

**Amanda Soriano Araújo**

**PRODUÇÃO DE ANTIVENENO BOTRÓPICO EM  
OVOS DE GALINHA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Zélia Inês Portela Lobato

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2007**

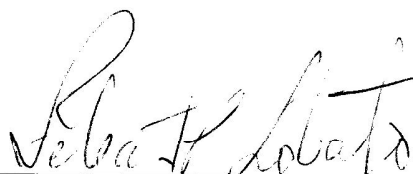
A663p Araújo, Amanda Soriano, 1979-  
Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha / Amanda Soriano Araújo. –2007.  
57p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Soro antiofídico – Teses. 2. Antivenenos – Teses. 3. Veneno de cobra – Teses. 4. Animais – Experimentação – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 615.942

Dissertação defendida e aprovada em 14 de dezembro de 2007, pela Comissão Examinadora constituída por:



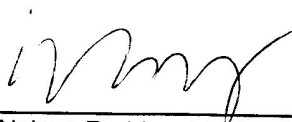
---

Profa. Zélia Inês Portela Lobato  
Orientadora



---

Dr. David Toledo Velarde



---

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



## **DEDICATÓRIA**

Esta dissertação é dedicada a minha mãe Valéria, por nunca deixar de acreditar em mim e na vida e a meu namorado Marcos, por me fazer sonhar novamente.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos seres mais que maravilhosos que nos últimos meses me ajudaram, orientaram, aconselharam, apoiaram, financiaram e acreditaram:

À Profa. Zélia Inês Portela Lobato, pela orientação e amizade.

Ao pesquisador David Toledo Velarde, pelo convite para que eu fizesse parte deste trabalho.

Aos professores Marcos Bryan Heinemann, Andrey Pereira Lage, Rômulo Cerqueira Leite, Francisco Lobato e Nelson Rodrigo, pelos ensinamentos e conselhos.

À Jaqueline Silvana pela imensurável colaboração.

Aos amigos e agregados do Labvirus: Iara, Fábria, Priscila, Simone, Isabella, Isabelle, Cíntia, Tércia, Ana Carolina, Marieta, Felipe e Catarina, por tornarem esta trajetória bem menos tortuosa.

Aos funcionários: Cássia, Grazielle, Eduardo, Nádia, Doracy, Nilda e Mirly, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus familiares: Mamãe, Bárbara, Osvaldo, Vanessa, Renato e Roger, por acreditarem sempre.

Às amigas: Paulinha, Karlinha, Renatinha e Aninha, por suportarem minha ausência por tanto tempo.

Ao meu namorado Marcos, pelo incentivo e carinho.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

---

***Pense Grande***

***Comece Pequeno***

***Ande Rápido!***

---

---

## SUMÁRIO

---

|  | Pág.      |
|--|-----------|
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | <b>11</b> |
| 3.1. PROPRIEDADES DO VENENO BOTRÓPICO.....   | 11        |
| 3.2. A IMUNOGLOBULINA Y .....  | 13        |
| 3.2.1. Histórico.....  | 13        |
| 3.2.2. Estrutura Molecular e Propriedades Bioquímicas .....  | 14        |
| 3.2.3. Vantagens do Uso na Produção de Soro Antiofídico .....  | 16        |
| 3.2.4. Outras Características Importantes da Molécula .....  | 19        |
| 3.2.5. Outras Aplicações .....   | 21        |
| 3.2.6. Métodos de Purificação .....  | 22        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>24</b> |
| 4.1. VENENOS .....   | 24        |
| 4.2. ANIMAIS .....   | 24        |
| 4.3. IMUNIZAÇÕES.....  | 24        |
| 4.4. PROCESSAMENTO DOS OVOS .....  | 26        |
| 4.5. DELIPIDAÇÃO DA GEMA.....  | 26        |
| 4.6. PURIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA Y .....   | 26        |
| 4.7. TESTES EMPREGADOS.....  | 27        |
| 4.7.1. ELISA.....  | 27        |
| 4.7.2. Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar .....   | 28        |
| 4.7.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....   | 28        |
| 4.7.4. Potência do Antiveneno.....   | 28        |
| 4.8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....  | 29        |
| 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 29        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>29</b> |
| 5.1. ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA IMUNE DE GALINHAS<br>FRENTE A DIFERENTES ESQUEMAS DE IMUNIZAÇÃO.....         | 29        |
| 5.2. ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE<br>DELIPIDAÇÃO DA GEMA.....                                     | 31        |
| 5.3. PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DE IMUNODIFUSÃO RADIAL PARA<br>QUANTIFICAÇÃO DE IgY ESPECÍFICA ANTIBOTRÓPICA ..... | 39        |
| 5.4. AVALIAÇÃO DA CURVA DE PRODUÇÃO DE IgY ANTIBOTRÓPICA.....  | 41        |
| 5.5. ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE<br>PURIFICAÇÃO DA IgY.....                                      | 42        |
| 5.6. RENDIMENTO DA IgY .....   | 49        |
| 5.7. TESTE DE POTÊNCIA DO ANTIVENENO PRODUZIDO ATRAVÉS DE<br>ENSAIO DE DE-50.....                                | 50        |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....   | <b>50</b> |

|    |  |           |
|----|--|-----------|
| 7. | <b>PERSPECTIVAS .....</b>              | <b>51</b> |
| 8. | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>51</b> |

---

**LISTA DE TABELAS**

---

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1.  | Comparação do uso das imunoglobulinas Y e G na produção de soro hiperimune.....                | 21 |
| Tabela 2.  | Esquema do primeiro ciclo de imunização.....   | 25 |
| Tabela 3-  | Esquema do segundo e terceiro ciclos de imunizações.....                                       | 25 |
| Tabela 4-  | Alterações de temperatura, pH e diluição avaliadas durante a extração de lípidos da gema.....  | 26 |
| Tabela 5-  | Influência de diferentes temperaturas no processo de extração de lípidos da gema.....          | 33 |
| Tabela 6-  | Influência de diferentes pH no processo de extração de lípidos da gema....                     | 35 |
| Tabela 7-  | Influência de diferentes diluições no processo de extração de lípidos da gema.....             | 37 |
| Tabela 8-  | Estimativa da perda de IgY específico antibotrópico durante a delipidação..                    | 37 |
| Tabela 9-  | Análises das amostras purificadas por precipitação com ácido caprílico.....                    | 42 |
| Tabela 10- | Análises das amostras purificadas por precipitação com polietilenoglicol.....                  | 45 |
| Tabela 11- | Análises das amostras purificadas por precipitação com sulfato de amônio.....                  | 47 |
| Tabela 12- | Análise das amostras purificadas por precipitação com ácido caprílico e sulfato de amônio..... | 49 |

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1-  | Frações do veneno botrópico.....   | 13 |
| Figura 2 - | Comparação estrutural entre Imunoglobulina G e Imunoglobulina Y.....   | 15 |
| Figura 3-  | Composição lipoprotéica da gema.....   | 22 |
| Figura 4-  | Ciclos de Imunizações.....   | 25 |
| Figura 5-  | Comparação da resposta imune de galinhas frente a diferentes esquemas de imunização.....                           | 31 |
| Figura 6-  | Aspecto das amostras submetidas a diferentes temperaturas durante o processo de delipidação.....                   | 33 |
| Figura 7-  | Aspecto das amostras submetidas a diferentes pH durante o processo de delipidação.....                             | 35 |
| Figura 8-  | Conformação rígida da IgY.....   | 39 |
| Figura 9-  | Curva de produção de IgY do Grupo 1, envolvendo as 25 semanas seguintes à primeira imunização com o antígeno.....  | 41 |
| Figura 10- | Gel de poliacrilamida mostrando a eletroforese do sobrenadante resultante da precipitação com ácido caprílico..... | 43 |
| Figura 11- | Gel de poliacrilamida mostrando a eletroforese das amostras precipitadas com polietilenoglicol.....                | 45 |
| Figura 12- | Gel de poliacrilamida mostrando a eletroforese das amostras precipitadas com sulfato de amônio.....                | 47 |

---



## RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi processar, purificar e testar a potência do antiveneno botrópico produzido a partir de ovos de galinhas imunizadas com antígeno botrópico padrão. Galinhas adultas mestiças da variedade Single Comb White Leghorn foram imunizadas com veneno de cinco espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, após três ciclos de imunizações em intervalos de seis semanas. A extração de lípidos da gema foi realizada através do método de diluição em água ultrapura (1:10), seguida de alteração de pH para 5,0 e de ciclo de congelamento/descongelamento. A purificação da imunoglobulina Y (IgY) foi feita por precipitação com sulfato de amônio 20% (p/v), sendo recuperados 2,69mg de IgY/ml de gema por esta metodologia. As gemas das galinhas imunizadas continham anticorpos capazes de neutralizar a atividade tóxica letal do veneno botrópico. A dose média efetiva (DE-50) da IgY antibotrópica foi de 365 $\mu$ l/2DL-50 e 1ml de antiveneno foi capaz de neutralizar 0,154mg de veneno.

Palavras chave: IgY, soro antiofídico, *Bothrops*, *Gallus gallus domesticus*.

## ABSTRACT

The aim of this work was develop an antivenom from eggs of hens immunized with *Bothrops* antigen and to evaluate its potency. Adults Single Comb White Leghorn hens were immunized with venom of five species of snakes of the genus *Bothrops*. The purification of the immunoglobulin Y (IgY) was done by ammonium sulfate 20% precipitation (w/v) and 2.69mg of pure IgY/ml of yolk was produced. The IgY from egg-yolk neutralized the toxic lethal activities of *Bothrops* venom. The median effective dose (ED-50) of the IgY anti-*Bothrops* venom was 365 $\mu$ L/2LD-50 and 1ml neutralized 0.154mg of venom.

Keywords: IgY, antivenom, *Bothrops*, *Gallus gallus domesticus*.

## 1. INTRODUÇÃO

Acidentes envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* são considerados os mais importantes acidentes ofídicos do país, devido ao seu grande número de ocorrências (mais de 80% dos casos notificados no Brasil, com a mortalidade em torno de 0,5%). São acidentes que acometem na maioria das vezes trabalhadores rurais, ocorrendo longe dos centros onde são encontrados os soros antiofídicos, único tratamento específico e eficaz na neutralização das ações do veneno. Estes soros, por serem de origem equina e não estarem liofilizados, exigem sistema de refrigeração e também assistência médica especializada para acompanhar possíveis reações colaterais graves nos pacientes tratados. Assim, os acometidos deverão ser transportados até o local de aplicação do soro, onde existam atendimento médico especializado e equipamentos de emergência, sendo que o tempo gasto durante este transporte agrava o quadro de intoxicação.

As reações colaterais graves que podem ocorrer durante o tratamento com soro hiperimune produzido em eqüinos são: reações do complemento, choque anafilático e doença do soro. Os sintomas observados podem limitar-se à pele ou evoluir para broncoespasmo, edema de glote, hipotensão e choque. A maioria desses sintomas é devido à ação de altas concentrações de proteínas que não são imunoglobulinas e que estão presentes no soro hiperimune disponível comercialmente. Contudo, as próprias moléculas de imunoglobulina são capazes de desencadear uma reação alérgica no paciente, pela ativação de seu sistema complemento através da ligação das proteínas deste sistema ao domínio C<sub>γ</sub>2 da fração Fc da imunoglobulina G (IgG) do eqüino.

Para reduzir os efeitos colaterais da soroterapia é essencial obter anticorpos antiveneno em uma forma pura, além de um tratamento enzimático com pepsina para

eliminar a fração Fc da IgG. Entretanto, além desta etapa acrescentar mais custos ao processo, ela é responsável pela perda da atividade específica da IgG, cuja recuperação final é da ordem de 40% da atividade específica inicial. Além disso, em alguns lotes o tratamento enzimático não elimina toda a fração Fc da IgG, mantendo pequena quantidade como contaminação, o que pode provocar reações de hipersensibilidade a quem as recebe.

Quanto maior o tempo gasto para início do tratamento com o soro antiofídico, maior a dificuldade de reversão do quadro clínico do paciente, maior o número de ampolas necessárias para reversão deste quadro (o que aumenta ainda mais a possibilidade de reações indesejáveis), maior tempo de internação do paciente, maior risco de amputações e óbitos, maior período de inatividade do trabalhador, tornando-se, portanto mais elevado o custo social do indivíduo.

A possibilidade de se dispor num futuro próximo de soros obtidos a partir de ovos de galinhas imunizadas com venenos ofídicos, aparece com grandes vantagens sobre o soro antiofídico atual, principalmente em relação à demora do início do tratamento do paciente. Isto porque embora a imunoglobulina originária da gema de ovos de galinhas, denominada imunoglobulina Y (IgY), possua estrutura molecular semelhante à IgG dos mamíferos, a sua fração Fc apresenta ausência de um domínio, o que lhe confere a característica de não ativar o sistema complemento de mamíferos, diminuindo consideravelmente o risco de efeitos adversos secundários à administração do soro. Assim, o soro contendo IgY poderia ser usado no próprio local do acidente sem a presença do clínico especializado. Sua aplicação rápida diminuiria o custo direto pelo uso reduzido de ampolas, aceleraria a recuperação do paciente, reduziria os riscos de maiores complicações secundárias e custo de internação, viabilizando o seu retorno à vida ativa em um tempo menor. Em adição, com a produção do antiveneno em ovos de galinha não haveria a necessidade de se

tratar enzimaticamente o soro, diminuindo custos, além de reações alérgicas, e tendo uma recuperação maior da imunoglobulina ao final do processo.

A produção de soro em ovos de galinha também apresenta outras vantagens em relação à produção em eqüinos, sendo elas: a) a obtenção dos anticorpos de galinhas é um processo natural, portanto não invasivo o que minimiza o sofrimento do animal usado na produção; b) os sistemas de criação e nutrição de galinhas são muito mais econômicos que nos mamíferos (principalmente os eqüinos que necessitam de uma grande área para sua criação) e c) determinadas variedades de galinhas botam ovos 280 dias por ano, em média, contribuindo para uma maior produção de IgY/ galinha/ ano.

Neste trabalho foram avaliados três esquemas de imunização de galinhas com o veneno botrópico, além de diversos métodos de delipidação da gema e purificação da IgY, a fim de se obter um método mais eficaz e menos oneroso de produção do antiveneno botrópico em ovos de galinha.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Produzir, processar e purificar antiveneno botrópico a partir de ovos de galinhas imunizadas com antígeno botrópico padrão e testar sua potência.

### 2.2. Específicos

- a) Fazer um estudo comparativo da resposta imune em galinhas frente a diferentes esquemas de imunização com o veneno botrópico.
- b) Fazer um estudo comparativo dos diferentes métodos de delipidação da gema.
- c) Padronizar um teste de imunodifusão radial para quantificação de IgY

produzido em ovos de galinhas imunizadas.

- d) Avaliar a curva de produção de IgY antibotrópico produzido a partir de ovos de galinhas imunizadas, através de um ELISA.
- e) Comparar diferentes métodos de purificação de IgY.
- f) Testar a potência do extrato de gema produzido em ensaio de DL-50 e DE-50.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Propriedades do veneno botrópico

Venenos de serpentes são constituídos por 90 a 95% de proteínas (S'antana et al., 2004). No gênero *Bothrops*, enzimas, toxinas e peptídeos farmacologicamente ativos são os principais componentes deste veneno. Entretanto, este pode apresentar variações na composição, diferenciando-se entre espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie dependendo de sua distribuição geográfica, do sexo do animal e da variação sazonal (Rocha e Furtado, 2005).

Por possuir atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica, esta mistura complexa de componentes potencialmente tóxicos é responsável por causar distúrbios da hemostasia, incluindo alterações na coagulação sangüínea e edema, além de miotoxicidade. A atividade proteolítica é responsável pela decomposição de proteínas e pelo processo inflamatório do tecido, causando lesões locais como edema, dor e necrose. É causada por frações do veneno bioquimicamente heterogêneas, com especificidades diversas, que atuam de maneira complexa e inter-relacionada (Azevedo-Marques et al., 2003). A atividade coagulante é devido à ativação de protrombina e fator X pela fração tipo trombina (*trombin-like*), onde há conversão direta do fibrinogênio em fibrina (Silva et al., 2003), levando à coagulação intravascular disseminada. Na atividade hemorrágica, hemorraginas são

responsáveis por lesões na membrana basal dos capilares. O consumo de fatores pela coagulação intravascular disseminada, juntamente com alteração na função plaquetária, agrava o quadro de hemorragia (Melo et al., 2004).

As proteínas responsáveis por estas alterações são metaloproteases, fosfolipases (PLA2), L-aminoácido oxidases (LAO), nucleases, serinoproteases, entre outras (Fig. 1).

As metaloproteases são responsáveis pela atividade hemorrágica, constituindo a classe de proteínas que é mais diretamente relacionada com o quadro clínico característico do envenenamento botrópico. Elas agem destruindo a microvasculatura, levando ao extravasamento de líquidos e a liberação de mediadores da inflamação. Assim como as serinoproteases, elas também possuem atividade fibrinolítica e/ou

fibrinogenolítica. As metaloproteases são zinco-dependentes, podendo ser inibidas por agentes quelantes como EDTA e fenantrolina (Silva et al., 2003). Já as PLA2 são responsáveis por degradar os fosfolipídios da membrana plasmática e inibir a agregação plaquetária. Além de sua função catalítica, dependendo da classe da PLA2, atividade miotóxica também pode ser observada. As LAO são enzimas que catalisam a deaminação oxidativa de diversos L-aminoácidos terminais, sendo metionina, leucina, triptofano e fenilalanina seus melhores substratos (Pessatti et al., 1995).

