal human subjects. *Journal of Immunological Methods* **244**, 163–173.
- Olbrich, C., Müller, R.H., Tabatt, K., Kayser, O., Schulze, C. & Schade, R. (2002). Stable biocompatible adjuvants — a new type of adjuvant based on solid lipid nanoparticles: a study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. *ATLA* **30**, 443–458.
- Parvari, R., Avivi, A., Lentner, F., Ziv, E., Tel-Or, S., Burstein, Y. & Schechter, I. (1988). Chicken immunoglobulin γ -heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial

diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO Journal* **7**, 739–744.

Parvari, R., Ziv, E., Lentner, F., Tel-Or, S., Burstein, Y. & Schechter, I. (1987). Analysis of chicken immunoglobulin light chain cDNA clones indicate a few germline V λ genes and allotypes of the C λ locus. *EMBO Journal* **6**, 97–102.

Patterson, R., Younger, J.S., Weigle, W.O. & Dixon, F.J. (1962). Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *Journal of Immunology* **89**, 272–278.

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

Perez, R.C.M., Mejia, C.M. & Quintero, L.Z. (1994). Produccion de anticuerpos antiprogesterona a partir de la yema de huevo de gallinas y del suero sanguineo de conejos, para ser utilizados en radioinmunoanalisis. *Veterinaria Mexicana* **25**, 117–125.

Polson, A., von Wechmar, M.B., van Regenmortel, M.H., 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.* **9**, 475-493.

Pürzel, J., Schmitt, R., Viertboeck, B. C., Göbel, T. W. (2009). Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction. *The Journal of Immunology* **183** (7), 4554-9.

Remfry, J. (1987). Ethical aspects of animal experimentation. *Laboratory animals: an introduction for new experiments* (Tuffery, A. A. Ed.) New York. Interscience, p. 5-9.

Rose, M.E., Orlans, E. & Buttress, N. (1974). Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology* **4**, 521–523.

Russell, W.M.S. & Burch, R.L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*, 238 pp. London, UK: Methuen.

Sano-Martins, I.S.; Tomy, S.C.; Campolina, D.; Dias, M.B.; Amaral, C.F.S.; Rezende, N.A.; Kamiguti, A.S.; Warrell, D.A.; Theakston, R.D.G (2001). Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *Q J Med*, **94**: 551-559.

Sasse, M. (1998). *Experimente zur Induktion, Präparation und Charakterisierung aviärer vitelliner Antikörper gegen Endotoxine verschiedener gramnegativer Bakterien*. Doctoral Thesis. 140pp. Leipzig, Germany: Veterinary Medicine Faculty, University of Leipzig.

Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., Terzolo, H. R. (2005). Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *ATLA* **33**, 1-26.

Schade, R., Staak, C., Hendriksen, C., Erhard, M.H., Hugel, H., Koch, G., Larsson, A., Pollmann, W., van Regenmortel, M., Rijke, E., Spielmann, H., Steinbusch, H. & Straughan, D. (1997). The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *ATLA* **24**, 925–934.

Schade, R., Bürger, W., Schöneberg, T., Schniering, A., Schwarzkopf, C., Hlinak, A. & Kobilke, H. (1994). Avian egg yolk antibodies: the egg laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *ALTEX* **2**, 75–84.

Schade, R., Henklein, P., Harms, C., Jonas, L., Lautenschlager, M., Schöneberg, T., de Weerth, A., Hlinak, A. & Hörtnagel, H. (2000). New aspects of cholecystokinin processing and visualisation in the rat brain by using antibodies raised in chickens and rabbits. *ATLA* **28**, 575–601.

Schmidt, P., Wiedemann, V., Kühlmann, R., Wanke, R., Linckh, E. & Lösch, U. (1989). Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal disorders. II. *In vitro* studies on gastric and enteric digestion of egg yolk antibodies specific against pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Veterinary Medicine B* **36**, 619–628.

Schwarzkopf, C., Staak, C., Behn, I. & Erhard, M. (2000). Immunisation. In *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY Technology* (ed. R. Schade, I. Behn, M. Erhard, A. Hlinak & C. Staak), pp. 25–64. Berlin, Germany, Heidelberg, Germany & New York, USA: Springer Lab Manuals.

Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, M., Tsuda, K. & Hatta, H. (1992). Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **56**, 270–274.

Shin, S. J., Lee, S-S., Manning, E. J. B., Collins, M. T. (2009). Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *The Journal of Microbiology* **47** (5), 600-609.

Sui, J., Hwang, W.C., Perez, S., Wei, G., Aird, D., Chen, L.M., Santelli, E., Stec, B., Cadwell, G., Ali, M., Wan, H., Murakami, A., Yammanuru, A., Han, T., Cox, N.J., Bankston, L.A., Donis, R.O., Liddington, R.C., Marasco, W.A. (2009) Structural and

functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 16: 265-273

Straumann-Kunz, U., Pospischil, A. & Paccaud, M.F. (1991). Immunohistochemical detection of chlamydiae in formalin-fixed tissue sections: comparison of a monoclonal antibody with yolk derived antibodies. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **38**, 292–298.

Sui, J., Hwang, W.C., Perez, S., Wei, G., Aird, D., Chen, L.M., Santelli, E., Stec, B., Cadwell, G., Ali, M., Wan, H., Murakami, A., Yammanuru, A., Han, T., Cox, N.J., Bankston, L.A., Donis, R.O., Liddington, R.C., Marasco, W.A. (2009) Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 16: 265-273

Sun, S., Mo, W., Ji, Y. & Liu, S. (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Communication of Mass Spectrometry* **15**, 708–712.

Taylor, A. I., Sutton, B. J., Calvert, R. A. (2010). Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 97-101

Tini, M., Jewell, U.R., Camenisch, G., Chilov, D. & Gassman, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology — A Molecular and Integrative Physiology* **131**, 569–574.

Towbin, H., Stachelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Of Nat. Acad. Of Sci. USA.* **76**, 4350-4354.

Tressler, R.L., Roth, T.F., 1987. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *J. Biol. Chem.* 262, 15406-15412.

Tu, Y-Y., Chen, C-C. & Chang, H-M. (2001). Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrine by immunoaffinity chromatography. *Food Research International* **34**, 783–789.

Untiedt, H. (1997). Tierschutzgerechte Käfighaltung von Legehennen für die Produktion von Ei-Antikörpern. *Der Tierschutzbeauftragte* **6**, 2–4.

Venom Supplies Pty Ltd. (2007). List of reptile specimens taken to be suitable for live import.

Warr, G.W., Magor, K.E. & Higgins, D.A. (1995). IgY clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today* **16**, 392–398.

Warrell, D.A., Ormerod, L.D., Davidson, N.McD. (1975). Bites by puff-adder (*Bitis arietans*) in Nigeria, and value of antivenom. *British Medical Journal* **4**, 697-700.

Wemmer, S., Mashau, C., Fehrsen, J., van Wyngaardt, W., du Plessis, D. H. (2010). Chicken scFv-C(H) fusions directed against HSP65 of *Mycobacterium bovis*. *Biologicals* [Epub ahead of print]

Yamamoto, H., Watanabe, H., Sato, G. & Mikami, T. (1975). Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Japanese Journal of Veterinary Research* **23**, 131–140.

Zhao, Y., Rabbani, H., Shimizu, A. & Hammarström, L. (2000). Mapping of the chicken immunoglobulin heavy-chain constant region gene locus reveals an inverted α gene upstream of a condensed v gene. *Immunology* **101**, 348–353.

Referências da Internet:

homepage2.nifty.com/cryomedicine/wdA_C.htm, acessado em 11/2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)