



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

CORNEVILE CORREIA NETO

**ANTICORPOS IGY PRODUZIDOS EM OVOS DE GALINHAS IMUNIZADAS COM
A LECTINA DE *Vatairea guianensis* (VGL): PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO**

FORTALEZA

2020

CORNEVILE CORREIA NETO

ANTICORPOS IgY PRODUZIDOS EM OVOS DE GALINHAS IMUNIZADAS COM A
LECTINA DE *Vatairea guianensis* (VGL): PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Coorientador: Prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C847a Correia Neto, Corneville.

Anticorpos IgY produzidos em ovos de galinhas imunizadas com a lectina de *Vatairea guianensis* (VGL) : Produção, Isolamento e Caracterização / Corneville Correia Neto. – 2020.
65 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

1. IgY. 2. Lectinas. 3. VGL. 4. Galinhas poedeiras. 5. Purificação. I. Título.

CDD 660.6

CORNEVILE CORREIA NETO

ANTICORPOS IgY PRODUZIDOS EM OVOS DE GALINHAS IMUNIZADAS COM A
LECTINA DE *Vatairea guianensis* (VGL): PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Norma Maria Barros Benevides
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Eder Almeida Freire
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fachine
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu Deus grandioso,

Dediquei...

Dedico...

E sempre dedicarei
minhas conquistas e vitórias.

Em ti confio!

A minha esposa Mary e minha querida filha
Sarah Elizabeth e também aos meus pais,
responsáveis por mais esta vitória.

AGRADECIMENTOS

Principalmente aquele que é o responsável pelo alicerce de uma construção sólida, não o vemos, entretanto, a sua remoção faz com que todo o resto desmorone, DEUS, agradeço por me transmitir fé, paciência, determinação em todas as realizações alcançadas nesta jornada.

Agradeço, especialmente, aos meus pais, José, em que a ausência do convívio nos faz falta e nos traz muitas saudades (*in memoriam*) e Odete pela conduta que hoje tenho, lembro-me que meu pai na sua simplicidade de um mecânico sempre disse que o melhor que poderia deixar para nós (eu e meu irmão) era o conhecimento, sempre nos incentivou a estudar.

Ao meu irmão Wagner por estar sempre à disposição.

A minha esposa Mary e minha querida filha Sarah Elizabeth, obrigada por serem meu porto seguro nestes momentos, por me incentivarem a melhorar sempre.

Aos meus sogros Dico e Rita que mesmo com sua simplicidade de conhecimentos, sei que sempre torceram por mim.

As minhas cunhadas Marluce e Marilza pela força disponibilizada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Benildo de Sousa Cavada, pela confiança, incentivo e amizade. Obrigado por ter aceito a tarefa de orientação de mais essa pesquisa e que com o seu profissionalismo, competência, dedicação e apoio levou-me a realização dessa tese, insistiu em me tirar da zona de conforto para que eu atingisse este objetivo, você é um ser humano que consegue enxergar onde muitos não conseguem ver, serei sempre grato, alguns professores contribuem para a nossa educação, mas os especiais conseguem deixar uma marca para a vida inteira, o amigo tem deixado boas marcas na minha vida.

A querida Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento, que ao lado de sua grande competência técnica, seu apoio e confiança tem sido imprescindível, serei sempre grato, conte comigo.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação RENORBIO/UFC (Rede Nordeste de Biotecnologia/Universidade Federal do Ceará) pela oportunidade dada a mim de realizar este Doutorado.

Ao Prof. Ednardo Rodrigues de Freitas pela disponibilização da infraestrutura do aviário e por todo o apoio físico oferecido pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará.

Ao amigo e funcionário do aviário Isaías Carlos por estar sempre disposto a me

ajudar.

Ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, onde eu trabalho e tento deixar o meu melhor.

A secretária do Departamento de Bioquímica: Maria Gildemar, como também aos colegas, Daniel, Gilmar, Poliana e os demais que acredito que sempre estiveram ao meu lado e que mesmo longe devido a pandemia (*COVID-19*) me fazem companhia, agradeço de coração, não poderia esquecer as meninas da limpeza, *Nega* e *Teca*, que tanto eu perturbo, sempre por uma boa causa.

A colega também Médica Veterinária que me abriu portas favorecendo a execução dos experimentos: Isabel Cristiane Façanha Brasil.

Ao Laboratório de proteínas biologicamente ativas - Biomol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, pelo uso dos equipamentos, essenciais para o desenvolvimento dos experimentos desta tese.

Aos colegas do Biomol-Lab, que me ajudaram nos procedimentos para execução deste projeto, Messias Vital, Vinícius Osterne, Mayara Torquato, minha imensa gratidão, como também aos demais componentes do laboratório que de uma forma ou de outra contribuíram um pouquinho para construção desta tese.

A Universidade Federal do Ceará pelo suporte técnico/científico/financeiro.

Aos meus colegas de turma de Doutorado, que juntos caminhamos e superamos cada obstáculo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade, obrigado pelas críticas, apoio e carinho que de algum modo recebi durante o desenvolvimento desse projeto.

Nesses agradecimentos não poderia esquecer meus amigos e irmãos de longas datas, que com certeza em suas orações lembram de mim, apesar de entenderem muito pouco ou nada do que eu faço, tenho certeza que torcem por mim. Israelito Almeida, Domízia, Samuel, Gilmara, Jeronimo, Fátima, Amadeu, Gracinha, Jean, Raquel, Adahil, Júlia, Lillian, Luzanir, Viana, Assis, Zefinha e Clébia Oliveira.

Bom, são muitas pessoas a agradecer, foram cerca de quatro anos de muito trabalho e com certeza estou esquecendo algumas pessoas, mas não se sintam de lado, com certeza todos que estavam próximo foram importante para essa tese.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Examinai tudo, retenha-o o que é bom.”

Tessalonicenses 5:21

“Queres fazer Deus sorrir? Faça planos!”

Sarah Elizabeth

RESUMO

Lectinas são um grupo de proteínas que se ligam a carboidratos sendo encontradas em todos os organismos. Dentre essas proteínas, uma que se destaca por possuir diversas atividades biológicas é a lectina de *Vatairea guianensis* (VGL). As técnicas que envolvem anticorpos podem variar de ensaios clássicos de imunquímica a técnicas avançadas de microscopia. Assim, eles podem se tornar ferramentas biotecnológicas valiosas, uma vez que são capazes de reconhecer especificamente epítomos de moléculas alvo. As imunoglobulinas ou anticorpos são proteínas cuja principal função é se ligar a antígenos estranhos ao indivíduo, para neutralizá-los. No caso das aves, a principal classe de imunoglobulinas Y (IgY) pode ser encontrada não apenas no sangue, mas também nas gemas. Esse fato permite a purificação rápida e eficiente dessas moléculas, facilitando seu uso como ferramentas biotecnológicas. Este trabalho teve como objetivo a produção de anticorpos contra VGL em ovos de galinhas poedeiras, implementando uma metodologia para a produção de ferramentas biotecnológicas para o estudo de lectinas. Para tanto, as galinhas foram imunizadas com VGL por 15 semanas em intervalos de 10 dias. Os ovos coletados tiveram as IgY isoladas e purificadas e o anticorpo produzido foi capaz de reconhecer VGL conforme observado por western *blotting*. Nesse sentido, as IgYs produzidas neste trabalho constituem uma poderosa ferramenta biotecnológica disponível para estudos futuros.

Palavras chaves: IgY. Lectinas. VGL. Galinhas poedeiras. Purificação.

ABSTRACT

Lectins are a group of carbohydrate-binding proteins found in all organisms. Among these proteins, a species that stands out for having several biological activities is *Vatairea guianensis* lectin (VGL). Techniques involving antibodies can range from classic immunochemistry assays to advanced microscopy techniques. Thus, they can become valuable biotechnological tools since they are able to specifically recognize epitopes of the target molecules. Immunoglobulins or antibodies are proteins whose main function is to bind with antigens foreign to the individual, in order to neutralize them. In the case of birds, the main class of immunoglobulins Y (IgYs) can be found not only in blood but also in egg yolks. This fact allows for quick and efficient purification of these molecules, facilitating their use as biotechnological tools. This work aimed to produce antibodies against VGL in chickens, implementing a methodology for the production biotechnological tools for the study of lectins. For that purpose, laying hens were immunized with VGL for 15 weeks at 10-day intervals. Collected eggs had the IgY purified and the produced antibody was able to recognize VGL as observed by western blotting. In this sense, the IgYs produced in this work constitute a powerful biotechnological tool available for future studies.