Segundo Wen (2000), os efeitos locais do veneno são apenas parcialmente neutralizados pelo soro específico. Contudo, os antivenenos utilizados na soroterapia deverão conter anticorpos capazes de neutralizar a maioria, senão todos, os componentes tóxicos do veneno.

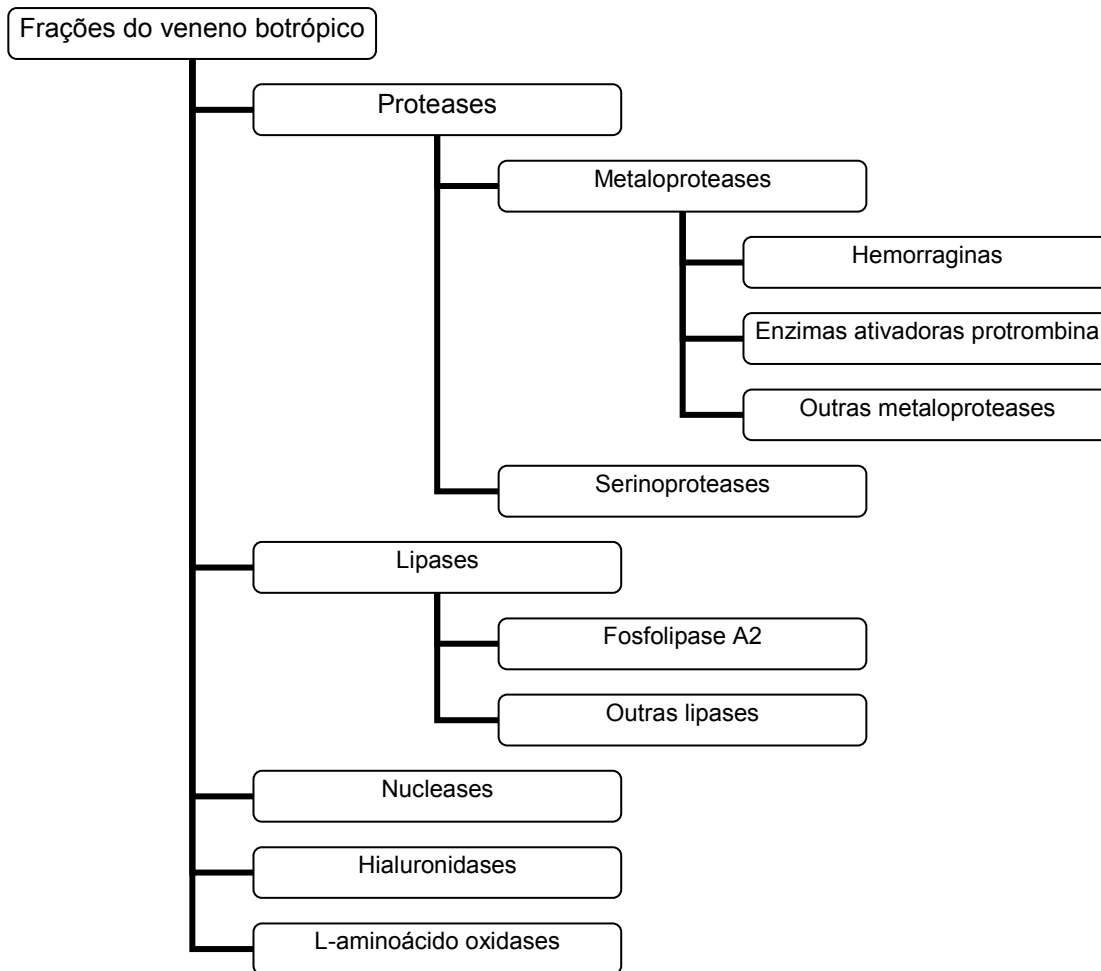


Figura 1. Frações do veneno botrópico (ilustração baseada em Azevedo-Marques et al., 2003)

## 3.2. A imunoglobulina Y

### 3.2.1. Histórico

A primeira descrição da imunização de galinhas para produção de imunoglobulina específica ocorreu em 1893. Klemperer, um pesquisador alemão, imunizou galinhas com um caldo de cultivo de *Clostridium tetani*. Após certo tempo, coletou seus ovos e inoculou intraperitonealmente diferentes concentrações de extratos de gema em grupos de ratos. Assim, ele demonstrou que os ratos que haviam recebido os extratos de gema estavam protegidos contra posteriores desafios letais da toxina inoculada

intraperitonealmente, enquanto os ratos que não haviam recebido anteriormente o extrato de gema morriam rapidamente. Foi assim que pela primeira vez foi estudada a transferência passiva de anticorpos da galinha para o ovo (Carlander, 2002).

Esta linha de pesquisa foi abandonada por décadas, até que em 1959, Russel e Burch trouxeram o assunto novamente à tona, citando a técnica de purificação de imunoglobulinas a partir de ovos de galinha como uma técnica alternativa que reduzia o sofrimento de animais utilizados na pesquisa, já que a coleta de ovos era um método não invasivo, o que não ocorria

quando se trabalhava com imunoglobulinas derivadas do soro de mamíferos (Russel e Burch, 1992).

Até 1969 a imunoglobulina isolada de gema de ovos de galinha recebia o nome de IgG aviário, por ter uma grande semelhança com a imunoglobulina G encontrada em mamíferos. Foi nesse ano que Leslie e Clem iniciaram seus estudos com esta molécula. A purificação e caracterização antigênica da IgY, assim como a determinação do seu tamanho molecular e de suas respectivas cadeias, mostraram considerável diferença com a IgG. Foi a partir de então que a IgG aviária passou a ser denominada de imunoglobulina Y (Leslie e Clem, 1969).

Com os avanços da avicultura industrial nas últimas décadas, o estudo da IgY como fonte de anticorpos para a pesquisa foi muito estimulado, principalmente em se tratando dos custos de produção. Não só por ser um animal pequeno e com uma relativa facilidade de manejo, a galinha passou a produzir até 280 ovos por ano (linhagens de alta postura), sendo capaz de produzir muito mais anticorpos que um mamífero de laboratório. Além disso, não seria necessário o sacrifício do animal para obtenção de seu soro sanguíneo, como é feito até os dias de hoje com coelhos e camundongos de laboratório.

A partir de 1980, IgY passou a ser disponível comercialmente, conjugada a fluoresceína, fosfatase alcalina ou peroxidase, o que incrementou seu uso na pesquisa. Foi em 1989 que foi descrito pela primeira vez o uso de IgY em Imunohistoquímica (Schimidt et al., 1989).

Em 1995, a produção e uso da IgY tanto na pesquisa como no diagnóstico, tratamento e profilaxia de doenças passou a ter a denominação de "Tecnologia IgY", nome dado por C. Staak. Neste mesmo ano, o Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos recomendou o uso da IgY na substituição à IgG mamífera, na tentativa de se reduzir o sofrimento e morte de animais de laboratório (Chacana et al., 2004).

Em 1998, foi realizado no Brasil, um estudo sobre o desenvolvimento de antiveneno ofídico em galinhas e técnicas de purificação de imunoglobulinas Y da gema (Almeida et al., 1998).

Em 1999, a Tecnologia IgY foi aprovada como método alternativo de melhorar o bem estar animal, pelo *Office Vétérinaire Federal* na Suíça.

Hoje, a tecnologia IgY tem sido muito estudada por pesquisadores da área da saúde, na intenção de se utilizar estes anticorpos principalmente em imunoterapia e imonoprofilaxia médica e veterinária.

### **3.2.2. Estrutura molecular e propriedades bioquímicas**

Evidências fisiológica e antigênica indicam que a IgY ocorre nas classes dos anfíbios, répteis e aves, sendo provável sua existência em peixes pulmonares; diferentemente da IgG, presente somente em mamíferos (Warr et al., 1995). Como a IgG, a IgY aviária é composta de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Não há um consenso sobre seu peso molecular, sendo que a literatura apresenta divergências. Foi estabelecido pela maioria dos autores como sendo de 180.000 Daltons (Warr et al., 1995; Akita e Li-chan, 1998; Bizanov et al., 2004). Entretanto, alguns autores afirmam ter esta molécula 167.250 Da, com sua cadeia leve apresentando 18.660 Da e sua cadeia pesada apresentando 65.105 Da (Carlander, 2002; Chacana et al., 2004). Enquanto Leslie e Clem (1969) relatam um peso molecular de até 206.000 Da, Devi et al. (2002) estabeleceram seu peso em 190.000 Da. Uma observação importante feita pelos mesmos autores foi que a imunoglobulina obtida por eles foi uma mistura protéica heterogênea, com peso molecular entre 180.000 e 200.000 Da. A IgG mamífera tem cerca de 160.000 Daltons, sendo pouco menor que a IgY. Uma diferença interessante entre as duas é que a cadeia leve da IgY é considerada mais leve que a da IgG (cerca de 25.000 Da) e a cadeia pesada da IgY é considerada mais pesada que a da IgG (cerca de 55.000 Da). O

fragmento Fab da IgY isoladamente pesa em torno de 45.000 Daltons.

Assim como a IgG, a cadeia leve da IgY contém um domínio variável e um domínio constante. Entretanto, enquanto a IgG contém um domínio variável e três domínios constantes em sua cadeia pesada, a IgY contém um domínio variável e quatro domínios constantes (Fig. 2), assemelhando-se a molécula de IgE. Esta cadeia pesada, denominada de cadeia upsilon ( $\upsilon$ ), apresenta certa homologia entre seus domínios constantes e os da IgG mamífera. A  $C_{\upsilon 3}$  e  $C_{\upsilon 4}$  da IgY é intimamente relacionada a  $C_{\gamma 2}$  e  $C_{\gamma 3}$  da IgG, respectivamente. Enquanto alguns autores afirmam que o domínio  $C_{\upsilon 2}$  está ausente na cadeia pesada da IgG (Carlander, 2002), outros dizem que ele está presente representando a região *hinge* da IgG (Chacana et al., 2004). O que a maioria dos autores afirma é que o domínio  $C_{\upsilon 2}$  está provavelmente condensado para formar a região *hinge* na IgG, o que não ocorre na IgY, fato confirmado por Warr e Magor (1995) em seus estudos sobre IgY como antecessora evolutiva de IgG, IgE e IgA de mamíferos. Este pouco desenvolvimento da região *hinge* da IgY pode ser responsável pela pouca flexibilidade da região Fab, fazendo com que este anticorpo seja mais rígido, afetando sua capacidade de precipitar e aglutinar antígenos.

O fragmento Fc da IgY mostra-se mais resistente a digestão pela papaína comparando-se com a IgG mamífera, mas a clivagem com pepsina é viável. Segundo Akita e Nakai (1993), a pepsina cliva a molécula na região  $C_{\upsilon 2}$ , formando fragmentos Fab monovalentes, diferentemente do que ocorre na digestão peptídica de IgG mamífera, onde há formação de Fab bivalente.

Assim como na IgG, é na fração Fc que ocorrem a maioria das funções biológicas efectoras da IgY. Esse fragmento da IgY contém duas cadeias laterais de carboidratos, enquanto que o mesmo fragmento da IgG apresenta uma só.

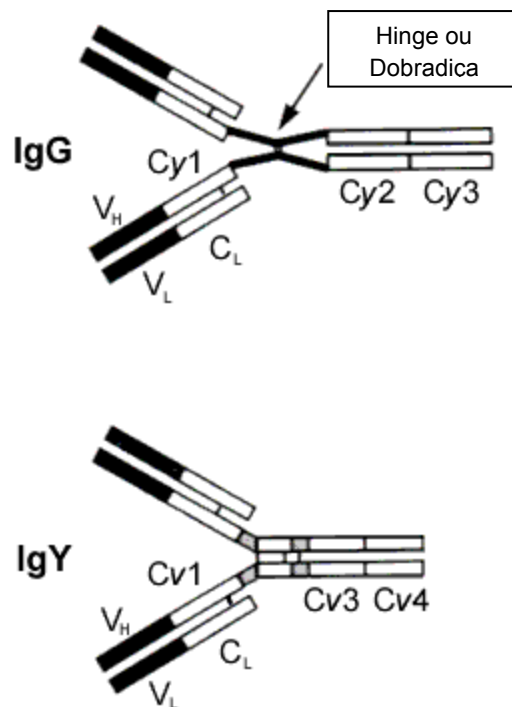


Figura 2. Comparação estrutural entre IgG e IgY (Fonte: Warr et al., 1995).

Quanto aos parâmetros físico-químicos da IgY, seu ponto isoelétrico foi definido por Ambrosius e Hadge (1987) como pH 6,0. Davalos-Pantoja et al. (2000) afirmaram estar entre os pH 5,7 e 7,6. Segundo Shimizu et al. (1992), a IgY é mais sensível a desnaturação em pH baixo que a IgG, o que se inicia a partir do pH 4, perdendo totalmente sua atividade como imunoglobulina a partir do pH 3. Estes resultados também foram confirmados posteriormente por Hatta et al. (1993) e por Lee et al. (2002). Como esta rápida perda de atividade não é devido a quebra peptídica (o que foi demonstrado através de SDS-PAGE por Shimizu, 1998), o baixo pH causa, provavelmente, uma alteração na conformação da proteína.

Em se tratando da temperatura, IgY é considerada estável ao aquecimento. Jaradat e Marquadt (2000) demonstraram que esta proteína é estável até 60°C, sendo que Carlander (2002) afirmou que a maioria de sua atividade persistiu após 15 minutos a 70°C. Segundo Hatta et al. (1993), a pasteurização a 60°C por 3,5 minutos não

afeta a atividade imunológica da IgY. Um estudo interessante feito por Lösch et al. (1986) demonstrou que ovos cozidos por 6 minutos em água a 100°C não diminuem sua concentração de IgY. Vários trabalhos têm ressaltado que a adição de diversos açúcares como sacarose e lactose à amostras de IgY, pode aumentar a resistência desta à inativação térmica (Shimizu et al., 1994 e Jaradat e Marquardt, 2000). Quando a refrigeração da IgY não é possível, xarope de sacarose a 50% pode ser usado como preservativo térmico.

Segundo Olovsson e Larsson (1993), alíquotas de IgY estocadas em salina a 4°C com 0,02% de NaN<sub>3</sub>, permaneceram por até 10 anos sem haver perdas significantes em seus títulos. Anticorpos biotinilados e purificados por imunoafinidade permaneceram por cinco anos estocados a 4°C, também mantendo sua alta atividade. Já outro estudo constatou que um ovo pode ser estocado a 4°C, com uma pequena perda na atividade da IgY, por pelo menos seis meses (Ricke et al., 1988).

Quando se estudou a estabilidade da IgY a diferentes temperaturas de congelamento, foi observada uma perda de 50% de atividade desses anticorpos quando conservados a -70°C por 12 meses (Staak et al., 2000). O mesmo estudo mostrou que quando a IgY é conservada a -20°C ocorre mínima perda dessa atividade. Entretanto, Goldring e Coetzer (2002) afirmaram que a IgY isolada não deveria ser congelada e que estocada a 4°C permaneceria viável por diversos anos.

### **3.2.3. Vantagens do uso da IgY na produção de soro antiofídico**

#### **3.2.3.1. Não ativa o sistema complemento de mamíferos**

Como citado anteriormente, os soros antiofídicos produzidos em eqüinos podem causar efeitos colaterais em pacientes que os recebem. A principal causa desses efeitos é a presença de impurezas nesses soros, sendo estas: ou proteínas não imunoglobulínicas ou imunoglobulinas que não reagem aos componentes do veneno

(Carroll et al., 1992). Soros com alta porcentagem dessas proteínas podem causar tanto reações anafiláticas, o que ocorre em indivíduos que foram previamente expostos a produtos que continham proteínas de origem eqüina (adquirindo, portanto, sensibilidade contra estas), quanto reações anafilactóides, que são reações que não dependem da exposição prévia ao antígeno.

As reações anafiláticas acontecem logo após a administração do soro, sendo classificadas como hipersensibilidade tipo I. Ocorrem quando imunoglobulinas E (IgE) produzidas em uma exposição anterior a proteínas de origem eqüina, se ligam a estas, formando um complexo antígeno-anticorpo que se ligará à membrana de mastócitos. Ocorrerá sua degranulação, liberando mediadores químicos que agirão na parede vascular, aumentando sua permeabilidade. O extravasamento de líquidos destes vasos poderá causar diminuição abrupta da pressão arterial, diminuindo a distribuição de oxigênio para diversos órgãos, entre eles o cérebro e os rins. Esta poderá ser a causa da morte do paciente. Embora consideradas reações raras, devido a sua gravidade é necessário manter a pessoa em tratamento na unidade de saúde, onde se dispõem de medicamentos e pessoal capaz de atender prontamente a esta emergência.

Entretanto, mesmo as imunoglobulinas específicas antiveneno botrópico podem ser responsáveis pelo aparecimento de reações colaterais em pacientes submetidos à soroterapia. Isto acontece porque a IgG eqüina detém um domínio em sua fração Fc capaz de ativar o sistema complemento humano. A grande quantidade de proteínas heterólogas seria a responsável pela formação de agregados de imunoglobulinas e/ou imunocomplexos na circulação, ativando o sistema complemento, o que levaria a formação de anafilotoxinas (C3a, C4a e C5a). O desencadeamento de uma resposta inflamatória pela ativação do complemento poderá culminar em colapso circulatório (MANUAL de...; 2001). Esta reação anafilactóide pode se manifestar nas primeiras 24 horas após a administração do



soro, também sendo necessária a observação do paciente durante este período em uma unidade médica especializada.

Outra reação anafilactóide importante que poderá ser desencadeada devido à administração do soro antiofídico é a chamada doença do soro. É uma reação de hipersensibilidade tipo III, ocorrendo de 7 a 10 dias após a soroterapia, onde a deposição dos complexos imunes formados pela ligação do veneno a IgG específica em tecidos e endotélio vascular poderá produzir uma lesão tissular pela ativação do complemento. Órgãos como pele, articulações e rins são os mais acometidos.

Em um estudo realizado por Larsson et al. (1993), foram comparadas as habilidades em ativar o complemento de humanos tanto da IgG mamífera como da IgY aviária, em um teste de ELISA. Os resultados mostraram que enquanto a IgG era responsável por ativar o complemento de amostras humanas, isso não ocorria quando se utilizava IgY de galinha. Segundo Gigli e Austen (1971), anticorpos de galinhas são incapazes de ativar as proteínas do sistema complemento do soro de coelhos, cobaias, bovinos, ratos, caprinos, cães e gatos, sendo que uma fraca ativação poderá ocorrer no soro de suínos.

Sem a capacidade de se ligar à proteína C1 do complemento, a IgY não seria capaz de causar a ativação da via clássica. Isto demonstra que com a utilização dessa imunoglobulina na soroterapia antiofídica, não haveria o desenvolvimento de reações anafilactóides. Com isso, o seu uso em substituição à IgG, poderia reduzir a incidência de reações colaterais durante a soroterapia antiofídica. Além disso, por não ser extraída de eqüinos, a IgY pode ser usada em pacientes que são hipersensíveis a produtos originários desses animais, diminuindo consideravelmente a incidência de reações anafiláticas.

### **3.2.3.2. Vantagens econômicas**

A utilização de galinhas como produtoras de anticorpos policlonais é economicamente

mais viável que a utilização de mamíferos para o mesmo fim. O sistema de criação e nutrição de galinhas é considerado simples e relativamente barato. A fácil manipulação desse animal conjugada com o sistema automatizado de criação diminui custos com a mão de obra, principalmente devido ao número reduzido de trabalhadores ligados diretamente a produção.

Além de produzir IgY rapidamente e em grandes quantidades, galinhas mantêm altos níveis de anticorpos específicos por um longo período (Polson et al., 1980). Outro ponto a ser considerado é a menor quantidade de antígeno requerido para hiperimunização devido ao baixo peso corporal de galinhas, reduzindo ainda mais o custo da produção (Carrol et al., 1992; Larsson et al., 1998).

A eficiência da produção de anticorpos a partir de ovos tem sido comparada com a produção originária de soro de outros mamíferos. A produtividade da IgY de galinha, quando usada gema de ovo como fonte de anticorpos, pode ser de 5 a 10 vezes maior que a produtividade de IgG de um coelho, dependendo do adjuvante utilizado durante a imunização (Svendsen et al., 1996). Segundo Gottstein e Hemmeler (1985), a quantidade de IgY purificada produzida em um mês por uma galinha é 18 vezes mais alta que a IgG isolada do soro de um coelho imunizado contra o mesmo antígeno. Schade et al. (1991) afirmaram que uma única gema originária de uma galinha imunizada pode conter mais imunoglobulina que 300ml de soro de coelho.

Thalley e Carrol (1990) afirmam que galinhas produzem aproximadamente 200ml de gema/Kg de peso vivo/mês, comparado com aproximadamente 10ml de soro/Kg de peso vivo/mês obtido da sangria de mamíferos.

Entretanto, a maior vantagem encontrada quando se trabalha com produção de anticorpos em ovos é que determinadas linhagens de galinhas produzem cerca de 280 ovos por ano, contribuindo para uma maior produção de IgY/galinha/ano.

Segundo Schade et al. (2005) uma só ave pode produzir de 20 a 40g de IgY total por ano. Chacana et al. (2004) encontraram uma concentração similar, 17 a 35g/ave/ano.

A quantidade de IgY por ovo está relacionada ao tamanho do mesmo e com variações fisiológicas individuais. De 100 a 400mg de IgY são obtidas de um único ovo (cerca de 15ml de gema), sendo a variação dependente também da linhagem genética da ave, segundo Schade et al. (2005). Chang et al. (2000) obteve 15mg de IgY por ml de gema.

Em um estudo comparativo da produção de IgY em ovos de diferentes linhagens de galinhas, Carlander et al. (2002) concluíram que a linhagem Single Comb White Leghorn foi a mais produtiva entre as linhagens estudadas ( $2,21 \pm 0,44$ mg/ml de gema). Em outra pesquisa realizada por Li et al. (1998) a linhagem Single Comb White Leghorn também foi considerada a mais produtiva. É importante ressaltar que os ovos dessa linhagem apresentaram peso mais elevado que das outras linhagens estudadas.

Embora seja alta a quantidade de IgY encontrada no ovo, somente 3 a 3,2% (Li et al., 1998; Akita e Li-Chan, 1998) é específica ao antígeno inoculado. Ntakirutimana et al. (1992) afirmaram que de um único ovo podem ser extraídas 4mg de IgY específico contra transferrina humana. Coelhos imunizados com o mesmo antígeno produziram somente 1,74mg de IgG por ml de soro.

Segundo Akita e Li-Chan (1998) que produziram IgY anti-subclasses de IgG, uma alta produção de IgY específica, 6 a 7,5mg, são obtidos da fração hidrofílica da gema. Se a produção for de 280 ovos/galinha/ano, até 2,1g de IgY específico seria obtido de uma única galinha em um ano.

Em um trabalho realizado por Motoi et al. (2005), 1,2 grama de IgY purificado contra proteínas do vírus da raiva foi obtido de 180 gramas de gema de ovo, o que corresponde a 12 ovos, aproximadamente. Somente 1,4

gramas de IgG pode ser obtido de um coelho imunizado, segundo este autor.

Deve-se salientar que a quantidade de IgY específica extraída do ovo depende do tipo de molécula antigênica que será inoculada no animal. Se a molécula for muito imunogênica, irá estimular muito mais eficazmente o sistema imune, produzindo maior quantidade de imunoglobulina específica por ovo. A produção de IgY contra uma proteína conservada de mamífero, por exemplo, chegou a 72mg por ovo em uma pesquisa feita por Gassmann et al. (1990). Durante a produção de imunoglobulina contra dois sorotipos de rotavirus humano (cepa Wa, sorotipo 1 e cepa Mo, sorotipo 3), por exemplo, concluiu-se que a produção de anti-HRV IgY por galinha (em um ano) foi pelo menos 15 vezes (anti-Wa) e 120 vezes (anti-Mo) mais eficiente que aquela por um coelho imunizado (Hatta, 1993). Esta grande produção aliada a baixos custos amplia os campos de estudo onde se aplica o uso da IgY.

### **3.2.3.3. Contribuição para o bem-estar animal**

Uma grande vantagem em se trabalhar com anticorpos presentes na gema de ovos de galinhas em substituição a IgG mamífera está relacionada ao bem-estar animal. Em se tratando dos conceitos de “reduzir, substituir e refinar” muito discutido pelos conselhos de ética em pesquisa com animais (Russel e Burch, 1959), a tecnologia IgY cumpre o primeiro deles, havendo grande redução nas manipulações dolorosas dos animais. A coleta de ovos é um método simples e não invasivo, diferentemente do que ocorre durante a coleta do soro em mamíferos. Além disso, há redução do número de animais utilizados na produção, já que a quantidade de anticorpos que se obtém de uma só galinha é expressivamente maior que a quantidade de anticorpos produzida por um mamífero de tamanho similar (Gottstein e Hemmeler, 1985).

### **3.2.4. Outras características importantes da molécula de IgY**

A utilização de galinhas também apresenta vantagens sobre a utilização de mamíferos na produção de soro hiperimune anti-espécie, para uso em testes de diagnóstico (Tab. 1). É comum se trabalhar com pequenos mamíferos na produção de anticorpos para servirem de reagentes para estes testes. Entretanto, a substituição de animais de laboratório pelo uso de galinhas na produção desses anticorpos também é vantajosa.

A capacidade da IgG em ativar o sistema complemento pode influenciar nos resultados de um teste de ELISA, por exemplo. Segundo Campbell et al. (1980), quando há ativação da cascata do complemento, o componente C4 ativado liga-se a região Fab da IgG, bloqueando-a e podendo interferir com a ligação do antígeno a esta região. Com isso, os resultados do teste podem ser subestimados, o que não ocorrerá caso a molécula de IgG seja substituída pela IgY.

Outras características interessantes da molécula de IgY que também favorecem sua utilização como reagente em testes imunológicos serão descritas a seguir.

#### **3.2.4.1. Apresenta grande distância filogenética da IgG mamífera**

A diferença na especificidade dos anticorpos obtidos quando aves e mamíferos são inoculados com os mesmos protocolos de imunização provavelmente é devido à distância filogenética entre estes dois animais. Quando uma proteína de origem mamífera é inoculada em uma ave a resposta imune é maior que quando a mesma proteína é inoculada em um coelho, por exemplo. Como a diferença entre o antígeno e o animal inoculado aumenta, a resposta imune geralmente aumenta também. Com isso, a quantidade de antígeno necessária para estimular uma resposta imune eficiente, neste caso, é muito menor quando se inocula aves que quando se inocula um mamífero (Gassmann et al., 1990).

Por esta mesma razão, o desenvolvimento de testes imunológicos envolvendo proteínas mamíferas altamente conservadas era impedido de ser realizado quando mamíferos de laboratórios eram utilizados na produção de anticorpos contra estas. O antígeno quando inoculado nestes animais, não estimulava uma resposta imune, pois era reconhecido como “próprio” pelo organismo. Com esta distância evolucionária entre as aves e os mamíferos, não há reatividade cruzada imunológica entre IgY e IgG. Portanto, uma proteína mamífera conservada tem maior probabilidade de ser detectada como “estranha” pelo sistema imune de uma ave, além de se detectar muito mais epítomos nessa proteína.

Além disso, em um estudo realizado por Woolley e Landon (1995) observou-se que galinhas produziam anticorpos com uma resposta de alta avidéz após uma única inoculação, o que não ocorria em mamíferos.

Em 1990, Gassmann et al. produziram pela primeira vez anticorpos contra proteínas mamíferas altamente conservadas, em ovos de galinha. Em 1993, Rosol et al. utilizaram dessa estratégia para o estudo imunohistoquímico de proteínas altamente conservadas do hormônio paratireoideano. Concluiu-se que a galinha era a melhor escolha quando se tratava de produção de anticorpos policlonais, produzindo anticorpos de alta afinidade e alta avidéz para proteínas altamente conservadas de mamíferos.

#### **3.2.4.2. Não se liga a fatores reumatóides**

Fatores reumatóides (FR) são, provavelmente, a mais bem conhecida causa de reações falso-positivas em testes imunológicos de diagnóstico. Eles são auto-anticorpos presentes na circulação sanguínea, que reagem com a fração Fc de imunoglobulinas G de mamíferos, causando na maioria das vezes a artrite reumatóide. Estes fatores geralmente se ligam a dois anticorpos, causando a aglutinação desses, que posteriormente irão se depositar como complexos imunes nas articulações. Eles

também podem ser encontrados em soros de pacientes acometidos por muitas outras doenças.

Do mesmo modo em que ocorre na circulação sanguínea dos pacientes com artrite reumatóide, FR podem se ligar a fração Fc de anticorpos utilizados em testes de ELISA diretos (onde anticorpos estão ligados a fase sólida), formando complexos imunes, mimetizando a atividade antigênica e resultando em testes falso-positivos.

Como a imunoglobulina Y não contém o domínio da fração Fc responsável pela ligação a fatores reumatóides, elas não causam resultados falso-positivos no ELISA. Em outro trabalho realizado por Larsson et al., (1991), foi feita a comparação entre IgG e IgY utilizados na fase sólida de um ELISA *sandwich*, mostrando que quando se utilizava IgG, haviam reações falso-positivas nos testes, o que não acontecia quando se utilizava a IgY.

#### **3.2.4.3. Não se liga a receptores Fc celulares**

A fração Fc de moléculas de anticorpos humanos e de outros mamíferos contém um domínio responsável pela ligação a receptores Fc celulares. Alguns receptores de células sanguíneas têm alta afinidade por IgG mamífero. Quando se trabalha com cultivo celular, a interação com receptores Fc pode causar a ativação celular e mudar a expressão de proteínas de superfície nesta célula, dificultando o estudo de outras proteínas de superfície. Em um trabalho realizado por Lindahl et al. (1992), anticorpos mamíferos usados na citometria de fluxo podem formar complexos imunes que causam ativação plaquetária, mudando a expressão do receptor GpIIb-IIIa da superfície celular. No mesmo trabalho foi

demonstrado que quando se utilizou IgY no lugar da IgG, esta ativação não era observada. Complexos imunes contendo IgG também podem estimular a produção de citocinas. Como IgG de galinha não reage com receptores Fc celulares (Schmidt et al., 1993), seu uso em substituição à IgG mamífera poderia evitar esses problemas.

Outra vantagem sobre a IgG mamífera, conseqüente a não ativação de receptores Fc celulares pela IgY é o seu uso como anticorpo primário em imunohistoquímica. Como não há ligação da IgY a receptores Fc das células presentes no corte histológico, não há ligação inespecífica a componentes celulares, havendo uma grande redução do *background* da reação (Rosol et al., 1993; Motoi et al., 2005).

#### **3.2.4.4. Não se liga a receptores Fc bacterianos**

Proteína A estafilocócica e proteína G estreptocócica são proteínas bacterianas amplamente usadas como imunoabsorventes em ensaios imunológicos devido às suas habilidades de se ligarem a fração Fc da IgG. Entretanto, elas apresentam-se como um problema quando encontradas como contaminantes em amostras bacterianas, o que freqüentemente ocorre. Quando presentes, elas podem se ligar aos anticorpos detectores com especificidade para outras bactérias e causarem resultados falso-positivos.

Em um estudo feito por Hoffman et al. (1996) foi demonstrado que IgY não reage com a proteína A ou com a proteína G, não interferindo, portanto, em testes imunológicos onde estas proteínas estão presentes.

Tabela 1. Comparação do uso das imunoglobulinas Y e G na produção de soro hiperimune (baseada em Carlander, 2002)

| Comparação  | IgY          | IgG            |
|---|--------------|----------------|
| Animal  | Galinha      | Mamíferos      |
| Fonte   | Gema do ovo  | Soro Sangüíneo |
| Avidez  | Alta         | Moderada       |
| Reações cruzadas  | Baixa        | Alta           |
| Isolamento  | Simples      | Dispendioso    |
| Estabilidade  | Alta         | Alta           |
| Produtividade   | Alta/Rápida  | Moderada/Lenta |
| Coleta da amostra                                       | Não Invasiva | Invasiva       |
| Ligação a Proteína A e a Proteína G                     | Não          | Sim            |
| Interferência com receptores Fc celulares e bacterianos | Não          | Sim            |
| Interferência com fatores reumatóides                   | Não          | Sim            |
| Ativação do sistema complemento de mamíferos            | Não          | Sim            |

### 3.2.5. Outras aplicações do uso da IgY

Além de evitar as reações inespecíficas típicas de testes realizados com anticorpos policlonais de mamíferos [podendo ser aplicados em quase todos os testes imunológicos de diagnóstico como ELISA (Ricke et al., 1988), radioimunoensaio (Vieira et al., 1986), imunoprecipitação (Song et al., 1985), imunofluorescência (Motoi et al., 2005) e imunohistoquímica (Schmidt et al., 1989)], anticorpos policlonais de galinhas também poderiam ser uma alternativa ao uso de anticorpos monoclonais.

Em 1991, Kunz et al., compararam o uso da IgY e de anticorpos monoclonais com finalidade de se avaliar as possíveis colorações inespecíficas durante um teste imunohistoquímico. Eles detectaram a presença de clamídias em vários cortes histológicos de diversos órgãos e espécies animais através do uso da IgY e da IgG. Mesmo tendo resultados considerados ótimos a partir do uso de anticorpos monoclonais, não houve diferença significativa entre as aplicações dos dois tipos de imunoglobulinas. Isto mostra que a IgG monoclonal poderia ser substituída pela

IgY em testes imunohistoquímicos, essencialmente aqueles cujo uso da IgG policlonal seria inviável, causando grandes quantidades de reações inespecíficas. Esta substituição reduziria consideravelmente o custo, tempo e trabalho gastos com a produção de anticorpos monoclonais.

Entretanto, o interesse pelo uso da IgY aumentou consideravelmente devido a suas possíveis aplicações em profilaxia e terapêutica de diversas doenças humanas e animais (Lösch et al., 1986). A administração oral de anticorpos IgY específicos contra infecções gastrointestinais em modelos animais já está descrita. Sunwoo et al. (2001) demonstrou que a união específica da IgY a superfície da *Escherichia coli* O157:H7 inibiu seu crescimento, mediante a mudanças significativas na estrutura da bactéria. Jin et al. (1998) demonstrou que anticorpos purificados da gema contra a mesma bactéria são capazes de bloquear a ligação da *E. coli* aos receptores de mucosa, reduzindo sua fixação e, portanto, sua colonização no trato gastrointestinal. Marquard et al. (1999) trataram a diarreia de leitões de 3 dias com gema em pó de ovos de galinhas imunizadas contra *E. coli* enterotoxigênica. Estes leitões foram

curados em 24 horas, enquanto que no grupo que não recebeu a gema em pó 62,5% morreram de diarreia severa. Com isso, aumenta a perspectiva do uso da IgY em substituição a antibióticos, já que seria preservada a microbiota intestinal normal do animal, além de extinguir com o risco da resistência bacteriana a antibióticos. Similarmente imunoglobulinas de gema de ovo de galinhas imunizadas podem ser usadas na fortificação de alimentos para crianças, como sugerido por Akita e Nakai (1992).