Keywords: IgY. Lectins. VGL. Laying hens. Purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação estrutural das lectinas de plantas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.....	18
Figura 2 – <i>Vatairea guianensis</i> , ramos flores e frutos. A) Flores, folhas e ramos; B) Frutos secos e C) Ramos com frutos	21
Figura 3 – Representação esquemática das imunoglobulinas secretadas nos mamíferos.....	23
Figura 4 – Representação esquemática da IgY de aves e IgG de mamíferos.....	24
Figura 5 – Anticorpos materno do ovo para o embrião.....	29
Figura 6 – Comparação entre a produção de anticorpos de mamíferos e aves.....	34
Figura 7 – Aves de postura mantidas em gaiolas apropriadas durante o experimento.....	39
Figura 8 – Imunização de uma ave com VGL.....	40
Figura 9 – Concentração proteica (mg.mL^{-1}) após o processo de purificação por precipitação por sulfato de amônio de gemas de ovos de galinhas imunizadas com VGL a 200 e 400 μg ao longo de 15 semanas. As aves do grupo controle foram imunizadas com solução salina.....	43
Figura 10 – Cromatograma da purificação de IgY em matrix <i>HiTrap® IGY Purification</i>	44
Figura 11 – SDS-PAGE da amostra de IgY purificada em cromatografia de afinidade.....	45
Figura 12 – Resultado do teste de <i>Western blotting</i> indicando a capacidade da IgY produzida em reconhecer VGL.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação taxonômica de <i>Vatairea guianensis</i>	20
Tabela 2 – Número de ovos coletados durante as quinze semanas do experimento. Controle – grupo controle, imunizado com solução salina; VGL 200 µg – grupo imunizado com 200 µg de VGL por imunização; VGL 400 µg – grupo imunizado com 400 µg de VGL por imunização.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
BSA	Albumina de soro bovino
ConA	Lectina Concanavalina – A
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
CL	Região Constante
DSL	Lectina de <i>Dioclea sclerocarpa</i>
ELISA	ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Fab	Fragmentsos ligadores de antígeno (<i>Fragment antigen binding</i>)
Fc	Fragmento cristalizável
FR	Fator Reumatoide
IM	Intramuscular
Ig	Imunoglobulina
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IgY	imunoglobulina Y
kDa	kilodalton
kG	quilograma
M	Molar
Mab	Anticorpo monoclonal
ON	<i>Overnight</i> (16h)
PBS	Tampão Fosfato Salino
PEG	Polietilenoglicol
PM	Peso Molecular
<i>SPF</i>	Livre de Patógeno Específico
TCD4	linfócito T auxiliar
TCD8	linfócito T citotóxico
VL	Região Variável
VGL	Lectina de <i>Vatairea guianensis</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Lectinas	16
1.2	Lectinas de plantas e classificação	16
1.3	Lectinas de Leguminosas	18
1.4	Lectinas de sementes de <i>Vatairea guianensis</i>	20
1.5	Imunoglobulinas	22
1.6	IgY e IgG - estrutura	23
1.7	IgY - propriedades fisico-químicas	25
1.8	Galinhas (<i>Gallus gallus</i>) utilizados como animal de experimentação em pesquisas	26
1.9	Sistema imune e imunização de aves	27
1.10	Formação do ovo e transferência de IgY para a gema	28
1.11	Processo de obtenção da IgY	30
1.12	Vantagens da utilização de IgY	31
1.13	Métodos de isolamento e purificação de IgY	34
1.14	Aplicação da IgY em Biotecnologia	36
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Obtenção e manutenção das aves	38
3.2	Definição dos grupos amostrais e preparação do antígeno para produção de IgY anti-VGL (Imunização das aves)	38
3.3	Coleta dos ovos	40
3.4	Purificação da fração proteica contendo IgY	40
3.5	Quantificação de proteínas	41
3.6	<i>Western Blot</i>	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Manutenção e imunização das aves	42
4.2	Postura dos ovos	42
4.3	Quantificação de proteínas	43

4.4	Purificação de IgY anti-VGL	44
4.5	Avaliação da especificidade do anticorpo anti-VGL por immunoblotting ...	45
5	DISCUSSÃO	46
5.1	Imunização das aves	46
5.2	Capacidade de postura das aves	47
5.3	Tempo de resposta ao antígeno	47
5.4	Quantidade de IgY na gema	48
5.5	Vantagens de IgY em relação a IgG	48
5.6	Métodos para purificação de IgY	49
5.7	Aplicações da IgY na biotecnologia	50
5.8	<i>Western Blot</i>	50
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO A - PATENTE RESULTANTE DO PRESENTE TRABALHO	64
	ANEXO B - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	66

1 INTRODUÇÃO

Assim como numa produtiva fábrica, tudo dentro da célula é muito bem controlado de modo que não são admitidos erros de produção. Dentre os quatro grandes grupos de macromoléculas, encontram-se as proteínas, competindo com os carboidratos como macromoléculas mais abundantes nos organismos. No início do século XIX, as proteínas eram ainda desconhecidas quanto aos arranjos complexos que suas estruturas podem assumir. Antes mesmo que a estrutura das proteínas fosse razoavelmente estudada e satisfatoriamente compreendida, em 1888 foram descobertas as lectinas, uma classe intrigante de proteínas. Essas moléculas, compreendem um grupo heterogêneo de proteínas de origem não imune, que possuem pelo menos um domínio não catalítico que seletivamente reconhece carboidratos, se ligando de maneira reversível a açúcares livres ou glicanos presentes em glicoconjugados, sem alterar suas estruturas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Essas moléculas estão amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas em praticamente todos os organismos desde microorganismos, como vírus e bactérias, até animais superiores como os seres humanos. Hoje, as lectinas possuem reconhecidamente um leque de possibilidades de funções e aplicações diversas para os organismos vivos e para a biotecnologia, até então não exploradas (BIES et al., 2004). Portanto, as lectinas apresentam características que tem atraído muito interesse no campo da pesquisa, não só quanto à sua estrutura mais também quanto ao seu potencial biotecnológico em diferentes aplicações para diferentes propósitos, como na imunquímica por exemplo.

Um anticorpo torna-se uma poderosa ferramenta no campo da biotecnologia devido sua capacidade de reconhecimento de um antígeno com especificidade de alta afinidade. A indústria de diagnósticos alcança 30% dos 10 bilhões de dólares em faturamento baseados no uso de anticorpos. Anticorpos monoclonais e policlonais de mamíferos são os mais utilizados embora haja desvantagens como o custo de produção e o estresse causado aos animais durante as longas etapas de sangria. Uma alternativa eficiente e de baixo custo são os anticorpos policlonais oriundos de aves, tendo em vista que a Imunoglobulina Y (IgY) de aves, homologa da Imunoglobulina G (IgG) em mamíferos, fica concentrada na gema do ovo, permitindo a sua obtenção de maneira não invasiva. Considerando tudo o que foi dito acima, se torna necessário o desenvolvimento de uma metodologia mais ética de purificação de anticorpos que possam ser usados em pesquisas e de forma escalonável para sua utilização comercial. Neste sentido, o projeto ora apresentado visou criar um fluxo de trabalho através de uma metodologia de purificação de anticorpos IgY a partir de gema de ovos de galinha

poedeiras imunizadas com a lectina de *Vatairea guianensis* (VGL), aplicando técnicas cromatográficas e aliando eficiência de produção com baixo custo. Sendo assim, apresenta-se uma nova opção de estudo onde se buscou uma alternativa eficaz e de custo acessível e ético no estudo da lectinologia.

1.1 Lectinas

Originário do latim, lectina vem do termo “legere”, que significa selecionar, escolher. Boyd e Shapleigh (1954), utilizaram este termo para designar um grupo de proteínas que apresentam como característica comum, a seletividade na interação com carboidratos. Este termo foi generalizado por Sharon e Lis (1972), englobando todas as proteínas presentes em fontes de natureza variada, de origem não imunológica, capazes de ligar-se a carboidratos, com especificidade ou não para eritrócitos de um determinado grupo sanguíneo. Segundo, Peumans e Van Damme (1995) Kocourek e Hourejsi (1983), afirmaram que as lectinas também podem ser denominadas de aglutininas devido a sua capacidade de aglutinar células e/ou precipitar gliconjugados.

Ultimamente a descrição mais bem aceita e mais abrangente sobre lectinas é a estabelecida por Peumans e Van Damme (1998; 1995), que define lectinas de plantas como todas as proteínas que possuem no mínimo um domínio não-catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos, estendendo o conceito para proteínas que se comportam de forma completamente diferente com relação as suas propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados.

1.2 Lectinas de plantas e classificação

As lectinas constituem um grupo de proteínas presentes praticamente em todos os organismos, sobretudo em vegetais, onde são encontradas, algumas vezes, em grandes quantidades. A maioria das lectinas vegetais estudadas tem sido obtida de sementes, principalmente em leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após a germinação. As lectinas podem constituir até cerca de 10% das proteínas totais da semente, porém a quantidade isolada é pequena e varia entre 0,1-1% deste total (LORIS, 2002; SHARON, 1993).

Apesar das lectinas terem sido descritas em diferentes famílias vegetais, a família *Leguminosae* se destaca pela presença de grandes quantidades e variedade dessas proteínas.

Estudos descreveram o isolamento de lectinas de sementes (LORIS et al., 1998; SHARON, 1993) de folhas, de frutos, de raízes de algumas *Convolvulaceae* (VAN DAMME et al., 1998) e de tubérculos (SUSEELAN et al., 2002).

As lectinas de plantas foram classificadas em sete grupos, ou famílias, por Van Damme et al (1998) de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas. Esses grupos são nomeados de: lectinas de leguminosas, lectinas ligantes a quitina contendo domínios heveínicos, o termo “domínio heveínico” refere-se a uma pequena proteína, uma merolectina de 43 resíduos de aminoácidos, extraída do látex da *Hevea brasiliensis*, conhecida popularmente como seringueira (WALJUNO et al., 1975), lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose, proteínas inativadoras de ribossomo tipo II (RIPs tipo II), lectinas de floema de *Curcubitaceae*, lectinas relacionadas à jacalina e lectinas de *Amaranthaceae*.

Baseada na classificação estrutural e nos Domínios de Reconhecimento a Carboidratos (DRCs), as lectinas também podem ser agrupadas em famílias caracterizadas por sequências similares ou organização estrutural. Van Damme et al., (1998) subdividiu as lectinas vegetais de acordo com a organização estrutural e os domínios de reconhecimento a carboidrato, esta divisão gerou quatro classes principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1).