Anticorpos de ovos de galinha também foram utilizados como ferramenta na terapia contra a fibrose cística. Carlander et al. (1999) produziram IgY contra *Pseudomonas aeruginosa*, a principal causa da alta mortalidade em pacientes com esta doença. Seu experimento mostrou que gargarejos com preparações de IgY contra esta bactéria, uma vez ao dia, preveniu sua colonização nos pulmões desses pacientes, reduzindo a incidência de infecções secundárias à doença.

Outra aplicação interessante da IgY foi observada pela imunização passiva contra placa bacteriana dental (Hatta et al., 1997). Gomas de mascar, balas e chocolates contendo IgY contra *Streptococcus mutans* já têm sido comercializados contra cárie dental no Japão (Juneja, 1999).

### 3.2.6. Métodos de purificação da IgY

A gema do ovo de galinhas pode ser dividida em duas frações: os grânulos, representando a fração não solúvel e o plasma, onde estes grânulos estão suspensos (Fig. 3). Os grânulos são ricos em lipídeos, tendo como componentes principais as  $\alpha$  e  $\beta$  lipovitelinas, a fosfovitina e lipoproteínas de baixa densidade. Já o plasma, a porção hidrofílica da gema, é composto de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  livetinas e proteínas de baixa densidade (Davis e Reeves, 2002). É no plasma da gema que se encontram as IgY, representando o grupo das  $\gamma$  livetinas.

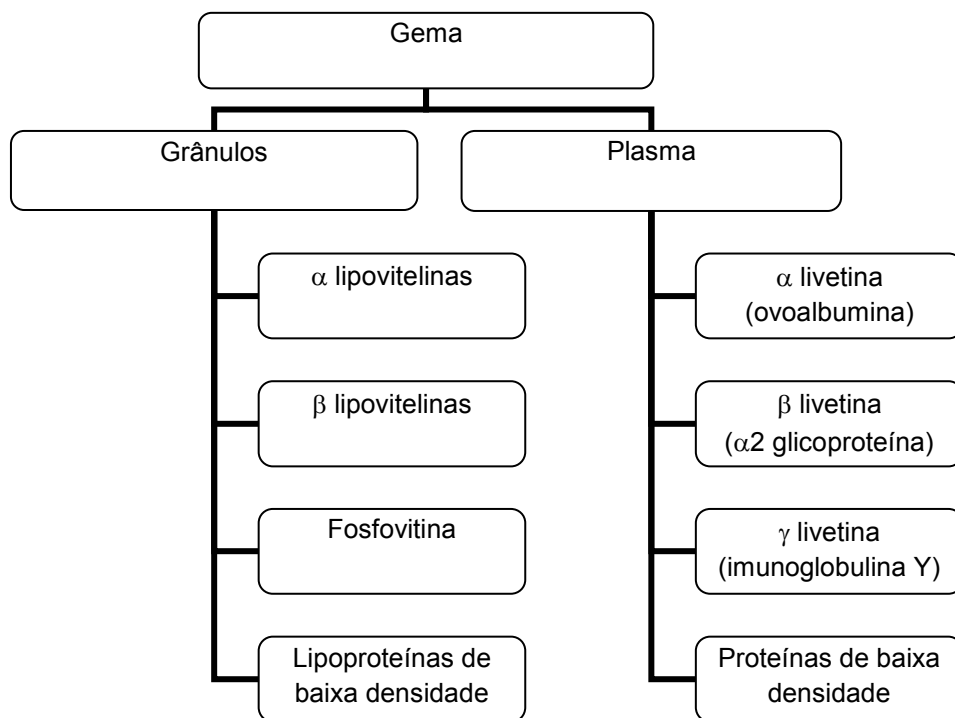


Figura 3. Composição lipoprotéica da gema (ilustração baseada em Davis e Reeves, 2002)

Os métodos de purificação de IgY descritos na literatura são compostos de duas etapas. A primeira, denominada delipidação, consiste em separar as livetinas de todas as lipoproteínas dos grânulos, sendo que a maior desvantagem em se trabalhar com imunoglobulinas originárias de gema de ovo está na extração dos lípidos encontrados nela. Um segundo passo consiste em promover a purificação deste extrato aquoso, na tentativa de se isolar a imunoglobulina.

Em 1980, Polson et al., utilizaram polietileno glicol na extração de lípidos e IgY da gema de ovo. Em 1981, Jensenius et al. demonstraram a delipidação da gema pelo polissacarídeo aniônico dextran sulfato, já que o método instituído por Polson parecia ser muito laborioso. Entretanto, o alto preço desse reagente desestimulou sua utilização em purificações de IgY. Estimulados pelas vantagens econômicas, Akita e Nakai (1992) estudaram um método de diluição em água para extrair os lípidos da gema. Como um baixo potencial hidrogeniônico era indispensável para agregação de lipídeos, eles associaram a diluição em água com o pH ácido. Horikoshi et al. (1993) adicionaram mais uma etapa ao processo, através de um ciclo de congelamento e descongelamento no intuito de aumentar a coagulação dos grânulos de lipoproteínas. Em trabalhos mais recentes Chang et al. (2000) compararam alguns polissacarídeos aniônicos em várias concentrações e pH como delipidantes da gema e Bizanov e Normantiene (2006) fizeram uma associação de polietileno glicol e clorofórmio para o mesmo fim.

Todos estes métodos possuem vantagens e desvantagens, diferindo em seus resultados com relação à pureza e quantidade de IgY extraída. Métodos que fazem uso de solventes orgânicos devem ser evitados já que alternativas melhores estão disponíveis. O uso de clorofórmio, por exemplo, é desaconselhável, já que este é um agente desnaturante, além de não ser possível a utilização dos grânulos resultantes da delipidação como produto alimentício. A delipidação da gema pelo método do polietileno glicol, por ser muito laboriosa e

produzir baixas quantidade de IgY, também deve ser substituída por um método mais eficiente. Segundo Meulenaer e Huyghebaert (2001), a técnica da diluição em água, incluindo a correção do pH e/ou o ciclo de congelamento parece ser a melhor escolha já que o mínimo de substâncias químicas são usadas, reduzindo o custo e o número de etapas do processo. Além disso, quando se utiliza esta técnica se elimina muitas etapas de centrifugação, aumentando a facilidade de uso em escala industrial e permitindo a reutilização do restante da gema como produto comestível ou para fracionamento de outros componentes biologicamente ativos (Akita e Nakai, 1993).

Um método de purificação eficiente, deve separar as IgY de outras proteínas contidas na fração solúvel da gema, o que é feito após a extração dos lípidos. Uma consideração importante a ser feita é que na gema encontramos imunoglobulinas do tipo Y, sendo que as outras duas imunoglobulinas encontradas em galinhas, IgA e IgM, estão presentes na clara do ovo (Rose et al., 1974). A IgY é transportada ativamente através do epitélio folicular do ovário para a gema por um processo mediado por receptores (Morrison et al.; 2001), estando isolada das demais classes de anticorpos presentes no ovo e sendo a única classe de imunoglobulinas presente na gema.

Há três tipos de purificações pós-delipidação descritas: precipitação com sal, cromatografia e filtração. Para um maior grau de pureza da IgY isolada, vários desses procedimentos podem ser associados.

Na purificação realizada através da precipitação, dois sais são mais amplamente usados, o sulfato de sódio e o sulfato de amônio. Não há diferenças significativas entre estes sais quanto a pureza e quantidade de IgY isoladas segundo Deignan (2000), mas o sulfato de amônio é preferível já que não é necessário um monitoramento rigoroso da temperatura como quando se utiliza o sulfato de sódio. Entretanto, Akita e Nakai (1993) utilizaram

polietileno glicol para precipitação da IgY, pela vantagem de se trabalhar em temperatura ambiente sem nenhum risco de desnaturação do anticorpo. Já McLaren et al. (1994) associaram a precipitação com ácido caprílico com a precipitação com sulfato de amônio para aumentar a pureza da IgY recuperada. A precipitação com sal para purificação de IgY deve ser repetida uma a duas vezes por elevar drasticamente a pureza da IgY recuperada.

Segundo Meulenaer e Huyghebaert (2001) a cromatografia de afinidade é o melhor tipo de cromatografia a ser utilizada para purificação de IgY. Contudo, a eluição empregada pode ter efeito deletério sobre a atividade do anticorpo (Carrol et al., 1992). Além disso, seu alto custo inviabiliza sua utilização em larga escala. Segundo Svendsen (1995), a cromatografia em coluna é mais cara e trabalhosa que o método de precipitação com sal e a matriz de gel tem ainda uma limitada durabilidade.

Outra possibilidade de purificação é a filtração tradicional ou a ultrafiltração (Kim e Nakai, 1996), tendo grande potencial para aplicações em escala industrial. Entretanto, segundo Meulenaer e Huyghebaert (2001), a precipitação é a metodologia mais barata e fácil para uso em laboratório.

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Venenos

Os venenos foram obtidos de serpentes adultas do gênero *Bothrops*. Foi feito um pool contendo 50% de veneno de *Bothrops jararaca*, 12,5% de veneno de *Bothrops jararacussu*, 12,5% de veneno de *Bothrops alternatus*, 12,5% de veneno de *Bothrops moojeni*, 12,5% de *Bothrops neuwiedii* (Norma PRT 174 do Ministério da Saúde, de 12/11/1996). A toxicidade desse pool de venenos, expresso em termos de dose letal média (DL-50) foi de 56,21µg/20g camundongo. A DL-50 foi avaliada por injeção intraperitoneal de diferentes doses de veneno em 0,5ml de salina fisiológica em camundongos albinos da raça suíça

pesando entre 18 e 22 gramas. Oito animais foram usados para cada dose testada e a leitura do teste foi feita 24 horas após as inoculações. A DL-50 foi realizada segundo a Organização Mundial de Saúde (PROGRESS in the...; 1981) e calculada através de análise de probito (Finney, 1971). O pool de veneno foi liofilizado e estocado a -20°C até o dia da imunização. A inativação do veneno foi realizada em banho Maria a 90°C por 5 minutos.

### 4.2 Animais

Vinte e sete galinhas adultas mestiças (*Gallus domesticus*) da variedade Single Comb White Leghorn, sadias, de 25 a 30 semanas de idade, alocadas em instalações padrão com três animais por gaiola, na Fazenda Experimental Hélio Barbosa (município de Igarapé) foram utilizadas. Água e comida foram fornecidas à vontade.

Camundongos albinos da raça suíça, pesando entre 18 e 22 gramas, fornecidos pelo biotério da Fundação Ezequiel Dias, foram utilizados nos ensaios de titulação e neutralização do veneno (DL-50 e DE-50).

### 4.3 Imunizações

Os animais foram separados em três grupos contendo nove animais cada (incluindo um animal controle por grupo. Um esquema de imunização diferente foi utilizado em cada grupo.

As inoculações foram feitas via intramuscular, em quatro diferentes pontos do músculo peitoral da galinha, em um volume total de 500µL. Para cada imunização foram utilizados 250µL de adjuvante mais 250µL de PBS, pH 7,4. Foram empregados 500µL de PBS, pH 7,4, nas imunizações com ausência de adjuvante.

Foram realizados três ciclos de imunizações como mostrados na figura 4. O esquema utilizado no 1º ciclo está descrito na tabela 2 e o utilizado para os 2º e 3º ciclos estão descritos na tabela 3.



Tabela 2. Esquema do primeiro ciclo de imunização.

| Dia     | Grupo | Concentração de veneno/ 500 $\mu$ L | Adjuvante     |
|---------|-------|-------------------------------------|---------------|
| Zero    | 1     | 30 $\mu$ g                          | ACF*          |
|         | 2     | 30 $\mu$ g                          | AIF**         |
|         | 3     | 300 $\mu$ g***                      | AIF           |
| 14      | 1     | 30 $\mu$ g                          | AIF           |
|         | 2     | 30 $\mu$ g                          | AIF           |
|         | 3     | 300 $\mu$ g***                      | AIF           |
| 21      | 1     | 10 $\mu$ g                          | Sem adjuvante |
|         | 2     | 10 $\mu$ g                          | Sem adjuvante |
|         | 3     | 300 $\mu$ g***                      | AIF           |
| 23 e 25 | 1     | 10 $\mu$ g                          | Sem adjuvante |
|         | 2     | 10 $\mu$ g                          | Sem adjuvante |

\*Adjuvante Completo de Freund (Pierce Biotechnology- RockFord, IL, USA)

\*\*Adjuvante Incompleto de Freund (Pierce Biotechnology- RockFord, IL, USA)

\*\*\*Veneno Botrópico Inativado

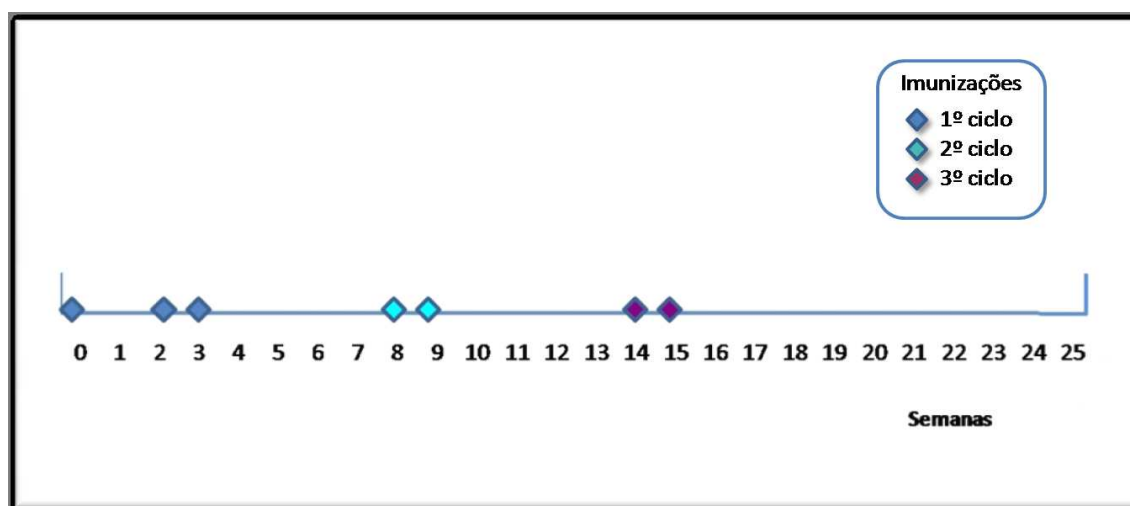


Figura 4. Ciclos de imunizações

Tabela 3. Esquema do segundo e terceiro ciclos de imunizações.

| Dia    | Grupo | Concentração de veneno/ 500 $\mu$ L | Adjuvante |
|--------|-------|-------------------------------------|-----------|
| Zero   | 1 e 2 | 30 $\mu$ g                          | AIF       |
|        | 3     | 300 $\mu$ g*                        | AIF       |
| 7      | 1 e 2 | 10 $\mu$ g                          | -----     |
|        | 3     | 300 $\mu$ g*                        | AIF       |
| 9 e 11 | 1 e 2 | 10 $\mu$ g                          | -----     |

\*Veneno Botrópico Inativado

Os ovos foram coletados diariamente e estocados individualmente a 4°C até seu processamento.

#### 4.4 Processamento dos ovos

Os ovos foram pesados e quebrados. A gema foi separada através de lavagem com água ultrapura até que toda a clara fosse eliminada. Gema e a casca foram pesadas e o peso da clara foi dado por subtração. A membrana da gema foi retirada e descartada. Dois gramas de cada gema foram coletados individualmente e o restante da amostra foi alocado em frascos contendo o pool de gemas coletados em um mesmo dia. Azida sódica a 0,01% foi adicionada e as amostras foram estocadas a 4°C.

#### 4.5 Delipidação da gema

A extração de lipídeos da gema foi realizada através da sua diluição em água ultrapura, seguida de alteração de pH e temperatura. A amostra foi então centrifugada a 800g por 40 minutos. As lipovitelinas precipitadas foram separadas do sobrenadante, denominado extrato aquoso, por filtração (filtro 0,45µm, Gelman Laboratories- Ann Arbor, MI, USA).

O efeito da temperatura, pH e diluição da gema sobre a delipidação foi avaliado segundo a tabela 4. Foram utilizadas alíquotas (3 gramas cada) de uma mesma amostra (pool de gemas coletadas 10 dias após a última inoculação do primeiro ciclo do grupo G1), durante esta avaliação.

Tabela 4. Alterações de temperatura, pH e diluição avaliadas durante a extração de lípidos da gema.

| Item avaliado            | Alterações                                       |
|--------------------------|--|
|                          | Ciclo congelamento (-20°C)/descongelamento (4°C) |
| Temperatura              | 4°C<br>Temperatura ambiente<br>37°C              |
| pH                       | 4,5<br>5,0<br>5,5<br>6,0<br>Sem alteração de pH* |
| Diluição da gema em água | 1:5<br>1:7,5<br>1:10<br>1:15                     |

\*O pH 6,49 foi encontrado na amostra onde o pH não foi alterado.

A escolha do melhor método foi feita avaliando a porcentagem de extrato etéreo, turbidez (medida por absorbância em 610nm de comprimento de onda, segundo Devi et al., 2002) e atividade específica da IgY *in vitro* através de um ELISA. A análise de extrato etéreo foi realizada pelo

Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

#### 4.6 Purificação da IgY

Quatro métodos de purificação de IgY a partir do extrato aquoso foram avaliados segundo produção, pureza e atividade *in*

*vitro* (ELISA). Anticorpos contra o veneno foram purificados através da precipitação com várias concentrações de sulfato de amônio, polietileno glicol e/ou ácido caprílico.

**Método 1-** Precipitação com sulfato de amônio (baseado em Bizanov e Jonauskienė, 2003):

O pH do extrato aquoso foi ajustado para 7,4, que foi então colocado sob agitação a 7°C. Sulfato de amônio (Vetec Química Fina- Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi adicionado lentamente, até as concentrações finais de 15, 20, 25, 30 e 35% (p/v). Após a precipitação, as amostras permaneceram sob agitação por 30 minutos. O material foi então centrifugado a 2000g por 20 minutos. O precipitado foi coletado e ressuspenso em PBS pH 7,4 (1/10 do volume inicial). Uma segunda precipitação foi realizada. As amostras foram dialisadas contra PBS, alíquotadas e estocadas a 4°C.

**Método 2-** Precipitação com polietileno glicol (baseado em Polson et al., 1985):

O pH do extrato aquoso foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio. Polietileno glicol 6000 (Vetec), até as concentrações finais de 8, 10, 12, 14 e 16% (p/v), foi adicionado lentamente e sob agitação, às amostras. Após a precipitação, as amostras permaneceram sob agitação por mais uma hora. O material foi então centrifugado a 10000g por 30 minutos. O precipitado foi coletado e ressuspenso em PBS pH 7,4 (1/10 do volume inicial). As amostras foram alíquotadas e estocadas a 4°C.

**Método 3-** Precipitação com ácido caprílico (baseado em McLaren et al., 1994):

O pH do extrato aquoso foi ajustado para 4,6 com ácido acético. As amostras foram precipitadas com ácido caprílico (Vetec) até as concentrações finais de 5, 6, 7 e 8% (v/v), permanecendo sob agitação por mais duas horas. As amostras foram centrifugadas a 4000g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e estocado a 4°C.

**Método 4-** Precipitação com ácido caprílico e sulfato de amônio (baseado em McKinney e Parkinson, 1987):

O pH do extrato aquoso foi ajustado para 4,6 com ácido acético. A amostra foi colocada sob agitação e precipitada com 4% de ácido caprílico (v/v), permanecendo sob agitação por mais duas horas. O material foi centrifugado a 4000g por 30 minutos e o sobrenadante foi coletado. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,5 com tampão Tris-HCl 1M. Foi realizada a precipitação com sulfato de amônio a 4°C sob agitação, até a concentração final de 1,75M (p/v). O material continuou sob agitação por mais uma hora. A centrifugação foi realizada a 2000g por 20 minutos. O precipitado foi coletado e ressuspenso com PBS pH 7,4 (1/10 do volume inicial). A amostra foi dialisada contra PBS, alíquotada e estocada a 4°C.

#### **4.7 Testes empregados**

Os métodos utilizados na avaliação do melhor método de purificação de IgY foram: Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Imunodifusão Dupla.

##### **4.7.1 ELISA**

A atividade específica das imunoglobulinas antiveneno botrópico da gema de ovo foi mensurada através do teste de ELISA, segundo Velarde (dados não publicados) e descrito a seguir. Veneno botrópico (0,5 µg/ml) em Tampão Tris 50mM pH 8,0 (Sigma Immunochemicals- Saint Louis, MO, USA) foi adsorvido em microplacas de ELISA (Nunc-Immuno Plate Maxisorp Surface- NUNC Brand Products- Rochester, NY, USA), incubado a 4°C por 12 horas. Em todas as etapas do teste, um volume de 100µL foi usado em cada poço da placa. Depois que as placas foram lavadas quatro vezes com uma solução 0,15M de cloreto de sódio, contendo 0,05% de Tween 20, foi adicionada uma solução de leite em pó desnatado a 3% em TBS pH 8,0 como solução bloqueio e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. As placas

foram lavadas novamente como descrito acima e então amostras de gema delipidada nas diluições 1:25, 1:50 e 1:100 em TBS pH 8,0 foram adicionadas em duplicata. Controles positivos e negativos apropriados foram feitos em paralelo. As placas foram incubadas a 37°C por uma hora e novamente lavadas. IgG anti-galinha conjugado com fostase alcalina (Sigma), diluído 1:5000 em TBS, foi adicionado em cada well e as placas foram incubadas a 37°C por mais uma hora. Após nova lavagem, foi adicionada a solução de substrato [1,0 mg de *p*-nitrophenyl phosphato disodium/ml (Sigma) em 0,1M de tampão dietanolamida pH 9,8]. As placas foram então incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância foi lida a 405nm em leitor de ELISA (Multiskan EIA Through-the-plate Reader, Flow Laboratories- McLean, VA, USA). Foi denominada leitura relativa, o valor da leitura a 405nm multiplicada pelo volume e pela diluição da amostra lida.

#### **4.7.2 Imunodifusão dupla em gel de ágar**

A imunodifusão dupla foi realizada segundo descrito por Ouchterlony (1949) na tentativa de se observar uma linha de precipitação, para que só a partir daí fosse iniciada a padronização da imunodifusão radial. Foram utilizados géis de:

- ágar noble (Difco Laboratories- Detroit, MI, USA) em tampão borato nas concentrações 0,5%, 1% e 1,5%, sendo o veneno e o antiveneno adicionados puros ou diluídos em PBS 1X.
- agarose (Difco) em PBS nas concentrações 0,45%, 0,9% e 1,5%, sendo o veneno e o antiveneno adicionados puros ou diluídos em PBS 1X.
- agarose em salina, na concentração 1%, sendo o veneno e o antiveneno adicionados puros ou diluídos em PBS 1X.
- agarose em salina, na concentração 1%, acrescidos de 5% de polietileno glicol 6000 (Vetec), sendo o veneno e o

antiveneno adicionados puros ou diluídos em PBS 1X.

- agarose em salina 1,5M, na concentração 1%, sendo o veneno e o antiveneno adicionados puros ou diluídos em PBS 1X.
- agarose em salina 1,5M, na concentração 0,6%, 0,8% e 1%, acrescidos de 5% de polietileno glicol 6000, sendo o veneno e o antiveneno adicionados puros ou diluídos em PBS 1X.
- agarose em salina 1,5M, na concentração 0,6%, 0,8% e 1%, acrescidos de 5% de polietileno glicol 6000. O veneno acrescido de 1% e 2% de polietileno glicol 1000 (Vetec) foi adicionado a placa diluído em PBS 1X e o antiveneno foi adicionado puro ou diluído em PBS 1X.

Soro antibotrópico eqüino foi utilizado como controle positivo em todos os géis. Veneno e antiveneno botrópico foram diluídos de 1:2 a 1:2048 (diluição na base 2) em PBS 1X. As placas foram incubadas a temperatura ambiente em câmara úmida e as leituras realizadas a 48, 72, 96 e 120 horas após a realização dos testes.

#### **4.7.3 Eletroforese**

Para a SDS-PAGE, a gema após delipidação e a IgY purificada foram analisadas em gel de poliacrilamida na concentração 7,5% sob condições não redutoras, usando um Protean II (Bio-Rad Laboratories- Hercules, CA, USA) como descrito por Laemmli (1970). Todas as amostras (20µL) foram usadas na concentração de 1mg/ml. Os géis foram corados pelo método de coloração convencional por Azul de Comassie (Neuhoff et al., 1988).

#### **4.7.4 Potência do antiveneno**

Para realização do teste de potência do antiveneno botrópico, 500ml de gema (33 gemas em média) foram submetidos aos melhores protocolos de delipidação e purificação avaliados.

A neutralização *in vivo* da toxicidade letal do veneno foi calculada misturando 2 DL-50 do veneno botrópico com diferentes quantidades do extrato de gema antiveneno, segundo Carrol et al., 1991 e Almeida et al., 1998. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C e logo depois inoculada intraperitonealmente em camundongos (0,5 ml por camundongo). No grupo controle foi injetado somente o veneno botrópico (2 DL-50). A eficácia (a dose média efetiva, DE-50) e a potência (a quantidade de veneno neutralizada por 1,0 ml de antiveneno), foram determinadas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (PROGRESS in the..., 1981) e calculadas por análise de probitos (Finney, 1971).

#### **4.8 Dosagem de Proteínas**

Para determinação da concentração de proteínas foi utilizado o método do reagente de Folin, descrito por Lowry (1951), utilizando uma curva padrão desenvolvida com soro albumina bovina (Sigma) nas concentrações 0,1 a 1 mg/ml.

#### **4.9 Análise Estatística**

Os títulos de anticorpos específicos contra o veneno botrópico foram comparados utilizando o teste t de Student (Sampaio, 1998). Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ .

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Estudo comparativo da resposta imune em galinhas frente a diferentes esquemas de imunizações**

A resposta imune de galinhas frente aos três diferentes esquemas de imunização foi avaliada durante 11 semanas, através de um teste de ELISA, sendo os resultados mostrados na figura 5. Nos animais do Grupo 1, nos quais foram administrados veneno botrópico com Adjuvante Completo de Freund, a resposta alcançou um alto

título mais rapidamente que nos animais dos Grupos 2 e 3, com aparecimento de atividade específica da IgY duas semanas após a primeira inoculação. Os Grupos 2 e 3 permanecem com títulos baixos por até 8 semanas, com elevação da produção somente a partir da 9ª semana, em resposta ao início das imunizações do segundo ciclo (oitava e nona semana do esquema de imunização). O pico de produção do Grupo 1 foi em torno de cinco semanas após a primeira inoculação, alcançando um platô após este período. Almeida et al. (1998) relatou em seu experimento, onde também trabalhou com aves imunizadas com veneno botrópico, a estabilidade dos altos títulos de anticorpos a partir de 35 a 45 dias após a primeira inoculação das aves, confirmando esses achados. Os títulos de anticorpos específicos do Grupo 1 permaneceram mais altos que os títulos dos Grupos 2 e 3 por todo o período observado.

Comparando as respostas imunes das aves dos Grupos 2 e 3, embora Adjuvante de Freund Incompleto tenha sido administrado igualmente nos dois grupos, o Grupo 3 que recebeu o veneno após inativação foi superior ao Grupo 2 que recebeu o veneno íntegro e ativo. Esta diferença na resposta imunológica está provavelmente relacionada à quantidade de antígeno inoculado em cada grupo. O Grupo 3 recebeu uma quantidade de veneno dez vezes mais alta que o Grupo 2.

O esquema de imunização envolvendo antígeno inativado (Grupo 3) foi utilizado com o objetivo de evitar possíveis efeitos e lesões causados pelo veneno botrópico nos animais empregados na produção do antiveneno. Contudo, a utilização de veneno botrópico inativado não parece ser uma boa alternativa em esquemas de imunização por estimular uma baixa resposta imunológica e empregar uma grande quantidade de antígeno. Além disso, sua utilização parece não ser justificada, já que em todas as necrópsias realizadas em aves imunizadas com o veneno ativo, não foi observado nenhum tipo de lesão nesses animais.



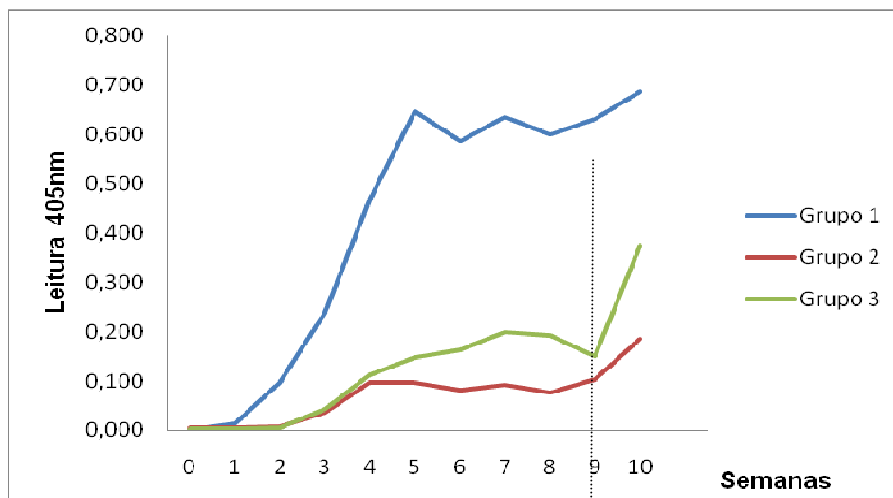


Figura 5. Comparação da resposta imune de galinhas frente a diferentes esquemas de imunização. (Grupo 1: imunização utilizando adjuvante completo de Freund. Grupo 2: imunização utilizando adjuvante incompleto de Freund. Grupo 3: imunização com veneno botrópico inativado e adjuvante incompleto de Freund. A linha tracejada indica a semana onde iniciou-se o segundo ciclo de imunizações.)

O esquema de imunização adotado no Grupo 1 utilizando Adjuvante Completo de Freund não só foi capaz de estimular uma resposta imune mais rápida e mais alta nos animais avaliados, como também não induziu lesões nos locais de imunizações. Isto porque o Adjuvante Completo de Freund é fisicamente bem tolerado em galinhas, as quais não apresentam reações inflamatórias características do seu uso em mamíferos (Gassmann et al., 1990). O esquema utilizando este adjuvante foi, então, considerado o melhor esquema de imunização avaliado.

## 5.2 Estudo comparativo de diferentes métodos de delipidação da gema

No estudo da eficiência da extração de lipídeos da gema de ovos foi analisada a influência de diferentes temperaturas, pH e diluições sobre o extrato aquoso final.

Avaliando o efeito da temperatura (Tab. 5), pode-se observar que a redução da porcentagem de lipídeos ocorreu satisfatoriamente nas quatro temperaturas analisadas (segundo a porcentagem de

extrato etéreo calculada após o processo de delipidação), reduzindo de 26% na gema antes do processo de delipidação para 0,75% em média nas amostras delipidadas.

A delipidação também foi avaliada segundo o aspecto e turbidez das amostras. Foi considerado que amostras leitosas e turvas após o processo de delipidação ainda fossem ricas em lipídeos (Goldring e Coetzer, 2003). A turbidez foi avaliada pela leitura espectrofotométrica a 610nm (Devi et al., 2002). De acordo com a porcentagem de extrato etéreo, o aspecto e a turbidez, evidenciou-se que a amostra submetida ao ciclo de congelamento e descongelamento foi a amostra que apresentou menor concentração de lipídeos e após o processo de delipidação mostrou-se transparente (Fig. 6). Mesmo havendo uma perda na atividade *in vitro*, demonstrada através do teste de ELISA, o ciclo de congelamento e descongelamento foi escolhido como parte do processo de delipidação, já que na prática, houve uma maior coagulação dos grânulos de lipoproteínas, facilitando enormemente o processo de separação durante a centrifugação e filtração da amostra.





Tabela 5- Influência de diferentes temperaturas no processo de extração de lípidos da gema de ovos de galinhas imunizadas com veneno botrópico

| Temperatura*                  | % Extrato etéreo | Turbidez | Velocidade | ELISA           |
|-------------------------------|------------------|----------|------------|-----------------|
| Congelamento/ descongelamento | 0,61             | 0.000    | Rápida     | 0.199 <b>b</b>  |
| 4°C                           | 0,67             | 0.011    | Rápida     | 0.232 <b>ab</b> |
| Temperatura ambiente          | 0,88             | 0.036    | Rápida     | 0.251 <b>ab</b> |
| 37°C                          | 0,90             | 0.041    | Rápida     | 0.271 <b>a</b>  |

\*Utilizando pH 5,0 e diluição 1:10

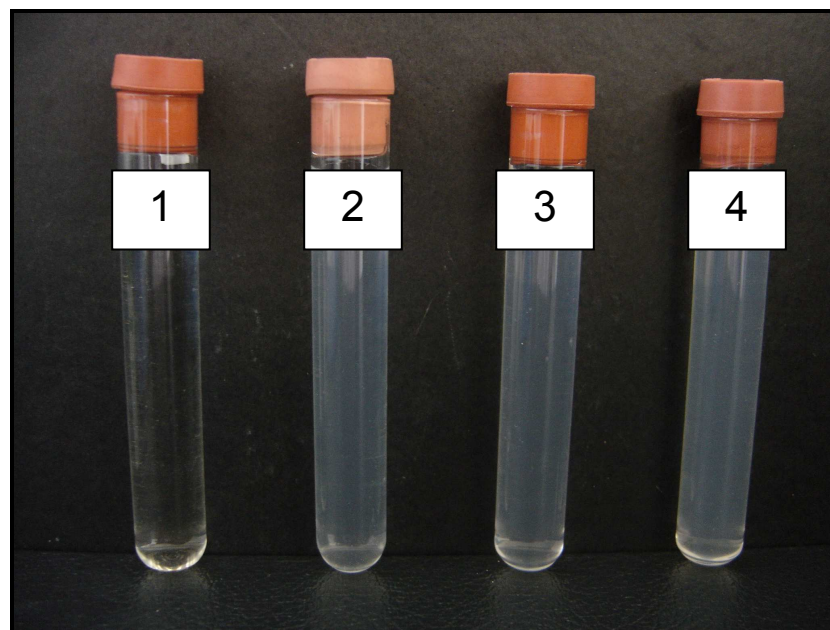


Figura 6. Aspecto das amostras submetidas a diferentes temperaturas durante o processo de delipidação. Amostras submetidas (1) ao ciclo de congelamento/descongelamento; (2) a 4°C; (3) à temperatura ambiente; (4) a 37°C.