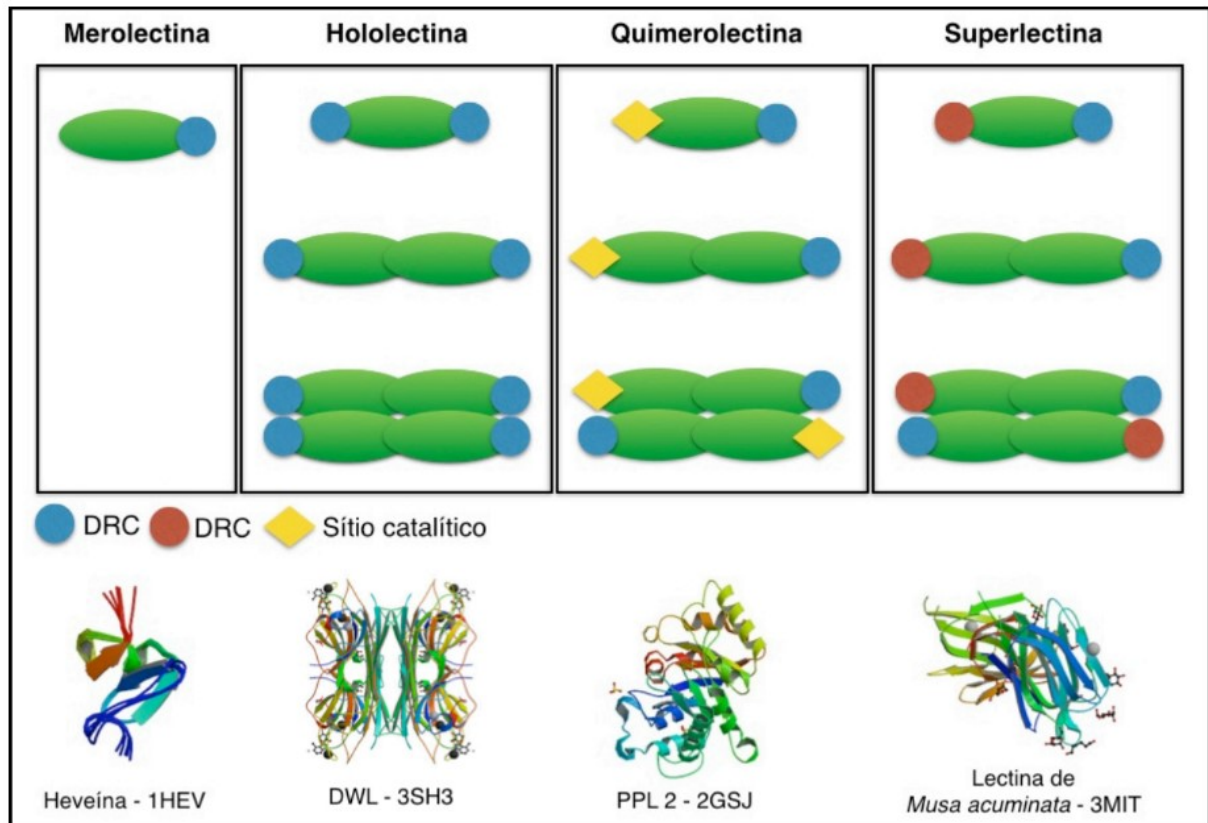
A) Merolectinas: São lectinas que possuem um único domínio de ligação a carboidrato na sua estrutura. Esta característica dá um caráter monovalente a essas proteínas, dessa forma elas são incapazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados.

B) Hololectinas: As hololectinas, contém dois ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos que são idênticos e se ligam aos mesmos carboidratos ou carboidratos estruturalmente relacionados. Como as hololectinas são multivalentes, elas podem aglutinar células ou precipitar glicoconjugados devido a sua capacidade de formar ligações cruzadas. Essa é a classe de lectinas mais comum e corresponde a maioria das lectinas estudadas.

C) Quimerolectinas: Essas lectinas consistem em um ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos e um outro domínio não relacionado, com a atividade catalítica bem definida, cuja a ação é independente dos CRDs. Dependendo do número de CRDs as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas.

C) Superlectinas: As superlectinas consistem de no mínimo dois domínios de reconhecimento a carboidratos que reconhecem açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes.

Figura 1. Classificação estrutural das lectinas de plantas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.



Fonte: Osterne (2016) Imagem adaptada de VAN DAME et al., 1998

DRC: Domínio de Reconhecimento a Carboidratos.

A classificação das lectinas vegetais proposta por Van Damme et al (1998), é incompleta por não ser baseada em aspectos evolutivos e levar em conta apenas os aspectos estruturais. Isto ocorre pelo fato de que, a medida que novas lectinas vão sendo descobertas e caracterizadas, deixa de existir um limite taxonômico bem definido entre as famílias de lectinas vegetais. Um exemplo claro deste fato é a lectina específica para glicose e manose extraída de sementes da leguminosa *Parkia platycephala* (Leguminosae), cuja estrutura é composta por três domínios repetidos relacionados a jacalina (GALEGO DEL SOL et al., 2004).

1.3 Lectinas de Leguminosas

No contexto de estudo de lectinas vegetais, a família *Leguminosae* destaca-se quanto ao número de proteínas purificadas e caracterizadas. As proteínas desse grupo caracterizam-se por possuírem uma alta similaridade estrutural, porém, com especificidade

por carboidratos e propriedades biológicas distintas. Se enquadram nesse grupo a Concanavalina A (ConA), extraída de sementes de *Canavalia ensiformes*, e as lectinas extraídas de outras plantas da subtribo *Diocleinae* (CAVADA et al., 2001), chamadas de lectinas ConA-like.

A maioria das lectinas de leguminosas já isoladas é constituída de uma unidade estrutural de 25 a 30 kDa que, via de regra, se associam formando dímeros ou tetrâmeros iguais ou diferentes entre si. Cada uma das subunidades possui um único sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Dentro da família *Fabaceae* (Leguminosae), a subfamília *Papilionoideae* tem sido a mais estudada, contendo lectinas de diferentes especificidades por açúcares (CAVADA et al., 1993).

As lectinas de leguminosas compartilham muitas características estruturais semelhantes, tais como a sequência de aminoácidos, a estrutura secundária e conformação tridimensional, sugerindo que esta família de lectinas tenha evoluído a partir de um ancestral comum.

Muitas lectinas de leguminosas foram completamente sequenciadas, como por exemplo as de sementes de *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA; CAVADA, 1984); *Dioclea grandiflora* (AINOUZ et al., 1992); *Canavalia gladiata* (YAMAUCHI et al., 1989; YAMAUCHI; MINAMIKAWA, 1990); *Canavalia maritima* (PEREZ et al., 1991); *Dioclea lehmanni* (PEREZ et al., 1991).

A homologia entre lectinas de leguminosas é bem significativa quando suas sequências são dispostas circularmente. Nas lectinas as duas cadeias são alinhadas a partir do resíduo 123 com a extremidade *N*-terminal de outras lectinas que possuem uma só cadeia polipeptídica. Por exemplo, no caso das lectinas de duas cadeias polipeptídicas, tribo *Viceae*, o resíduo 123 da lectina é alinhado com a extremidade *N*-terminal da cadeia β e posteriormente o alinhamento é seguido pela cadeia α (SHARON; LIS, 1990).

As similaridades observadas, sugerem que essas lectinas (de uma e de duas cadeias) são produtos de genes homólogos que divergiram durante a evolução. Esta homologia pode ainda ser fundamentada na observação de eventos pós-traducionais, que ocorrem durante a biossíntese de algumas lectinas, como é o caso da lectina de sementes de *Canavalia ensiformes* (Con A) (SHARON; LIS, 1990; CAVADA et al., 1993; RAMOS, 1996).

1.4 Lectinas de sementes de *Vatairea guianensis*

Na Amazônia as plantas medicinais são amplas e culturalmente utilizadas de forma empírica para o tratamento de diversas doenças. Grande parte dessas plantas ainda não foi investigada cientificamente, sobretudo quanto aos aspectos relacionados as atividades biológicas. Neste trabalho a espécie selecionada foi a *Vatairea guianensis*, cuja taxonomia é mostrada na tabela 1, utilizada na medicina tradicional para tratar infecções de pele como as micoses cutâneas. É uma árvore comum em áreas de florestas sazonalmente inundáveis, mede em torno de 8 a 25 metros de altura e é raramente encontrada em terra firme e com frutificação geralmente no período de junho (SILVA, 2011). A espécie *Vatairea guianensis* é nativa da região amazônica, conhecida como faveira, fava de empigem, faveira de empigem, fava mutum, fava bolacha, faveiro e angelim do igapó. A população da região do médio e baixo Amazonas utiliza as favas de espécies do gênero *Vatairea*, principalmente as de *V. guianensis*, contra diversos tipos de micoses superficiais sob a forma de tintura alcoólica ou por aplicação direta de suas "amêndoas" maceradas. A população também usa as cascas do caule e das raízes contra fungos dermatofitos, durante o período em que estas plantas não estão na fase de frutificação.

Tabela 1. Classificação taxonômica de *Vatairea guianensis*.

Reino	<i>Plantae</i>
Classe	<i>Magnoliopsidae</i>
Família	<i>Leguminosae (Fabaceae)</i>
Subfamília	<i>Papilionoidae</i>
Tribo	Dalbergieae DC.
Gênero	<i>Vatairea</i>
Espécie	<i>Vatairea guianensis</i> Aublet

Nos primeiros estudos em que foi citada a presença de lectina em sementes de *Vatairea guianensis*, relatou-se sua especificidade por D-galactose e derivados; nomeada de VGL, uma glicoproteína capaz de reconhecer glicoconjugados da superfície de diferentes linhagens de células cancerígenas do cólon humano (ISÍDRIO, 2002). Em estudos mais recentes tem-se relatado a sua especificidade a *N*-acetil-D-galactosamina/D-galactose, sendo

diferenciada de acordo com seu perfil eletroforético em uma proteína composta por uma dupla banda de 30 – 32 kDa, denominada de cadeia α , e duas bandas menores de 18 a 15 kDa respectivamente correspondentes a cadeia β e γ (SILVA et al., 2012) . Outros estudos aplicando VGL demonstraram a capacidade desta lectina em induzir a inflamação de maneira aguda em ensaios de edema de pata e peritonite, associada a elevação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, sua potencial atividade neuroprotetora frente a neurotoxicidade glutamatérgica *in vitro* em hipocampos de ratos (JACQUES, 2012), bem como seu efeito relaxante *in vitro* em aortas endotelizadas de ratos, envolvendo a participação do óxido nítrico e do domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina (SILVA et al., 2011).