Avaliando-se o efeito do pH sobre o processo de delipidação (Tab. 6) verificou-se que em pH < 5,0 e  $\geq 6,0$ , não houve uma extração satisfatória dos lípidos da amostra, conforme demonstrado pela porcentagem de extrato etéreo encontrado após o processo delipidativo. Como nestas amostras ainda havia uma grande quantidade de lipídios, o volume final após a delipidação ainda continuou alto. Nestas amostras, a separação dos grânulos de lipoproteínas não ocorreu, dificultando a

filtração e aumentando significativamente o tempo de duração deste processo.

De acordo com a porcentagem de extrato etéreo, aspecto (Fig. 7) e turbidez, as amostras submetidas aos pH 5,0 e 5,5 foram as que apresentaram melhores resultados após o processo delipidativo, concordando com as observações de Akita e Nakai (1992) que afirmaram que haveria uma máxima recuperação da IgY entre os pH 5,0 e 5,2. Então, o pH 5,0 foi escolhido como padrão durante todo o experimento.



Tabela 6. Influência de diferentes pH no processo de extração de lípidos da gema de ovos de galinhas imunizadas com veneno botrópico.

| pH*               | % Extrato etéreo | Aspecto (ver Fig.7) | Turbidez | Velocidade de filtração** | ELISA              |
|-------------------|------------------|---------------------|----------|---------------------------|--------------------|
| 4,5               | 4,56             | Muito turvo         | 2.024    | Muito lenta               | 0.297 <sup>a</sup> |
| 5,0               | 0,67             | Límpido             | 0.012    | Rápida                    | 0.247 <sup>a</sup> |
| 5,5               | 0,78             | Límpido             | 0.015    | Rápida                    | 0.270 <sup>a</sup> |
| 6,0               | 1,45             | Límpido amarelado   | 0.050    | Lenta                     | 0.249 <sup>a</sup> |
| Resultante (6,49) | 1,67             | Turvo amarelado     | 0.059    | Lenta                     | 0.262 <sup>a</sup> |

\*Utilizando temperatura 4°C e diluição 1:10

\*\* Foi considerada rápida, a filtração de 6,6ml/minuto, filtração lenta: 4,2ml/minuto e filtração muito lenta: 1,9ml/minuto.

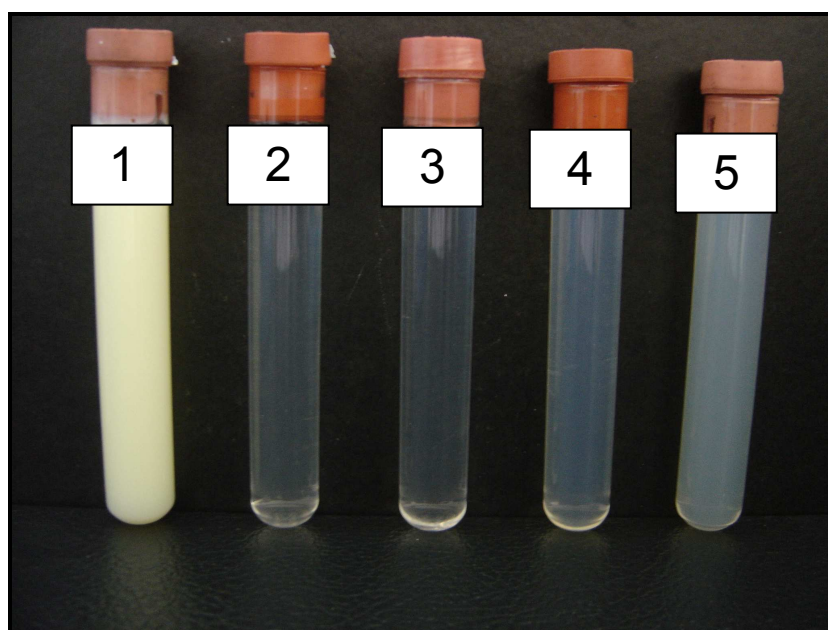


Figura 7. Aspecto das amostras submetidas a diferentes pH durante a delipidação: (1) pH 4,5; (2) pH 5,0; (3) pH 5,5 e (4) pH 6,0. A amostra (5) não foi submetida à alteração do pH, permanecendo com pH 6,49.

Já na avaliação do efeito da diluição sobre o processo de extração dos lipídeos, observou-se que quanto maior a diluição maior atividade *in vitro* demonstrada através do ELISA (a leitura encontrada foi multiplicada pela diluição), mantendo valores semelhantes a partir da diluição 1:10 (Tab. 7). Com a baixa diluição da gema, uma porcentagem mais alta de lipídeos foi encontrada no extrato aquoso, interferindo

negativamente na atividade específica da IgY. Segundo a porcentagem de extrato etéreo, aspecto e turbidez, as amostras diluídas 1:10 e 1:15 foram as que apresentaram menor quantidade de lipídeos residuais após o processo delipidativo. Para facilitar os cálculos durante o processo, a diluição 1:10 foi escolhida como padrão durante todo o experimento.



O processo de extração de lipídeos da gema ficou assim padronizado: após a completa excisão da clara, a gema foi diluída 1:10 em água ultrapura e logo em seguida o pH da amostra foi alterado para 5,0. A amostra foi então congelada por 12 horas e o descongelamento foi realizado a 4°C. Após o descongelamento, a amostra foi centrifugada a 800g por 40 minutos a 4°C e filtrada em filtro 0,45µm para completa separação dos grânulos. A amostra delipidada apresentou-se transparente, sem

nenhuma turvação, como demonstrado na figura 7, amostra 2.

Após a extração de lipídeos verificou-se uma recuperação de 80 a 90% do volume inicial da gema diluída 1:10 em água, quando submetida a pH 5,0 e ao ciclo de congelamento (perda em volume em torno de 15% durante a delipidação). Akita e Nakai (1993) encontraram valores semelhantes, afirmando que 10% do volume era perdido sob a forma de um sedimento compacto.

Tabela 7. Influência de diferentes diluições no processo de extração de lípidos da gema de ovos de galinhas imunizadas com veneno botrópico

| Diluição* | % Extrato Etéreo | Aspecto         | Turbidez | Velocidade de Filtração** | ELISA  |
|-----------|------------------|-----------------|----------|---------------------------|--------|
| 1:5       | 2,09             | Turvo amarelado | 0.134    | Lenta                     | 0.131c |
| 1:7,5     | 1,04             | Turvo           | 0.083    | Rápida                    | 0.203b |
| 1:10      | 0,67             | Límpido         | 0.011    | Rápida                    | 0.247a |
| 1:15      | 0,44             | Límpido         | 0.000    | Rápida                    | 0.253a |

\*Utilizando pH 5,0 e temperatura 4°C

\*\* Foi considerada rápida, a filtração de 6,6ml/minuto, filtração lenta: 4,2ml/minuto e filtração muito lenta: 1,9ml/minuto.

Um ELISA foi realizado para estimar a perda de imunoglobulina durante a delipidação (Tab. 8). A gema antes de ser processada apresentou uma leitura relativa de 13225 (leitura a 405nm X volume X diluição). O material após delipidação apresentou uma leitura relativa de 10049 e uma concentração protéica de 1,46mg/ml. Já o precipitado descartado apresentou uma leitura relativa de 692, mas com uma alta concentração de proteína: 6,864mg/ml. De acordo com o teste de ELISA, em torno de

7% de IgY antibotrópica foi perdida durante a delipidação da gema. Akita e Nakai (1992) dosaram esta perda através de imunodifusão radial, encontrando valores semelhantes (4 a 8%). Com isso, demonstrou-se que a delipidação foi responsável por eliminar em torno de 40% das proteínas da gema, principalmente aquelas ligadas a lipídios, sem, contudo eliminar uma quantidade significativa das imunoglobulinas de interesse.

Tabela 8. Estimativa da perda de IgY específico antibotrópico durante a delipidação.

|                        | Volume | Atividade Específica (Leitura 405nm) | Leitura relativa (Leitura a 405nm X volume X diluição) | Proteína total |
|------------------------|--------|--------------------------------------|--|----------------|
| Gema                   | 500ml  | 0.529                                | 13225  | 1040,0mg       |
| Material delipidado    | 435ml  | 0.462                                | 10049  | 635,1mg        |
| Precipitado descartado | 65ml   | 0.213                                | 692  | 448,5mg        |



### 5.3 Padronização de um teste de Imunodifusão Radial para quantificação de IgY específica antibotrópica:

Embora a IgY possua dois sítios de ligação ao antígeno, ela raramente é capaz de precipitar e aglutinar antígenos multivalentes. A inabilidade da IgY em produzir complexos imunes precipitantes visíveis em imunodifusão em gel foi documentada por Ntakarutimana et al. (1992). Segundo Warr et al. (1995), elas só apresentam alguma propriedade precipitante sob condições de alta concentração de sal (dez vezes a concentração fisiológica ou 1,5M). O uso de 5% polietileno glicol 6000 incorporado no tampão do gel, também poderia favorecer a precipitação desta molécula, segundo Ntakarutimana et al. (1992) e Jensenius et al. (1981).

Entretanto, em nenhum dos géis testados neste estudo, sendo eles puros, com altas concentrações de sal ou adicionados de polietileno glicol, foram observadas linhas de precipitação envolvendo o veneno botrópico e a IgY antibotrópica, embora a ligação destes fosse comprovada em teste de ELISA.

A possível causa desta não precipitação estaria na conformação da molécula, onde as duas frações Fab estariam mais alinhadas, não permitindo a ligação de dois epítomos em dois grandes antígenos. Isto porque a IgY não possui uma região *hinge* desenvolvida, não apresentando flexibilidade o bastante para que seus dois sítios antigênicos fossem ocupados com o veneno botrópico ao mesmo tempo, para formação da linha de precipitação (Fig. 8).

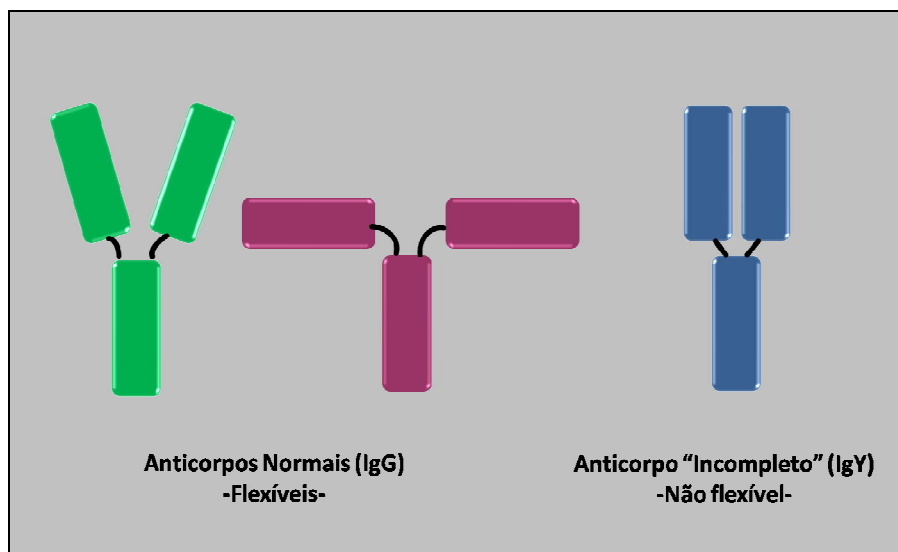


Figura 8. Conformação rígida da IgY





Em trabalhos onde a Imunodifusão Radial envolve moléculas de IgY formando linha de precipitação (Akita e Nakai, 1992; Verdoliva et al., 2000; Bizanov e Vyshniauskis, 2000; Bizanov e Jonauskiené, 2003), são utilizadas imunoglobulinas anti-IgY de galinha. Isto poderia fazer com que a IgY passasse a se comportar como antígeno e não mais como um anticorpo, podendo justificar a ocorrência da precipitação. Além disso, os antígenos utilizados eram ou antígenos purificados ou antígenos pouco complexos, diferentemente do veneno

botrópico, que é composto de diversas frações com moléculas de diferentes tamanhos, dificultando a formação de linha de precipitação no teste de imunodifusão.

#### 5.4 Avaliação da curva de produção de IgY antibotrópico

Já na segunda semana após a imunização inicial das galinhas com veneno botrópico, anticorpos específicos estavam presentes na gema de ovo dos animais do Grupo 1 (Fig. 9).

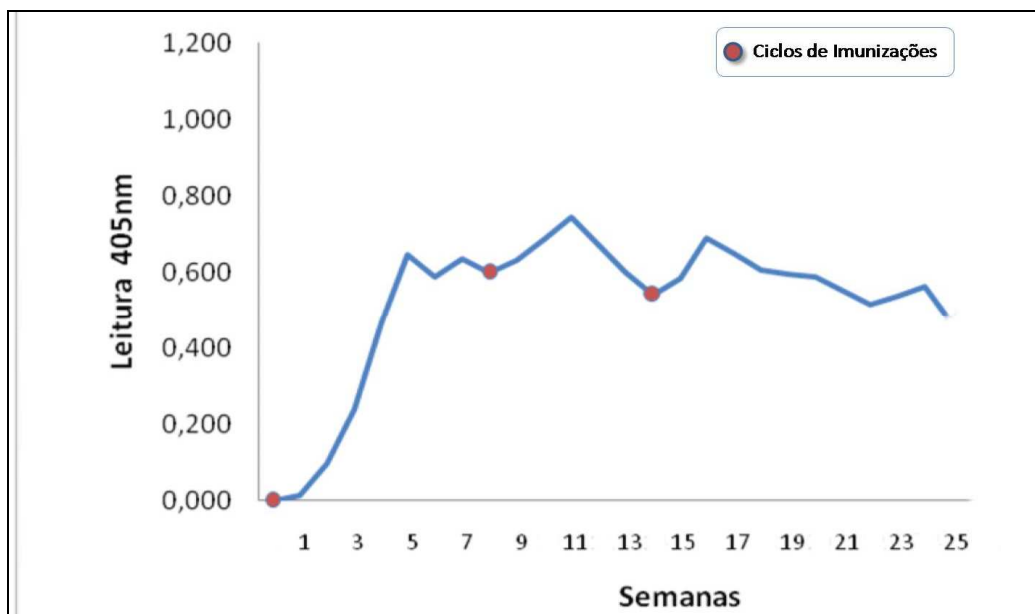


Figura 9- Curva de produção de IgY antibotrópico do Grupo 1, envolvendo as 25 semanas seguintes à primeira imunização com antígeno, medida pelo teste de ELISA.

Os títulos aumentaram durante as cinco semanas seguintes à imunização e alcançaram um platô em torno de 40 dias, permanecendo estáveis e altos por mais de 25 semanas (período de observação do Grupo). Isto parece confirmar as observações anteriores de Almeida et al. (1998), Li et al. (1998) e Bizanov e Jonauskiené (2003), onde também houve um aumento nos títulos de anticorpos durante cerca de cinco semanas,

permanecendo estáveis por muitos meses. Os altos níveis de anticorpos foram mantidos pelas reimunizações que foram realizadas em intervalos de seis semanas.

Após cada reimunização, houve um pico de produção de IgY, que ocorreu após um período médio de duas semanas. Na ausência de reimunização, os níveis de IgY continuaram elevados por mais de 11

semanas (período de observação do Grupo).

### 5.5 Estudo comparativo de diferentes métodos de purificação de IgY:

Na avaliação dos métodos utilizados durante a purificação da IgY, foram comparadas (1) a quantidade de IgY produzida, expressa em termos de proteína total; (2) a pureza da IgY após o método de purificação, analisada através de

eletroforese em gel de poliacrilamida e (3) a quantidade de IgY perdida durante o método utilizado, pela análise da atividade específica antibiótica (ELISA) das amostras de sobrenadantes e precipitados originados durante o processo.

A tabela 9 mostra que, com o uso de ácido caprílico, maior quantidade de proteínas totais foi encontrada ao final do processo em comparação com os outros métodos empregados (Tab. 10 e 11).

Tabela 9. Análises das amostras purificadas por precipitação com ácido caprílico.

| Concentração de Ácido Caprílico | Produção total (mg de prot. total no sobrenadante) | Perda de IgY no Precipitado (3ml)*   |                                   |
|---------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------------------|
|                                 |  | Atividade específica (leitura 405nm) | Porcentagem de perda de atividade |
| 5%                              | 17,31  | 0.087 <sup>a</sup>                   | 1,88%                             |
| 6%                              | 16,50  | 0.090 <sup>a</sup>                   | 1,95%                             |
| 7%                              | 15,93  | 0.101 <sup>a</sup>                   | 2,19%                             |
| 8%                              | 14,01  | 0.114 <sup>a</sup>                   | 2,47%                             |

\*Extrato delipidado inicial: Volume: 30ml; proteínas totais: 1,46mg/ml; leitura 405nm: 0.462.

Com o aumento da concentração de ácido caprílico, houve um aumento da precipitação de proteínas, o que justifica a crescente redução na concentração dessas no sobrenadante final. Embora a quantidade de proteínas encontrada ao final da precipitação fosse alta, quando estas amostras foram analisadas através de eletroforese (Fig. 10), observou-se que a maior parte dessas proteínas não eram imunoglobulinas, sendo compostas principalmente de proteínas de baixo peso molecular, demonstrando que o método do ácido caprílico não originava amostras puras de IgY. Além disso, de acordo com o resultado do ELISA, houve perda de IgY antibiótica em torno de 2% durante o processo, mas sem apresentar diferença

estatisticamente significativa em qualquer das concentrações avaliadas. Sendo assim, concluiu-se que sob as condições empregadas, a precipitação com ácido caprílico não foi um bom método de purificação de IgY.