Figura 2. *Vatairea guianensis*, ramos flores e frutos. A) Flores, folhas e ramos; B) Frutos secos e C) Ramos com frutos.



Fonte: La Chaussette Rouge e Tramil (2017).

Por tanto, uma das possíveis abordagens para ampliar e aumentar as possibilidades de investigação dessas moléculas em sistemas biológicos é a detecção das mesmas, através de técnicas que envolvam anticorpos. Tais técnicas podem incluir desde ensaios clássicos de imun química (precipitação, aglutinação, imun ensaios), até experimentos de ELISA e técnicas avançadas de microscopia. Neste sentido, os anticorpos tornam-se ferramentas biotecnológicas de grande valia, uma vez que são capazes de reconhecer especificamente epítomos das moléculas alvo.

1.5 Imunoglobulinas

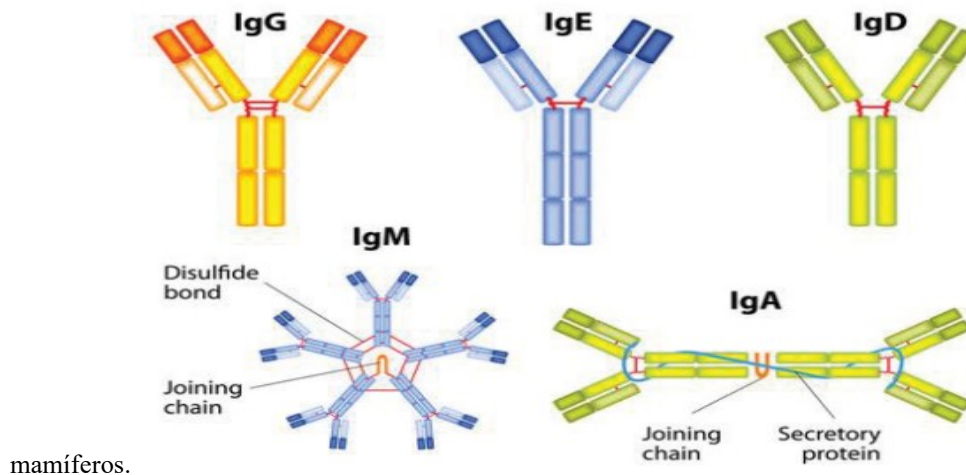
Anticorpos pertencem a uma família de glicoproteínas relacionadas estruturalmente, chamadas imunoglobulinas (Ig), presentes em grande concentração no plasma sanguíneo dos animais e, no caso das aves, podendo ser encontradas nas gemas dos ovos. De forma natural tais proteínas são produzidas pelo sistema imune dos vertebrados após a indução da reação com antígenos, e possui a capacidade de reconhecer substâncias e organismos estranhos para sua posterior eliminação (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001). São os vetores da imunidade humoral, tendo como função principal unir-se aos antígenos estranhos ao indivíduo, de modo a neutralizá-los. Essas moléculas conferem proteção do organismo contra vírus, bactérias, alérgenos, toxinas etc., contribuindo para sua neutralização e posterior eliminação (MARANHÃO; BRIGIDO, 2001). As imunoglobulinas são proteínas que atuam como componentes críticos em cada estágio da resposta humoral (ALZARI, 1988).

Quando expressas nas superfícies dos linfócitos B em repouso, servem de receptores que são capazes de detectar a enorme variedade de antígenos cognatos (BOYDEN, 1966). Na maioria dos animais superiores, cinco classes distintas de moléculas de imunoglobulinas são conhecidas: (Figura 3) IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, diferenciando umas das outras em tamanho, carga, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos (NUNES, 2005), e ainda varia o momento em que ocorre o pico na produção de cada uma. Independentemente da sua classe, as Ig possuem estrutura composta por duas cadeias polipeptídicas pesadas, cujo peso molecular pode variar de 50 a 70 kDa, e duas cadeias polipeptídicas leves, do tipo Kappa (κ) e Lambda (λ) (peso molecular em torno de 23 kDa).

A variação das imunoglobulinas se torna ainda maior quando investigados outros grupos de animais. Além destas imunoglobulinas ainda existe a Imunoglobulina Y (IgY), produzidas em aves, répteis, anfíbios e peixes pulmonados, a IgY é a classe de anticorpos de maior importância (MUNHOZ et al., 2014). O Y têm origem de “yolk” (gema), local que predominam estas imunoglobulinas.

Em aves, existem três classes de imunoglobulinas análogas as de mamíferos, IgA, IgM, IgY (IgG) (SUGITA-KONISHI, 1996). O peso molecular, morfologia e mobilidade imunoeletroforética da IgA e IgM de galinhas são similares a IgA e IgM de mamíferos (DAVIES, 1990).

Figura 3. Representação esquemática das imunoglobulinas secretadas nos



Fonte: Adaptado shutterstock.com/ru/image-vector/different-types-immunoglobulins-igg-iga-igd-182092031

1.6 IgY e IgG - estrutura

A IgY é um anticorpo descrito como imunoglobulina predominante no soro das aves, embora apresente-se em maior concentração na gema (LARSSON, 1993). A IgY, por sua similaridade com IgG de mamíferos, também era denominada de IgG aviária, sendo que tal denominação persistiu até a IgY ser purificada e caracterizada a partir de gema de ovos de galinhas (LESLIE, 1969).

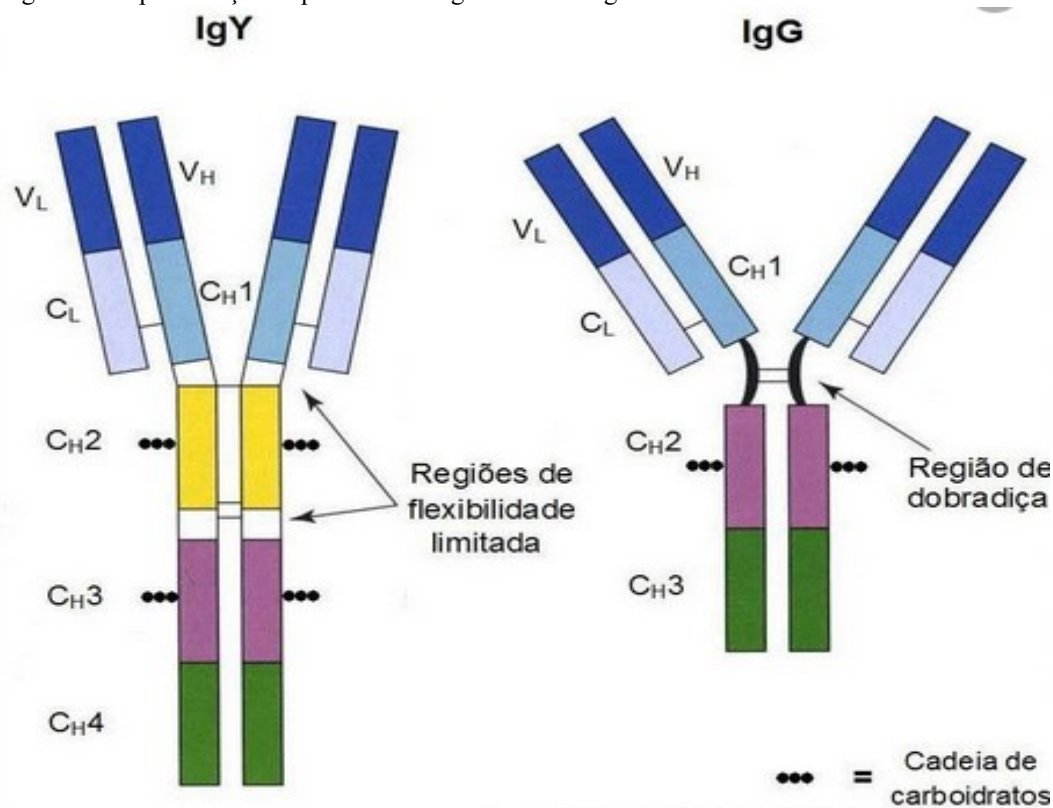
Estudos relacionados a evolução de anticorpos consideram a IgY ancestral da IgG, IgA e IgE de mamíferos (WARR et al., 1995), entretanto essas moléculas diferem da IgG por serem capazes de mediar reações anafiláticas (CARLANDER, 2002).

Quanto a estrutura, tanto a IgY como a IgG possuem duas cadeias leves e duas cadeias pesadas (Figura 4). A maior diferença entre as duas moléculas é o número das regiões constantes da cadeia pesada: a IgG apresenta 3 regiões constantes (CH1-CH3), enquanto a IgY apresenta 4 regiões constantes (CH1CH4). Ainda não há consenso sobre o peso molecular da IgY, mas a maioria dos autores consideram como sendo de aproximadamente 180 kDa (WARR, 1995; AKITA, 1998; BIZANOV, 2004; CHALGHOUMI et al., 2009) sendo maior que o peso da IgG que é cerca de 150 kDa. Tal diferença deve-se a região constante adicional e a presença de carboidratos (NARAT, 2003). A cadeia pesada é formada por um domínio variável e quatro constantes. Na cadeia pesada da IgY os domínios CH3 e CH4 estão mais relacionados aos domínios CH2 e CH3 da IgG (WARR, 1995). A cadeia leve é formada por uma região constante e outra variável (CL e VL) e as ligações dissulfeto,

responsáveis pela estabilização da cadeia leve (entre CL e VL) estão ausentes, o que torna as forças intermoleculares da IgY mais fracas em relação a IgG (SHIMIZU, 1993).

O domínio CH2 presente na estrutura da IgY está ausente na IgG, o qual provavelmente se condensa para formar a região da dobradiça na IgG (CHALGHOUMI et al., 2009). A região da dobradiça é outra diferença significativa entre IgY e IgG pois ela está presente na IgG de mamíferos e ausente em IgY e é responsável pela flexibilidade do fragmento (Fab). Em contraste, a IgY apresenta na cadeia pesada entre os domínios CH1-CH2 e CH2-CH4 resíduos de prolina e glicina que conferem certa flexibilidade a molécula (CHALGHOUMI et al., 2009). O Fragmento cristalizável (Fc) da IgY também é responsável pela função efetora, como na IgG, esta apresenta carboidratos laterais nos domínios CH2 e CH3, diferindo da IgG que apresenta somente na região CH2 (CHALGHOUMI et al., 2009).

Figura 4. Representação esquemática da IgY de aves e IgG de mamíferos.



Fonte: WARR et al., 1995.

Os vertebrados tem a possibilidade de produzir um grande número de diferentes moléculas de anticorpos, isto ocorre através de um processo de recombinação e expressão dos genes presentes tanto na cadeia leve como na pesada (REYNAUD et al., 1985; PARVARI et

al., 1988). Através dos fragmentos gênicos V, D e J, pertencentes ao conjunto celular, ocorrem rearranjos e mutações responsáveis pelas diferentes especificidades frente aos diferentes antígenos (JANEWAY et al., 2010).

Em mamíferos existe um grande número de segmentos gênicos V, D e J que durante o desenvolvimento inicial se rearranjam e recombina para a formação das regiões variáveis das imunoglobulinas (TIZARD, 2002). Por outro lado, as aves possuem conjunto bem menor. Anticorpos de galinhas apresentam a cadeia leve codificada por somente um gene V e um gene J, além da região constante, já a cadeia pesada apresenta um gene J e outro V e 16 segmentos gênicos D, além da região constante. Esses rearranjos geram uma pequena diversidade nas células B aviárias. As aves atingem a diversidade necessária utilizando sequências de pseudogenes doadores de sequências gênicas, que são inseridos na região V da cadeia pesada e leve em um processo denominado conversão gênica (REYNAUD et al., 1987; REYNAUD, 1989). Outra diferença em relação aos mamíferos no processo de diversidade das imunoglobulinas, é que as aves somente rearranjam suas imunoglobulinas na bursa de Fabricius somente durante a embriogênese, enquanto os mamíferos podem fazê-lo durante toda sua vida de forma contínua (TIZARD, 2002).

1.7 IgY - propriedades físico-químicas

As imunoglobulinas Y apresentam uma boa estabilidade relacionada a processos físicos e químicos, permanecendo estáveis a repetidos processos de congelamento e/ou liofilização (SHIMIZU et al., 1988). Após a postura o ovo pode ser estocado a 4° C por até 6 meses sem perda da atividade da IgY (SCHADE et al., 2000).

Quando conservadas a -20 °C as moléculas de IgY podem permanecer por 12 meses com perda mínima de atividade (SCHADE et al., 2000), mas Olovsson e Larsson (1993) demonstraram que IgY estocadas a 4 °C podem permanecer por anos sem perda de sua atividade. (HATTA et al 1993) demonstraram que IgY sob temperaturas de 60 °C por 3,5 minutos não tem sua atividade imunológica afetada (SHIMIZU et al., 1988), perdendo, entretanto, grande parte de sua atividade após incubação em 70 °C. Segundo Shin et al. (2002) IgY perderam mais de 90% de sua atividade quando submetidas a 80 °C. Estudos demonstram que alguns açúcares podem atuar como protetores em altas temperaturas, diminuindo a perda da atividade de IgY (SHIMIZU et al.,1994; JARADAT e MARQUARDT 2000).

Quanto a sua estabilidade relacionada a pH, as IgY de aves são mais estáveis em condições ácidas do que IgG de mamíferos (SHIMIZU et al., 1992; SHIMIZU 1993;

SHIMIZU et al., 1988). A perda de atividade gerou mudanças na conformação das moléculas e danos na ligação com os antígenos. Sob condições alcalinas, a atividade da IgY foi muito similar a IgG, alterando-se somente em pH 12, quando sua atividade reduziu de forma significativa (SHIMIZU et al., 1992; SHIMIZU et al., 1993; SHIMIZU et al., 1988; HATTA et al., 1993; LEE et al., 2002; SHIN et al., 2002).

A valência da IgY é a mesma que a da IgG de mamíferos (WARR et al., 1995). A IgY é sensível a pepsina, perdendo toda sua atividade (HATTA et al., 1993), demonstrando uma maior sensibilidade a essa protease quando comparada a IgG da espécie bovina (SHIMIZU et al., 1988), sendo, entretanto, resistentes a outras proteases como a tripsina e quimiotripsina (SHIMIZU et al., 1988). A IgY também é relativamente estável a pressão, não havendo inativação até 4.000kg/cm² (SHIMIZU et al., 1994). O ponto isoelétrico de IgY (5,7-7,6) é menor quando comparado ao da IgG (6,1-8,5) (POLSON et al., 1980). O Fc da IgY é a parte mais hidrofóbica da sua estrutura. Em comparação com a IgG de mamíferos a IgY apresenta uma maior hidrofobicidade em sua molécula (DAVALOS-PANTOJA 2000), porém, tem menor habilidade em precipitar antígenos quando comparada a IgG de mamíferos, e melhores resultados de precipitação podem ser obtidos somente aumentando a concentração de sal (SCHADE e HLINAK 1996).

1.8 Galinhas (*Gallus gallus*) utilizadas como animal de experimentação em pesquisas.

A utilização de aves como animais de laboratório ainda é pouco difundida, apesar de apresentar muitas vantagens em alguns casos. Tal fato pode estar relacionado as condições que esses animais precisam durante a experimentação. Para se utilizar aves como animais de experimentação, como para a produção de IgY, as condições de abrigo e de manutenção devem levar em consideração o comportamento típico da espécie. A utilização de gaiolas individuais é mais recomendável, principalmente para o acompanhamento de parâmetros como higiene, identificação dos ovos, avaliação de estresse e efeitos colaterais decorrentes do processo de imunização (SCHADE et al., 2005). Devem-se deixar disponíveis para os animais água e ração a vontade. O contato visual com outros da mesma espécie é muito importante para esses animais (LEENAARS et al., 1999; SCHADE et al., 2000). O local de manutenção deve ser arejado e iluminado, alternando períodos de claro e escuro. Deve ser um local tranquilo e silencioso para que não sejam submetidos a estresses desnecessários que podem influenciar diretamente na saúde das aves, como na queda da postura (LEENAARS et al., 1999).

O uso de animais convencionais ainda é a melhor alternativa quando comparados a animais SPF (*livres de patógenos específicos*), mais onerosos do ponto de vista estrutural e de manutenção. Além disso, a comparação da produção de anticorpos em aves SPF e convencionais, utilizando o mesmo protocolo de imunização, demonstrou ser compatível como os 2 tipos (SCHADE et al., 2005).

1.9 Sistema imune e imunização de aves

O sistema imune das aves consiste em órgãos linfóides primários e secundários. O timo e a bursa de Fabricius são componentes dos órgãos linfóides primários. O baço, a medula óssea, glândula de Harder, tonsilas cecais, os tecidos linfóides associados de mucosa e nódulos linfáticos são componentes dos órgãos linfóides (CARLANDER et al., 1999).

Os nódulos linfáticos estão ausentes na galinha doméstica e no peru (JUNIOR; MACARI, 2000). Como nos mamíferos, o sistema imune aviário também é dividido em dois componentes: o inato não-específico e o adquirido, que se caracteriza pela especificidade, heterogenicidade e memória, que se divide em celular e não-celular (humoral) (SCHADE 2000; CHALGHOUMI et al., 2009). O componente não-celular inclui os anticorpos e as células que os produzem, os linfócitos B. Estes são produzidos na fase embrionária no fígado e na medula óssea, e são diferenciados na Bursa de Fabricius, sendo deslocados para o sangue, fígado, tonsilas, medula, glândula de Harder e timo, gerando respostas com produção de anticorpos depois do quinto dia da exposição a um antígeno externo (CHALGHOUMI et al., 2009).

Nas aves, da mesma forma que nos mamíferos, quando são expostas a um organismo estranho, os macrófagos realizam a fagocitose, digerindo parcialmente moléculas protéicas desse organismo, apresentando em sua superfície um complexo formado por MHC de classe II e um peptídeo, que será transportado por esse macrófago e expostos a linfócitos T (*T-helper*), os quais apresentam receptores específicos ao peptídeo apresentado. Posteriormente, esses linfócitos selecionam linfócitos B, que, uma vez ativados, diferenciam-se em plasmócitos produtores de anticorpos (CHALGHOUMI et al., 2009).