A utilização de uma concentração menor deste reagente poderia evitar a precipitação das imunoglobulinas, aumentando a concentração final de IgY obtida, mas sem solucionar o problema relacionado a pureza da amostra. Se combinada a outro método de purificação, como a precipitação com sulfato de amônio, a precipitação com ácido caprílico poderia, além de reduzir a perda de IgY durante o processo, elevar a pureza da amostra final.

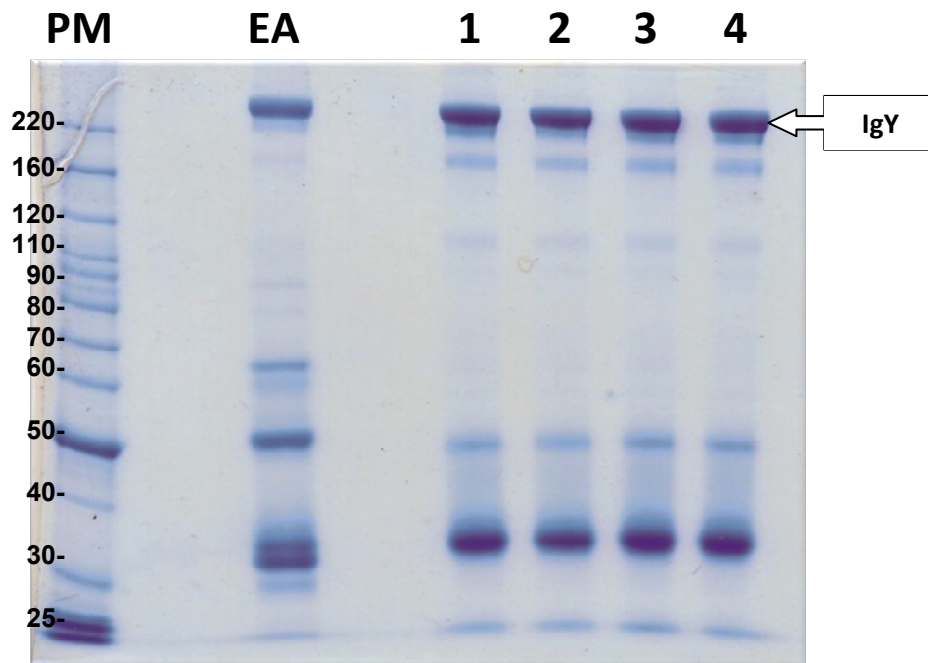


Figura 10. Gel de poliacrilamida mostrando a eletroforese do sobrenadante resultante da precipitação com ácido caprílico. Precipitação utilizando ácido caprílico (1) 5%; (2) 6%; (3) 7% e (4) 8%. A amostra após extração de lipídeos está representada pelo extrato aquoso (EA). Foram utilizados padrões de peso molecular (PM) de 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50 (banda mais espessa), 40, 30, 25 e 20KDa.

Avaliando-se o método de purificação por precipitação com polietilenoglicol (Tab. 10), notou-se que somente houve perda de IgY durante o processo quando se utilizou polietilenoglicol a 8%. Com o aumento da concentração de polietilenoglicol para 10% ou mais, houve completa precipitação da IgY. Entretanto, segundo a figura 11, com o aumento da precipitação da IgY, também elevou-se a precipitação de outras proteínas, tendo como produto final um precipitado muito impuro, o que era indesejado. Assim como no método do ácido caprílico, a presença de proteínas

contaminantes foi responsável pela elevada concentração de proteínas totais ao final do processo. A utilização de polietilenoglicol em concentrações menores que 8% poderia ser uma alternativa viável para que houvesse uma grande precipitação de IgY com menor precipitação de proteínas contaminantes, mas não foi considerada já que o método de precipitação com sulfato de amônio foi mais promissor, resultando em amostras mais puras de IgY (Fig. 12) além de não necessitar da remoção com etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Polson et al., 1985) como quando se trabalha com polietilenoglicol.



Tabela 10. Análises das amostras purificadas por precipitação com polietilenoglicol.

| Concentração de Polietilenoglicol 6000 | Produção total (mg de prot. total no precipitado) | Grau de Impureza* (ver eletroforese- Fig.11) | Perda de IgY no Sobrenadante (30ml)**   |                                   |
|--|---|--|---|-----------------------------------|
|  |   |  | Atividade específica (leitura 405nm)*** | Porcentagem de perda de atividade |
| 8%                                     | 11,03   | ++   | 0.020 <sup>a</sup>                      | 4,3%                              |
| 10%                                    | 13,98   | +++  | 0.001 <sup>b</sup>                      | Insignificante                    |
| 12%                                    | 14,25   | +++  | 0.003 <sup>b</sup>                      | Insignificante                    |
| 14%                                    | 14,69   | ++++   | 0.005 <sup>b</sup>                      | Insignificante                    |
| 16%                                    | 15,03   | ++++   | 0.002 <sup>b</sup>                      | Insignificante                    |

\*Quanto maior o número de (+), maior o grau de impureza (definido pelo número e pela intensidade das bandas de proteínas contaminantes). Amostras puras são indicadas por (-).

\*\*Extrato delipidado inicial: Volume: 30ml; proteínas totais: 1,46mg/ml; leitura 405nm: 0.462.

\*\*\*IgY de animais não imunizados com veneno botrópico apresentaram valores na leitura a 405nm até 0.011, portanto valores inferiores a este foram considerados insignificantes.

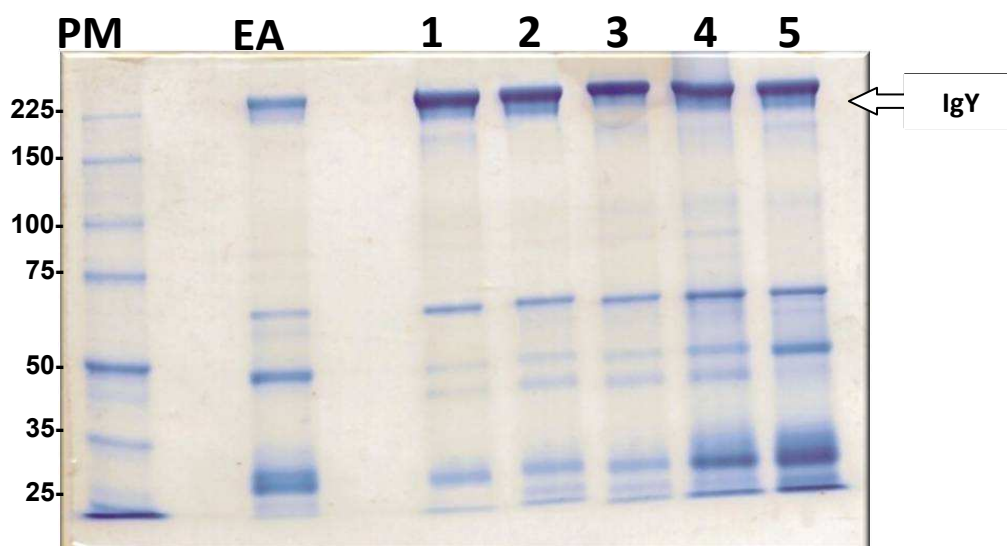


Figura 11. Gel de poliacrilamida mostrando a eletroforese das amostras precipitadas com polietilenoglicol. Precipitação utilizando polietilenoglicol 6000 (1) 8%; (2) 10%; (3) 12%; (4) 14% e (5) 16%. A amostra após extração de lipídios está representada pelo extrato aquoso (EA). Foram utilizados padrões de peso molecular (PM) de 225, 150, 100, 75, 50 (banda mais espessa), 35 e 25KDa.

Quando se utilizou sulfato de amônio na precipitação da IgY, observou-se que em baixas concentrações como 15%, houve uma grande quantidade de IgY não precipitada (Tab. 11). Na concentração de 20%, o produto final estava relativamente puro (Fig. 12), embora ainda houvesse 14% de perda de IgY devido a não precipitação. Com o aumento da concentração para 25%,

aumentou-se a precipitação de IgY, mas também houve precipitação de proteínas contaminantes. A concentração onde haveria maior precipitação de IgY com menor contaminação de outras proteínas estaria entre 20 e 25% de sulfato de amônio, com base na avaliação das bandas protéicas da canaletas 2 e 3 da figura 12.



Tabela 11. Análises das amostras purificadas através da precipitação com sulfato de amônio.

| Concentração de Sulfato de Amônio | Produção total (mg de prot. totais do precipitado) | Grau de Impureza* (ver Fig.12) | Perda de IgY no Sobrenadante (30ml)**   |                                   |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|---|-----------------------------------|
|                                   |  |                                | Atividade específica (leitura 405nm)*** | Porcentagem de perda de atividade |
| 15%                               | 4,2  | -                              | 0.366 <sup>a</sup>                      | 79%                               |
| 20%                               | 9,5  | +                              | 0.066 <sup>b</sup>                      | 14%                               |
| 25%                               | 10,97  | ++                             | 0.017 <sup>c</sup>                      | 3,7%                              |
| 30%                               | 12,18  | +++                            | 0.008 <sup>d</sup>                      | Insignificante                    |
| 35%                               | 13,12  | ++++                           | 0.003 <sup>d</sup>                      | Insignificante                    |

\*Quanto maior o número de (+), maior o grau de impureza (definido pelo número e pela intensidade das bandas de proteínas contaminantes). Amostras puras são indicadas por (-).

\*\*Extrato delipidado inicial: Volume: 30ml; proteínas totais: 1,46mg/ml; leitura 405nm: 0.462.

\*\*\*IgY de animais não imunizados com veneno botrópico apresentaram valores na leitura a 405nm até 0.011, portanto valores inferiores a este foram considerados insignificantes.

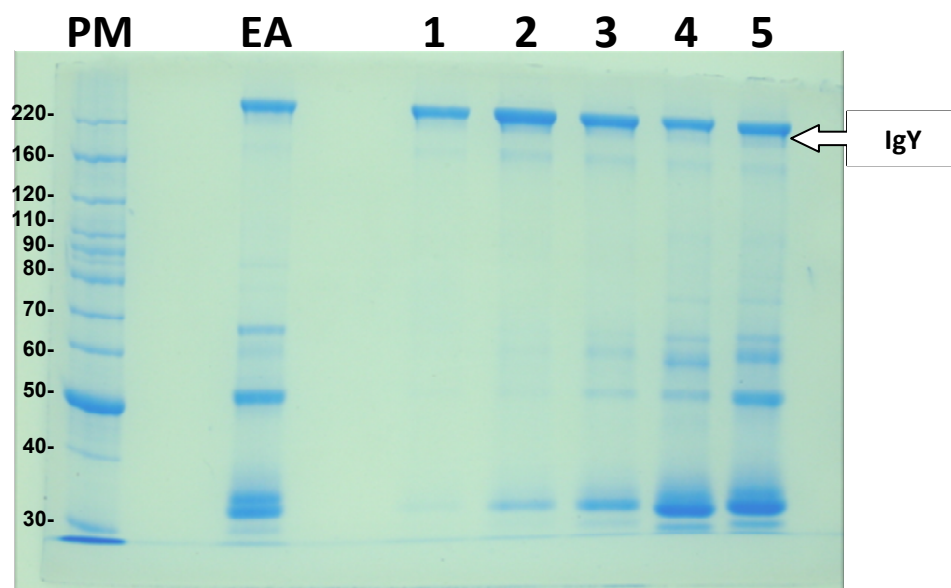


Figura 12. Gel de poliacrilamida mostrando a eletroforese das amostras precipitadas com sulfato de amônio. Precipitação utilizando sulfato de amônio (1) 15%; (2) 20%; (3) 25%; (4) 30% e (5) 35%. A amostra após extração de lipídios está representada pelo extrato aquoso (EA). Foram utilizados padrões de peso moleculares (PM) de 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50 (banda mais espessa), 40, 30KDa.





Com o objetivo de se produzir uma amostra final livre de proteínas contaminantes, mas sem grandes perdas de IgY durante o processo, o método combinando ácido caprílico e sulfato de amônio também foi avaliado. Na primeira etapa do processo, ácido caprílico foi utilizado em uma concentração de 4%, enquanto que em uma segunda etapa, utilizou-se 1,75M de sulfato de amônio (cerca de 23%) para purificar a amostra resultante da precipitação com ácido caprílico. Este método gerou amostras puras de IgY. Entretanto, a quantidade de proteína recuperada ao final do processo (4,27mg) foi muito inferior a quantidade recuperada quando se usou somente o sulfato de amônio como agente precipitante.

Além disso, quando se somava a perda de IgY específica durante a precipitação com o ácido caprílico e a perda durante a precipitação com o sulfato de amônio (Tab. 12), cerca de 14% da imunoglobulina antibotrópica era perdida durante o processo, sendo o valor semelhante ao da precipitação utilizando somente o sulfato de amônio a 20%. Portanto, este método não foi escolhido para purificação da molécula de IgY, já que com a adição de mais um reagente precipitante, haveria também um aumento no número de etapas do processo, com várias etapas de centrifugação e alterações de pH, tornando-o mais caro e laborioso.

Tabela 12- Análise das amostras precipitadas com ácido caprílico e sulfato de amônio

|                            | Concentração | Perda de IgY*                          |                                   |
|----------------------------|--------------|--|-----------------------------------|
|                            |              | Atividade específica (leitura 405nm)** | Porcentagem de perda de atividade |
| Ácido Caprílico            | 4%           | 0.074                                  | 1,62%                             |
| Sulfato de amônio          | 23%          | 0.057                                  | 12,34%                            |
| Porcentagem de perda total |              |  | 13,96%                            |

\*Extrato delipidado inicial: Volume: 30ml; proteínas totais: 1,46mg/ml; leitura 405nm: 0.462.

\*\*IgY de animais não imunizados com veneno botrópico apresentaram valores na leitura a 405nm até 0.011, portanto valores inferiores a este foram considerados insignificantes.

O método escolhido como o melhor para a purificação de IgY foi a precipitação com sulfato de amônio a 20%, por ser de fácil execução e originar amostras relativamente puras de imunoglobulinas. Precipitação utilizando 15% de sulfato de amônio produz amostras mais puras de IgY, mas não foi escolhido porque houve grande perda de imunoglobulinas que não foram precipitadas. Svendsen et al. (1995), comparando os métodos de purificação de IgY por precipitação com sulfato de amônio, polietilenoglicol e ácido caprílico, também afirmou ser a precipitação com sulfato de amônio o método mais eficiente dos três

estudados, sendo considerado o de mais alta produção e pureza.

## 5.6 Rendimento da IgY

Do ponto de vista da produtividade, 2,69mg de IgY/ml de gema foi encontrado quando utilizou-se a purificação através da precipitação por sulfato de amônio a 20%. Bizanov e Jonauskienė (2003) encontraram valores semelhantes (1 a 3,8mg/ml de gema) sob as mesmas condições. Isto significa que uma só gema foi capaz de produzir 40,35mg de IgY total, podendo chegar a 11,3g de IgY total/ave/ano.

Como somente 3,2% da IgY total é considerada específica ao antígeno inoculado (Li et al., 1998; Akita e Li-Chan, 1998), então 1,29mg de IgY específico antibotrópico poderia ser produzido em uma única gema, tendo 361,2mg de IgY específico/ave/ano. Este número não foi considerado alto, já que outros autores encontraram valores superiores quando inocularam outros antígenos em galinhas. Ntakarutimana et al. (1992), por exemplo, recuperou 1,12g de IgY específico quando inoculou transferrina humana em aves. Já Akita e Li-Chan (1998), encontraram um número ainda maior, 2,1g de IgY específico/ave/ano quando produziram IgY anti-IgG subclasses. Portanto, por se tratar de um antígeno não purificado, contendo várias frações com diversos pesos moleculares, além de conter amostras de cinco diferentes espécies de serpentes, veneno botrópico poderia causar uma menor estimulação do sistema imune de galinhas, sendo produzida uma menor quantidade de IgY específica contra este antígeno.

### **5.7 Teste de potência do antiveneno produzido através de ensaio de DE-50.**

O teste de neutralização *in vivo* foi utilizado para demonstrar a habilidade da IgY obtida a partir de galinhas imunizadas com veneno botrópico de neutralizar a toxicidade letal do veneno. A eficácia, expressa em termos de DE-50 foi de 365 $\mu$ L/2DL-50 (quantidade de antiveneno necessária para neutralizar o número de DL-50 utilizada no ensaio de neutralização do efeito letal do veneno) e a potência foi de 0,154mg/ml (quantidade de veneno neutralizada por 1ml de antiveneno).

A potência do antiveneno botrópico avaliado foi 2,3 vezes superior à potência encontrada por Almeida et al. (1998), que também trabalhou com galinhas imunizadas com veneno botrópico. Além disso, 2 DL-50 foram utilizados no teste de potência, contrastando com o trabalho do mesmo autor, que utilizou 1,5 DL-50.

Entretanto, se comparada à potência do soro eqüino antibotrópico comercial, a

potência do antiveneno produzido em ovos de galinha foi baixa. Enquanto 1ml de antiveneno produzido em ovo neutraliza somente 0,15mg de veneno botrópico, 1ml de soro eqüino neutraliza 5,00mg do mesmo veneno.

Reduzir o volume do antiveneno botrópico através de ultrafiltração, com o objetivo de concentrar as imunoglobulinas, poderia aumentar sua potência.