Nas aves são encontradas três classes de imunoglobulinas: IgM, IgA e IgY. A IgM e a IgA são similares as imunoglobulinas de mamíferos quanto a estrutura, peso molecular e mobilidade em um campo elétrico (eletroforese) (CARLANDER, 2002). A IgY, equivalente a IgG de mamíferos, representam cerca de 75% do total de imunoglobulinas das aves (LESLIE, 1973), sendo as de maior predominância no soro e na gema. A IgM é a

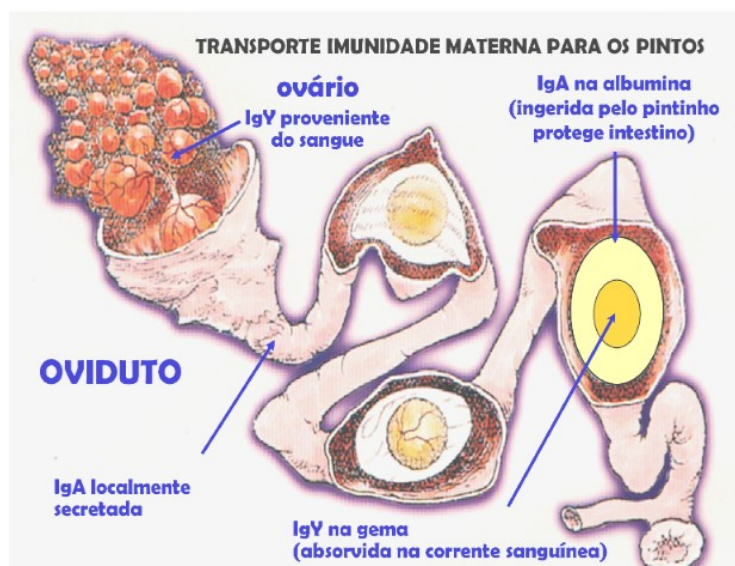
segunda imunoglobulina mais encontrada no soro das aves (KITAGUCHI et al., 2008), podendo ser encontradas tanto no soro como na clara do ovo. A IgA se apresenta tanto da forma dimérica como monomérica, podendo ser encontrada na bile, nas secreções intestinais, nas secreções respiratórias e na parte branca dos ovos (TIZARD, 2002), mas se apresentam somente como traços no soro das aves (KITAGUCHI et al., 2008). Vários estudos demonstram a migração de anticorpos para o ovo, especialmente para a gema.

Durante experimentos a concentração do antígeno costuma variar de 0,1 a 1 mg, podendo chegar em 10 μ g em casos especiais, de acordo com o tipo de adjuvante escolhido. Larsson et al., 1998 estudaram a resposta imunológica em galinhas utilizando pequenas quantidades de antígenos de mamíferos e observaram boa resposta imunológica obtida com a aplicação de 0,1 – 1,0 μ g dos antígenos.

1.10 Formação do ovo e transferência de IgY para a gema

O sistema reprodutivo de uma galinha é constituído por ovário e oviduto. Nas aves domésticas sexualmente maduras, somente o ovário e o oviduto esquerdo são funcionais (CONN, 2008). Os oocistos estão localizados no ovário, onde a gema é formada (JUNIOR; MACARI, 2000). Os constituintes da gema são sintetizados no fígado e transportados para o ovário através do sangue (BURLEY; VADEHRA, 1989), junto com as imunoglobulinas sintetizadas nos órgãos linfáticos (KITAGUCHI et al., 2008). Os oocistos tornam-se folículos após receberem uma cobertura com a camada granular e são ovulados dentro do oviduto, onde recebem o albúmen e a casca. O oviduto é formado pelo infundíbulo, magnum, istimo, útero e vagina (JUNIOR; MACARI, 2000). O processo final de formação da casca ocorre no útero, também chamado de glândula da casca, onde pode permanecer de 18 a 22 horas. Após o processo de formação, o ovo passa pela vagina e alcança a cloaca onde é expelido (BURLEY; VADEHRA, 1989).

Figura 5. Anticorpos materno do ovo para o embrião.



Fonte: Adaptado de West et al., Immunity, 2020

Assim como os mamíferos, as aves transmitem imunidade a seus descendentes transferindo imunoglobulinas do soro para a gema (KOWALCZYK, 1985). Esses anticorpos são transferidos durante a formação do ovo (Figura 5) e constituem fatores de proteção durante todo o desenvolvimento do embrião, o que sugere a ocorrência de imunização passiva (LI X et al., 1998). O trajeto do depósito de imunoglobulinas (Ig) no ovo difere entre as classes de imunoglobulinas. A IgY é o isotipo de imunoglobulina mais predominante na gema do ovo. Esta Ig é secretada pelo ovário da galinha dentro dos óvulos em desenvolvimento (gema de ovo) em diferentes estágios. As galinhas transferem anticorpos maternos para o ovo, depositando os anticorpos (IgY, IgA e IgM) na gema do ovo e albúmen. A IgY é secretada do sangue da ave para a gema, continuamente, através de endocitose, por meio da membrana folicular do ovário para a gema dos oócitos em maturação (STIFANI et al., 1990; MAC LACHLAN et al., 1994; JACOBSEN et al., 1995; VIEIRA et al., 1995; RECHEIS et al., 2005). A passagem de IgY para os óvulos é regulada pelo epitélio folicular, que passa por mudanças morfológicas conforme crescem os óvulos. Este epitélio torna-se mais plano e mais fino no óvulo maior, permitindo a passagem de uma grande quantidade de IgY. A transferência de IgY através do epitélio folicular ovariano atinge o seu máximo 3 a 4 dias antes da ovulação e começa a diminuir devido ao desenvolvimento da membrana vitelínica entre o óvulo e o epitélio folicular do ovário em preparação para a ovulação, sendo que a passagem da IgY do sangue para o oócito perdura por aproximadamente de 3 a 6 dias. (PATTERSON et al., 1962; WOOLLEY; LANDON, 1995). A IgY é transferida por meio de

um receptor específico (FcRY) presente na superfície da membrana do saco vitelínico (MOHAMMED et al., 1998; MORRISON et al., 2001). O Fragmento cristalizável da IgY, região de flexibilidade sem a presença de carboidratos e a região com os domínios CH2 e CH3 são reconhecidos pelo receptor responsável pelo transporte (MORRISON et al., 2001).

Portanto, como uma galinha tem vários folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, a quantidade de IgY transferida para cada um deles não é a mesma. A IgA e IgM são encontradas principalmente no albúmen, onde são transferidas como resultado da secreção mucosa no oviduto mais especificamente no magno.

A IgY é transferida em maior quantidade do soro para gema quando comparada a IgM e a IgA que são transferidas em menor quantidade, por secreção mucosa das células do oviduto, estando presentes somente na parte branca do ovo (ROSE et al., 1974). Esta baixa taxa de transferência pode ser explicada pela facilidade do transporte de imunoglobulinas monoméricas, como a IgY, melhor incorporadas pela membrana folicular. A formação de dímeros e pentâmeros formados pela IgA e IgM respectivamente dificulta essa absorção devido ao tamanho dessas moléculas resultando uma baixa infiltração na membrana folicular (KITAGUCHI et al., 2008).

O desenvolvimento e a produção de anticorpos IgY específicos podem ser alcançados pela imunização de aves poedeiras com o antígeno alvo a partir da primeira semana de postura, produzindo anticorpos com alta avidéz logo após a primeira imunização. O antígeno pode ser apresentado ao sistema imune da ave como estruturas complexas (bactérias, vírus, parasitas etc.) ou simples (proteínas, polissacarídeos e toxinas) (SCHADE et al., 2005).

1.11 Processo de obtenção da IgY

O desenvolvimento e a produção de anticorpos IgY específicos podem ser alcançados por meio da purificação da gema dos ovos de galinhas poedeiras imunizadas com antígenos apropriados. De um modo geral, muitos tipos de antígenos podem ser utilizados para produzir IgY antígeno-específicas tais como proteínas, bactérias, vírus, parasitas, fungos, polipeptídeos, hormônios, toxinas e outros (SCHADE et al., 2005).

Diferentes fatores afetam o sucesso desse processo como a escolha do antígeno e do adjuvante, além da via e do intervalo das inoculações. A toxicidade do antígeno deve ser considerada antes do processo de imunização e a contaminação com produtos químicos, resíduos da preparação ou pH extremos devem ser evitados (LEENAARS et al., 1999). A

concentração do antígeno deve estar combinada com o adjuvante ideal para que as respostas sejam satisfatórias (SCHADE; HLINAK, 1996). Segundo Schade et al. (2005), as doses ideais recomendadas para imunização de galinhas giram em torno de 0,1 a 100 mg de antígeno. Pequenos antígenos como os peptídeos podem ser carregados com proteínas maiores e mais imunogênicas para o sucesso da resposta (SCHADE et al., 2005).

O tipo e a qualidade do adjuvante são fatores de importância para determinar a resposta ideal que gere altos níveis de anticorpos tanto no soro quanto na gema (SCHADE et al., 2000). O Adjuvante Completo de Freund (ACF) é o mais efetivo, entretanto gera efeitos colaterais como danos teciduais, inflamação e dor, gerando estresse ao animal devido a imunização. A utilização do Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) é uma alternativa, pois ele causa menos efeitos colaterais, entretanto sua resposta é menos eficiente (SCHADE; HLINAK 1996; SCHADE et al., 2000; SCHADE et al., 2005). Para que isso seja evitado, a combinação do ACF na primeira imunização e do AIF nas subsequentes é preferível para evitar efeitos adversos e induzir níveis elevados de IgY (KAPOOR et al., 2000; LI et al., 2006; CHALGHOUMI et al., 2009). Outros tipos de adjuvantes foram estudados em alternativa ao ACF e AIF na imunização de aves (BOLLEN et al., 1996; OLBRICH et al., 2002; LEVESQUE et al., 2007; de PAULA et al., 2011).

A via de imunização mais utilizada em aves para produção de IgY é a intramuscular (SCHADE et al., 2005) por ser considerada uma das mais seguras (LEENAARS et al., 1999). Também são descritas a utilização das vias subcutânea e endovenosa, somente quando antígenos são administrados sem adjuvantes (SCHADE; HLINAK, 1996; SCHADE et al., 2000; SCHADE et al., 2005). O volume do inóculo utilizado para aves não pode ultrapassar 0,5 mL em cada ponto a ser utilizado (LEENAARS et al., 1999) e preferencialmente deve ser dividido em vários pontos para evitar danos teciduais (SCHADE; HLINAK, 1996). O intervalo entre as imunizações depende da resposta individual e tipo de antígeno e adjuvante utilizados. Normalmente para aves utiliza-se 10 dias de intervalo da primeira imunização para as subsequentes. Entretanto, a recomendação é que este intervalo seja de 4 semanas para que não haja imunodepressão (SCHADE et al., 2000; SCHADE et al., 2005).