## **6. CONCLUSÕES**

Com este experimento, podemos concluir que:

- A melhor resposta imune de galinhas frente a diferentes esquemas de imunização para produção de IgY específico foi obtida quando se utilizou adjuvante completo de Freund.
- A diluição da gema em água ultrapura, seguida de alteração de pH para 5,0 e de ciclo de congelamento (-20°C) e descongelamento (4°C) foi o melhor método de extração de lípidos da gema.
- A IgY não foi capaz de produzir complexos imunes precipitantes visíveis em imunodifusão em gel quando veneno botrópico foi empregado como antígeno.
- A IgY extraída da gema de ovos de galinhas imunizadas com veneno botrópico continha anticorpos detectáveis por ELISA.
- O primeiro ciclo de imunizações resultou em aumento dos títulos de IgY antibotrópica até a 5ª semana, a partir da qual os níveis se mantiveram estáveis.
- Níveis de IgY permaneceram altos por vários meses após três ciclos de imunizações com veneno botrópico em galinhas.
- A purificação através da precipitação com 20% de sulfato de amônio produziu amostras relativamente puras de IgY, diferentemente da precipitação utilizando ácido caprílico e polietilenoglicol, podendo

produzir 11,3g de IgY total por uma única galinha em um ano.

- A IgY obtida de galinhas imunizadas com veneno botrópico foi capaz de neutralizar a toxicidade do veneno em um teste de neutralização *in vivo*.
- A potência do antiveneno botrópico testado foi superior a potência encontrada em outros antivenenos produzidos em ovos de galinha descritos na literatura, porém sendo baixa quando comparada a potência do soro antibotrópico equino comercial.

## 7. PERSPECTIVAS

A produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha foi promissora, fazendo com que a produção de outros antivenenos também possa ser avaliada pelo mesmo método. A utilização do esquema de imunização avaliado pode servir como modelo para a produção de IgY contra outros tipos de antígenos (produção de anticorpos anti-IgY, por exemplo). O método de extração de lipídeos da gema por diluição em água, por exemplo, pode ser utilizado em qualquer estudo e aplicação desta molécula. O domínio da Tecnologia IgY poderá abrir campos para outras aplicações em áreas como o diagnóstico de doenças em medicina humana e veterinária ou na produção de outros tipos de soros profiláticos, como por exemplo, contra intoxicações alimentares ou certos tipos de doenças tropicais de interesse em saúde humana ou animal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, E. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Isolation of bovine immunoglobulin G subclasses from milk, colostrums and whey using immobilized egg yolk antibodies. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.1, p.54-63, 1998.

AKITA, E.M.; LI-CHAN, E.C.Y.;NAKAI,S. Neutralization of enterogenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. *Food and Agricultural Immunology*, v.10, n.1, p.161-172, 1998.

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *Journal of Food Science*, v.57, n.1, p. 629-633,1992.

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods*, v.160, n.1, p.207-214, 1993.

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Production of Fab fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *Journal of Immunological Methods*, v.162, n.1, p.155-164, 1993.

ALMEIDA, C. M. C.; KANASHIRO, M. M.; RANGEL FILHO, F. B. et al. Development of snake antivenom antibodies in chicken and their purification from yolk. *Veterinary Research*, v. 21, n.1, p.579-84, 1998.

AMBROSIUS, H.; HADGE, D. Chicken immunoglobulins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.17, n.1, p.57-78, 1987.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Envenomation caused by poisonous animals: Poisonous snakes. *Medicina*, v.36, n.1, p.480-489, 2003.

BIZANOV, G.; VYSHNIAUSKIS, G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Veterinary Research Communications*, v.24, n.1, p.103-113, 2000.

BIZANOV, G.; JONASKIENE, I. Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG. *Bull Vet Inst Pulawy*, v.47, n.1, p.403-410, 2003.

BIZANOV, G.; JONASKIENE, I.; HAU, J. A novel method, based on lithium sulfate precipitation for purification of chicken egg yolk immunoglobulin Y, applied to immunospecific antibodies against Sendai virus. *Journal of Laboratory Animal Science*, v.31, n.3, p.121-130, 2004.

- BIZANOV, G.; NORMANTIENE, T.; JONAUSKIENE, I. Development of antibodies to Sendai virus in chickens and their isolation from yolk. *Biologija*, v.2, n.1, p.68-71, 2006.
- CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon*, v.40, n.1, p.501-9, 2002.
- CAMPBELL, R. D.; DODDS, A. W.; PORT, R. R. The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. *Biochemistry Journal*, v.189, n.1, p.67-8, 1980.
- CARLANDER, D. *Avian IgY Antibody: in vitro and in vivo*. 2002. 53f. Tese (Doutorado em Química Clínica) – Uppsala University, Sweden.
- CARLANDER, D.; STALBERG, J.; LARSSON, A. Chicken antibodies, a clinical chemistry perspective. *Upsala Journal of Medical Science*, v.104, n.1, p.179-190, 1999.
- CARLANDER, D.; WILHELMSON, M.; LARSSON, A. Immunoglobulin Y levels in egg yolk from three chicken genotypes. *Acta Universitatis Upsaliensis*, v.1119, n.1, p.1-15, 2002.
- CARROL, S.B.; THALLEY, B.S.; THEAKSTON, R.D.G. et al. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. *Toxicon*, v.30, n.9; p.1017-1025, 1992.
- CHACANA, P.A.; TERZOLO, H.R.; GUTIÉRREZ CALZADO, E. et al. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. *Revista Medicina Veterinaria*, v.85, n.5, p.179-189, 2004.
- CHANG, H.; LU, T.; CHEN, C. et al. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by ionic polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.1, p.995-999, 2000.
- DAVALOS-PANTOJA, L.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZALEZ, D. et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on látex particles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 11, n.1, p.657-673, 2000.
- DAVIS, C.; REEVES, R. The egg Yolk. IN: DAVIS, C.; REEVES, R. *High value opportunities from the chicken egg*. Kingston: Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. p.15-29.
- DEIGNAN, T.; KELLY, J.; ALWAN, A. et al. Comparative analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. *Food and Agricultural Immunology*, v.12, n.1, p.77-85, 2000.
- DEVI, C. M.; BAI, M. V.; LAL, A. V. et al. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.51, n.1, p.129-138, 2002.
- DILONARD, A. D.; MARCANTE, M. L.; POGGIALI, F. et al. Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papillomavirus. *Archives of Virology*, v.146, n.1, p.117-125, 2001.
- FINNEY, D.J. *Probit Analysis*. 3. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.
- GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T. et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, v.4, n.1, p. 2528-2532, 1990.
- GIGLI, I.; AUSTEN, K. F. Phylogeny and function of the human complement system. *Annual Rev Microbiology*, v.25, n.1, p.309-311, 1971.

- GOLDRING, J. P.; COETZER, T. H. T. Isolation of chicken immunoglobulins (IgY) from egg yolk. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v.31, n.3, p.185-187, 2003.
- GOTTSTEIN, B.; HEMMELER, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Parasitology Research*, v. 71, n.1, p. 273-276, 1985.
- HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies, a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S. et al., T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.57, n.1, p. 450-454, 1993.
- HATTA, H.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody: IgY. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.54, n.1, p.2531-2535, 1990.
- HATTA, H.; TSUDA, K.; OZEKI, M. et al. Passive immunization against dental plaque formations in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, v.31,n.4, p.268-274, 1997.
- HOFFMAN, W. L.; RUGGLES, A. O.; TABARYA, D. Chicken anti-protein A prevents *Staphylococcus aureus* protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results. *Journal of Immunological Methods*, v.198, n.1, p.67-77, 1996.
- HORIKOSHI, T.; HIRAOKA, J.; SAITO, M. et al. IgG antibody from hen egg yolks: purification by ethanol fractionation. *Journal of Food Science*, v.58, n.1, p.739-742, 1993.
- JARADAT, Z. W.; MARQUARDT, R. R. Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. *Food of Agricultural Immunology*, v.12, n.1, p.263-272, 2000.
- JENSENIUS, J. C.; ANDERSEN, I.; HAU, J. et al. Eggs: convenient packaged antibodies, methods for purification of IgG from egg yolk. *Journal of Immunological Methods*, v.46, n.1, p.63-68, 1981
- JIN, L.Z.; BAIDOO, S.K.; MARQUARDT, R.R. et al. In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet mucus by egg-yolk antibodies. *Immunology and Medical Microbiology*, v.21, n.1, p.313-321, 1998.
- JUNEJA, L.R. Biological characteristics of eggs components, specifically sialyloligosaccharides in egg yolk. IN: SIM,J.S.; NAKAI,S.; GUENTER,W. *Egg Nutrition and Biotechnology*. Wallingford: CABI Publishing, 1999.
- KIM, H.; NAKAI, S. Immunoglobulin separation from egg yolk: a serial filtration system. *Journal of Food Science*, v.61, n.1, p.510-512, 1996.
- KUNZ, U.S.; POSPISCHIL, A.; PACCAUD, M.F. Immunohistochemical detection of Chlamidiae in formalin-fixed tissue sections: comparison of a monoclonal antibodies with yolk derivaded antibodies (IgY). *Journal of Veterinary Medicine*, v.38, n.4, p.292-298, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.1, p.680-685, 1970.
- LARSSON, A.; CARLANDER, D., WILHELMSON, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Food and Agricultural Immunology*, v.10, n.1, p.29-36, 1998.
- LARSSON, A.; KARLSSON-PARRA, A.; SJÖQUIST, J. Use de chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical Chemistry*, v.37, n.1, p.411-414, 1991.

- LARSSON, A.; WEJAKER, P.; FORSBERG, P. et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *Journal of Immunological Methods*, v.156, n.1, p.79-83, 1992.
- LARSSON, A.; LINDAHL, T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference in immunological assays. IN: COUDERT, F. *Avian Immunology in Progress*. Paris: INRA, 1993. p.97-102.
- LEE, K. A.; CHANG, S. K.; LEE, J. H. et al. Acid stability of anti *Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.35, n.1, p. 488-493. 2002.
- LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *Journal of Experimental Medicine*, v.130, n.1, p.1337-1352, 1969.
- LI, X.; NAKANO, T.; SUNWOO, H. H. et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Science*, v.77, n.1, p.266-270, 1998.
- LINDAHL, T. L.; FESTIN, R.; LARSSON, A. Studies of fibrinogen binding to platelets by cytometry: an improved methods for studies of platelet activation. *Thrombosis and Haemostasis*, v.68, n.2, p.221-225, 1992.
- LÖSCH, U.; SCHRANNER, I.; WANKE, R. et al. The chicken egg, an antibody source. *Journal of Veterinary Medicine*, v. B33, p.609-619, 1986.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
- MANUAL de procedimentos para vacinação. Brasília, *Fundação Nacional De Saúde*, 2001, p.201-230.
- MARQUARDT, R.R.; JIN, L.Z.; KIM, J.W. et al. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection in neonatal and early-weaned piglets. *Immunology and Medical Microbiology*, v.23, n.1, p.283-288, 1999.
- McKINNEY, M.M., PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascitic fluid. *Journal of Immunological Methods*, v.96, n.1, p.271-278, 1987
- MCLAREN, R. D.; PROSSER, C. G.; GRIEVE, R. C. J. et al. The use of caprylic acid for extraction of immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunized with ovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Immunological Methods*, v.177, n.1, p.175-184, 1994.
- MELO, M. M.; SILVA JÚNIOR, P. G. P.; LAGO, L. A. et al. Envenenamento botrópico. *Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.44, p.59-79, 2004.
- MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. *Food and Agricultural Immunology*, v.13, n.1, p.275-288, 2001.
- MOTOI, Y.; INOUE, S.; HATTA, H. et al. Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. *Japanese Journal of Infectious Disease*, v.58, n.1, p.115-118, 2005.
- MORRISON, S. L.; MOHAMMED, S. M.; WIMS, L. A. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology*, v.38, n.1, p.619-625, 2001.

- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v.9, n.1, p.255-259, 1988.
- NTAKARUTIMANA, V.; DEMEDTS, P.; SANDE, M. et al. A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferring from egg yolk. *Journal of Immunological Methods*, v.153, n.1, p.133-140, 1992.
- OLOVSSON, M.; LARSSON, A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.16, n.2, p.145-152, 1993.
- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section D*, v.26, n.1, p.507-515, 1949.
- PESSATTI, M.; FONTANA, J. D.; FURTADO, M. F. et al. Screening of Bothrops snake venoms for L-amino acid oxidase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.51, n.1, p.197-210, 1995.
- POLSON, A.; COETZER, T.; KRUGER, J. et al. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological Investigations*, v.14, n.4, p.323-327, 1985.
- POLSON, A.; VON WECHMAR, M. B.; VAN REGENMORTEL, M. H. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunological Communications*, v.9, n.5, p.475-493, 1980.
- PROGRESS in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Genova: *World health organization*, Offset Publication, 1981.
- RICKE, S. C.; SCHAEFER, D. M.; COOK, M. E. et al. Differentiation of ruminal bacterial species by enzyme-linked immunosorbent assay using egg yolk antibodies from immunized chicken hens. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, n.2, p.596-599, 1988.
- ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* em função da distribuição geográfica no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.22, n.2, p.383-393, 2005.
- ROSE, M. E.; ORLAN, E.; BUTTRES, N. Immunoglobulin classes in the hen's eggs: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology*, v.4, n.1, p.521-523, 1974.
- ROSOL, T.J.; STEINMEYER, C.L.; MCCAULEY, L.K. et al. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (1-36). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.35, n.1, p.321-337, 1993.
- RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.L. *The Principles of Human Experimental Technique*. Special edition. London: Univ. Fed. Animal Welfare, Potters Bar. 1992. (reedição do livro original de 1959).
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: UFMG/FEPMVZ, 1999. 221p.
- S'ATANA, C.D., MONTEIRO, L.F.; MARCUSSI, S. et al. Isolamento e caracterização bioquímica de proteases do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. IN: 5º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO, v.5(1), 2004, Ribeirão Preto. *Anais de Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto*, Ribeirão Preto: Conic, 2004, p.179-179.

- SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals*, v. 33, n.2, p.129-154, 2005.
- SCHADE, R.; PFISTER, C.; HALATSCH, R. et al. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk- an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *Alternatives to Laboratory Animals*, v.19, n.1, p.403-407, 1991.
- SCHMIDT, P.; ERHARD, M. H.; SCHAMS, D. et al. Chicken egg antibodies for immunohistochemical labeling of growth hormone and prolactin in bovine pituitary gland. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.41, n.9, p.1441-1446, 1993.
- SCHMIDT, P.; HAFNER, A.; REUBEL, G. H. et al. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for immunohistochemistry. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.36, n.1, p.661-667, 1989.
- SCHMIDT, P.; WIEDEMANN, V.; KÜHLMANN, R. et al. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.36, n.1, p.619-628, 1989.
- SHIMIZU, M.; FITZSIMMONS, R. C.; NAKAI, S. Anti-E.coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *Journal of Food Science*, v.53, n.5, p.1360-1366, 1998.
- SHIMIZU, M.; MIWA, Y.; HASHIMOTO, K. et al. Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.57, n.9, p.1445-1449, 1993.
- SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K. et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.56, n.1, p.270-274, 1992.
- SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K. et al. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solutions with high sugar concentrations. *Journal of Food Science*, v.59, n.4, p.763-772, 1994.
- SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R. R. et al. A prothrombin activator from Bothrops erythromelas (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochemical Journal*, v.369, n.1, p.129-139, 2003.
- SONG, C. S.; YU, J. H.; BAI, D. H. et al. Antibodies to the alpha subunits of insulin receptor from eggs of immunized hens. *Journal of Immunology*, v.135, n.1, p.3354-3359, 1985.
- SOROTERAPIA. IN: *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília, Fundação Nacional De Saúde, 2001, p.91-95.
- STAAK, C.; SCHWARZKOPF, C.; BENH, I. et al. Isolation of IgY from yolk. IN: R. SHADE, I. BEHN, M. ERHARD, A. et al. *Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY technology*. Berlin Heidelberg New York: Springer Lab Manuals, 2000. P. 65-107.
- SUNWOO, H. H.; NAKANO, T.; DIXON, W. T. et al. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Poultry Science*, v.75, n.3, p.342-245, 1996.
- SVENDSEN, B. L.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G. et al. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of title and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *Journal of Immunological Methods*, v.191, n.2, p.113-120, 1996.



SVENDSEN, B.L.; COWLEY, A.; OSTERGAARD, L.H. et al. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Laboratory Animal Science*, v.45, n.1, p.89-93, 1995.

THALLEY, B. S.; CARROL, S. B. Rattlesnake and scorpion antivenom from the egg yolks of immunized hens. *Biotechnology*, v.8, n.1, p.934-938, 1990.

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

VERDOLIVA, A.; BASILE, G.; FASSINA, G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *Journal of Chromatography B*, v.749, n.1, p.233-242, 2000.

VIEIRA, J. G.; OLIVEIRA, M. A.; MACIEL, R. M. et al. Development of an radioimmunoassay for the synthetic amino terminal (1-34) fragment of human parathyroid hormone using egg yolk-obtained antibodies. *Journal of Immunoassay*, v.7, n.1, p.57-72, 1986.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, v.16, n.8, p.392-398, 1995.

WEN, F. R. Ineficácia do antiveneno na reversão do edema e necrose em pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops*. IN: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXICOLOGIA, n.6, 2000, São Pedro. *Anais do Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxicologia*. São Pedro: Cruzeiro, 2000, p.78-81.

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