1.12 Vantagens da utilização de IgY

A utilização de IgY provindas de galinhas poedeiras apresenta grandes vantagens em relação a utilização de IgG de mamíferos. Entre elas podemos destacar:

A) A IgY não se liga a receptores Fc de mamíferos

Os receptores Fc de mamíferos são encontrados em células sanguíneas (JANEWAY; WALPORT, 2010). A IgG de mamíferos tem a capacidade de ligação a esses receptores, o que pode gerar problemas na interpretação de testes imunológicos (CARLANDER et al., 2000). A interação da IgG com receptores Fc pode causar ativação celular e mudança das proteínas de superfície, o que pode gerar problemas de interpretação quando imunoglobulinas de mamíferos são utilizadas na citometria de fluxo (CALZADO et al., 2007). Já a IgY não se liga a esse receptor podendo ser utilizada como alternativa para resolver esse problema (LARSSON et al., 1993).

B) A IgY não ativa o complemento e não se liga ao fator reumatóide

A capacidade da IgG se ligar ao sistema complemento pode influenciar os resultados de ELISA, uma vez que a cascata ativada pode levar o C4 a se ligar com a região Fab da IgG de mamíferos. Essa ligação pode interferir na ligação ao antígeno (CARLANDER et al., 2000). A IgY é capaz de ativar o complemento de aves, mas não de mamíferos (LARSSON et al., 1993), sendo isso muitas vezes considerado uma grande vantagem.

C) As IgY não reage com proteína G de *Streptococcus* e nem a proteína A de *Staphylococcus*.

Essas proteínas são utilizadas como imunoabsorventes em ensaios imunológicos devido a habilidade de se ligarem a fração Fc das IgG de mamíferos. Podem ser encontradas como contaminantes em amostras bacterianas, ligando-se aos anticorpos detectores com especificidade e causando resultados falso positivos. (AKITA; NAKAI, 1993; HANSEN et al., 1998). Foi demonstrado que a IgY não reage com a proteína A ou com a proteína G, não interferindo, portanto, em testes imunológicos onde estas proteínas estão presentes (HOFFMAN et al., 1996).

D) A distância filogenética entre aves e mamíferos

Devido a esta característica, as galinhas são capazes de produzir anticorpos específicos contra antígenos de mamíferos altamente conservados, diferentemente de coelhos (SCHADE; HLINAK, 1996). Os antígenos conservados não geram resposta em mamíferos por permanecem "mascarados" (reconhecidos como próprios) para seu sistema imune causando uma resposta fraca ou ausente (SCHADE et al., 2000). Essa distância contribui ainda para as diferentes especificidades de anticorpos entre essas duas espécies (SCHADE et al., 2005). O sistema imune das aves reconhece mais facilmente os epítomos de proteínas de mamíferos. Além disso, as aves são capazes de detectar epítomos diferentes dos detectados por mamíferos (NARAT, 2003). A IgY é capaz de reconhecer epítomos de forma mais efetiva

quando proteínas de mamíferos são utilizadas como antígenos (SVENDSEN et al., 1996), não gerando reações cruzadas entre antígeno-anticorpo, fenômeno frequentemente descrito nas imunoglobulinas produzidas por mamíferos (DIAS da SILVA; TAMBOURGI, 2010).

E) Vantagens econômicas e operacionais

Uma das principais vantagens econômicas e operacionais está relacionada à sua produção, que é contínua e em grande quantidade, durante todo o período de postura (SCHADE et al., 2000), aproximadamente dois anos de postura para uma galinha (PAULY et al., 2009). Destaca-se ainda, a maior quantidade de anticorpos produzidos por galinhas imunizadas em comparação aos mamíferos de pequeno porte, como o coelho (SVENDSEN et al., 1996; CHACANA et al., 2004; SCHADE et al., 2005; PAULY et al., 2009; MATHEIS; SCHADE, 2011), comparando-se a produção de anticorpos em mamíferos maiores como cabras e ovelhas (SCHADE et al., 2005).

Uma galinha produz de 5 a 7 ovos por semana, podendo chegar a produzir 20 g de IgY/ano, com 1-10% de IgY antígeno específicas (MINE; KOVACS-NOLAN, 2002; PAULY et al., 2009), comparativamente, um coelho, no mesmo período, pode chegar a produzir apenas 3 g de IgG (MATHEIS; SCHADE, 2011). Além de produzir IgY rapidamente e em grandes quantidades, galinhas mantêm altos níveis de anticorpos específicos por um longo período (POLSON et al., 1980). Mais ainda, é bastante vantajosa a menor quantidade de antígeno requerido para imunização, devido ao baixo peso corporal desses animais, reduzindo ainda mais o custo da produção (LARSSON et al., 1998). Outra vantagem que se pode destacar na utilização de galinhas como animais de experimentação é a facilidade de manejo (criação e nutrição) em condições laboratoriais, além de um custo mais baixo de manutenção quando comparado com os mamíferos normalmente utilizados, principalmente os de grande porte, diminuindo, assim, os custos com mão de obra (SCHADE et al., 2000).

F) As vantagens éticas, relacionadas ao bem estar animal

A utilização de galinhas para produção de anticorpos em alternativa a mamíferos na experimentação animal apresenta também vantagens éticas, enquadrando-se no princípio dos 3Rs (RUSSEL; BURCH, 1959). A substituição (*replacement*) que se traduz em substituir mamíferos por aves. A redução (*reduction*) que é empregada quando uma quantidade mínima de galinhas é utilizada para produzir uma grande quantidade de anticorpos, e o refinamento (*refinement*) empregado quando as gemas são utilizadas como fonte de anticorpos suprimindo a invasividade de procedimentos aplicados (SCHADE; HLINAK, 1996), além de descartar a

eutanásia comumente realizada quando mamíferos são utilizados como doadores de anticorpos (SCHADE et al., 2000).

Figura 6. Comparação entre a produção de anticorpos de mamíferos e aves.

Espécie	Coelho	Galinha
Número de animais	1	1
Amostra	Coleta de sangue (20 mL/semana)	Coleta diária de ovos
Volume da amostra (em 2 semanas)	40 mL de sangue	14 ovos = 210 mL de gemas ^a
Anticorpos totais	200 mg	1120 mg ^b
Anticorpos específicos	5% (10 mg)	2-10% (22.41 mg)
Coelho/galinha- total ^c	5-6	1
Coelho/galinha-específicos ^d	2-11	1
Presença de outras Ig	IgM, IgA, IgE	Nenhuma

a Volume médio por gema igual a 15mL.

b Quantidade média de IgY igual a 80 mg por grama.

c Número de coelhos que produzem igual quantidade de anticorpos por galinha em 2 semanas.

d Número de coelhos que produzem igual quantidade de anticorpos específicos por galinha em 2 semanas.

Fonte: NARAT, 2003.

1.13 Métodos de isolamento e purificação de IgY

A purificação de IgY requer a remoção de toda a parte lipoprotéica e separação da fração solúvel em água, sendo que uma etapa adicional é necessária para separação das IgY (γ livetinas) das outras livetinas (α e β livetinas) e das lipoproteínas de baixa densidade (POLSON et al., 1980). Apesar de todas as vantagens da utilização de IgY em pesquisas, os métodos de isolamento e purificação são, muitas vezes, considerados complicados devido a limitações existentes nos protocolos (AKERSTROM et al., 1985; CAMENISCH et al., 1999) e principalmente devido a alta concentração de lipídios na gema do ovo (POLSON et al., 1980). As proteínas A e G comumente empregadas para a purificação de anticorpos policlonais de mamíferos, são incapazes de ligarem-se a IgY devido uma diferença na região Fc destes anticorpos (AKERSTROM et al., 1985; CAMENISCH et al., 1999).

Em geral, os métodos de isolamento e purificação de IgY podem ser divididos em três grupos: os de precipitação; os cromatográficos e os de ultrafiltração (PAULY et al., 2011). Os métodos de precipitação envolvem a utilização de ácido caprílico (SVENDSEN et

al., 1995), sulfato de sódio (JENSENIUS et al 1981), sulfato de amônio (JENSENIUS et al., 1981; SVENDSEN et al., 1995), carragenina (CHANG et al., 2000) e polietilenoglicol (PEG) (POLSON et al., 1980; JENSENIUS et al., 1981; CHANG et al., 2000; POLSON et al., 1985). Os métodos cromatográficos podem incluir cromatografias de afinidade, cromatografias de troca iônica, cromatografias de interação hidrofóbica, cromatografias de interação tiofílica e cromatografias de exclusão molecular (gel filtração) (SCHADE et al., 2005). A utilização de solventes orgânicos como o clorofórmio não é apropriada, já que este é um agente desnaturante, tornando não-aproveitáveis a utilização dos grânulos resultantes da delipidação, além de ser um produto tóxico para o manipulador. Para o isolamento e a purificação de IgY esses métodos podem ser utilizados de forma isolada ou em combinação de acordo com critérios como quantidade de anticorpo isolado, pureza e atividade biológica (SCHADE et al., 2000), escala de produção (laboratorial ou industrial), custo, tecnologia disponível no local e impacto ambiental (SCHADE et al., 2005).

A precipitação com PEG é bastante efetiva para purificação de quantidades consideráveis de anticorpo. Esse método é de fácil execução, apesar de custo não muito baixo (PAULY et al., 2009; PAULY et al., 2011; POLSON et al., 1980; POLSON et al., 1985).

Muitos estudos utilizam a cromatografia de afinidade em apoio aos principais métodos de isolamento de IgY (CHUANJING et al., 2003; GEE et al., 2003; SANTORO et al., 2004; BRUNDA et al., 2006; GANDHI et al., 2009; MATHEIS; SCHADE, 2011). A purificação por adsorção tiofílica separa a IgY da matriz que não demonstra propriedades tiofílicas, retirando de 90-95% da matriz protéica (BAUMGARTNER et al., 2004). Esse tipo de purificação atualmente é muito utilizada e demonstra ter uma excelente efetividade na retirada de lipídeos não extraídos pela maioria dos processos de isolamento, inclusive o PEG (GANDHI et al., 2009; MATHEIS; SCHADE, 2011). Sua utilização torna-se necessária principalmente quando se quer utilizar as IgY como anticorpos secundários, com a necessidade de conjugação dessa molécula a uma enzima ou fluorocromo, pois os interferentes presentes atuam dificultando o processo de reconhecimento da IgY ao antígeno contra a qual foi produzida, além de interferir diretamente em processos de conjugação com diferentes tipos de enzimas (SCHADE et al., 2000). Para isolar IgY das gemas a maioria dos métodos utilizam Sulfato de Amônio ou PEG. Nos trabalhos disponíveis na literatura predomina a metodologia, as vezes com adaptações, descrita por Akita e Nakai (1992). Conforme Mumene (2004), a técnica consiste na diluição da gema, com água ácida (pH 2,5), na relação de 1:10, seguido do ajuste do pH para 5,0. A solução é mantida durante uma noite a 4 °C, e posteriormente centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos. No sobrenadante,

separado do precipitado, se adiciona 19% de Sulfato de Amônio e se mantém mais uma noite a 4 °C. O precipitado contendo IgY, obtido após a segunda centrifugação da solução durante 20 minutos a 10.000 x g, é dissolvido em PBS ou solução salina, para posterior armazenamento e uso.

1.14 Aplicação da IgY em Biotecnologia

Nas últimas décadas a comunidade científica tem demonstrado grande interesse pela IgY sendo utilizada em várias pesquisas básicas e aplicadas (BEN et al., 1969). Na década de 1980 ocorreu um aumento nas aplicações comerciais de IgY. O grupo do *European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)*, recomendou em 1996 o uso de IgY como alternativa ao uso de IgG de mamíferos (SCHADE, 1996). Anticorpos provenientes de aves podem ser produzidos contra inúmeros tipos de antígenos e aplicados em diferentes métodos para vários propósitos (NARAT, 2003).

A chamada tecnologia IgY foi aprovada em 1999 como método alternativo de melhorar o bem estar animal, pelo *Office Vétérinaire Federal* na Suíça. Atualmente a IgY vem sendo utilizada com vantagens tanto na pesquisa científica de onde é objeto de estudo devido ao seu potencial de utilização, na imunoterapia, no imunodiagnóstico, quanto na forma comercial (SCHADE, 2000).

IgY de aves são excelentes imunorreagentes devido suas diferentes vantagens frente as IgG de mamíferos. Além disso, já está demonstrado que podem ser utilizadas da mesma maneira que as IgG de mamíferos em testes de imunodiagnóstico (SCHADE et al., 2000). Muitas publicações descrevem a IgY como um tipo de imunorreagente com sensibilidade e especificidade revelando, na comparação com imunoglobulinas de mamíferos, um desempenho igual ou superior (SCHADE et al., 2000; TINI et al., 2002; CHALGHOUMI et al., 2009; DIAS da SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A produção de anticorpos monoclonais constitui ferramenta avançada na tecnologia de IgY para imunodiagnóstico (SCHADE et al., 2005). Essa técnica foi desenvolvida originariamente para mamíferos, mas também é utilizada com sucesso em células de galinhas (NARAT, 2003). Anticorpos podem ser produzidos, com essa tecnologia, para diferentes antígenos (NISHINAKA et al., 1996; SASAI et al., 1996; MATSUSHITA et al., 1998; MATSUDA et al., 1999). Uma das únicas limitações da utilização da IgY em imunodiagnóstico é a pouca habilidade dessas moléculas em precipitar antígenos. Entretanto, foi descrito que essa condição pode ser melhorada utilizando-se tampões com altas

concentrações de cloreto de sódio tais como 1,5 M com 5% de Polietilenoglicol (SCHADE et al., 2000).

A IgY pode ser utilizada como alimento funcional na imunização passiva, sendo utilizada para o tratamento e profilaxia de diferentes doenças entéricas tanto na medicina humana como na veterinária (SCHADE et al., 2005), para diversos microrganismos como *Salmonella. sp* (RAHIMI et al., 2007), *Campylobacter jejuni* (TSUBOKURA et al., 1997), *Escherichia coli* (WIEDEMANN et al., 1991; IKEMORI et al., 1992; O'FARRELLY et al., 1992), Rotavirus (HATTA et al., 1993), Coronavírus (IKEMORI et al., 1997), *Helicobacter pylori* (SHIN et al., 2002), *Streptococcus mutans* (Hatta et al., 1997). A IgY é resistente a barreira gástrica (LEE et al., 2002) e é empregada no estudo da inibição de xenotransplantes, demonstrando resultados satisfatórios de inibição sem alteração da forma e função celular tanto *in vitro* (FRYER et al., 1999) como *in vivo* (WALSH et al., 2000).

Neste contexto, constatamos que a tecnologia de produção e aplicação da IgY pode ser empregada em inúmeras áreas da biotecnologia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo produzir anticorpos capazes de reconhecer a lectina de sementes de *Vatairea guianensis* (VGL) em galinhas poedeiras, visando gerar fluxos de trabalho para produção de novos insumos biotecnológicos para o estudo de lectinas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Imunizar galinhas poedeiras com diferentes quantidades (200 e 400µg) da lectinaa extraída de sementes de *Vatairea guianensis* (VGL);
- ✓ Coletar ovos enriquecidos com a IgY de interesse;
- ✓ Purificar a fração proteica (0-30%) da gema dos ovos das galinhas imunizadas;
- ✓ Otimizar o processo de purificação de anticorpos IgY;
- ✓ Avaliar a especificidade do anticorpo anti-VGL através de *Western blotting*;
- ✓ Disponibilizar e aplicar os anticorpos produzidos e purificados como insumos biotecnológicos para o estudo de lectinas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e manutenção das aves

Foram adquiridas galinhas poedeiras da linhagem *Dekalb White* na granja Regina localizada no município de Eusébio, próximo a cidade de Fortaleza no estado do Ceará. As aves tinham vinte e duas semanas de vida e foram vacinadas contra as principais doenças recorrentes em aves de granja. Os animais foram alojados em galpão apropriado no setor de avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (espaço gentilmente cedido pelo Prof. Ednardo de Freitas) e transferidas no início da postura para gaiolas de contenção, apropriadas para galinhas poedeiras com água e ração *ad libitum*. Os experimentos se iniciaram com as aves por volta da vigésima quarta semana de vida. Neste período os animais pesavam, em média, 1,8kg e alcançaram um nível médio de postura de 6 ovos por semana por ave. As gaiolas de alojamento eram suspensas e tinham capacidade para duas aves e foram limpas diariamente. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFC e seguiu o guia de cuidado e uso de animais de laboratório da National Academy of Sciences (8ª edição, 2011).

3.2 Definição dos grupos amostrais e preparação do antígeno para produção de IgY anti-VGL (Imunização das aves)

Os grupos amostrais foram compostos por nove aves (3 grupos de 3 aves cada um) alojadas em gaiolas apropriadas (Figura 7).

As galinhas foram imunizadas com duas quantidades (200 e 400 µg/mL) de lectina em cada um dos grupos, seguindo esquema pre-estabelecido e descrito adiante. No grupo controle, foi administrado NaCl 0,15 M nos mesmos dias das imunizações.

Figura 7. Aves de postura mantidas em gaiolas apropriadas durante o experimento.



Fonte: arquivo pessoal.

A lectina de *Vatairea guianensis* (VGL) foi produzida e fornecida pelo Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), tendo seu controle de qualidade avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). A lectina utilizada apresentou sempre o mesmo padrão eletroforético, caracterizado por uma banda principal de massa molecular aparente de 29 kDa, correspondendo a cadeia α e de duas bandas secundárias de massas moleculares aparentes de 17 e 13 kDa, correspondendo aos fragmentos α e γ , respectivamente. As galinhas foram inoculadas em quatro pontos do músculo peitoral, em intervalos de dez dias com a lectina alvo. Esse processo foi repetido por dez vezes, perfazendo 100 dias de experimento. Em cada imunização foi administrado por via intramuscular profunda um volume de 1 mL. As aves de cada um dos grupos amostrais receberam 200 ou 400 μ g da proteína isolada (VGL) em cada imunização.

Na primeira inoculação foi administrada a proteína, diluída em 0,5mL de NaCl 0,15M mais 0,5 mL de adjuvante completo de Freund. Nas imunizações seguintes (reforços) foram administradas de 10 em 10 dias, as proteínas diluídas em 1mL de NaCl 0,15 M. Toda a preparação do material a ser inoculado ocorreu no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab/DBBM/UFC).

As proteínas foram solubilizadas imediatamente antes da inoculação. O procedimento de inoculação foi realizado utilizando-se seringas de 1mL com agulha de calibre 25x8mm (Figura 8).

Figura 8. Imunização de uma ave com VGL.



Fonte: arquivo pessoal.

3.3 Coleta dos ovos

Sete dias antes do início das inoculações, os ovos, tanto dos animais sensibilizados com a lectina (VGL) como dos animais do grupo controle (não sensibilizados), começaram a ser coletados de forma diária após a postura natural das aves e se estendeu até duas semanas após a última imunização (MUMENE, 2004). Foram identificados quanto a data e grupo amostral e trabalhados imediatamente ou armazenados em geladeira para posterior manipulação. Para realizar a purificação da fração proteica que continha as imunoglobulinas Y (IgY), os ovos dos três grupos coletados ao longo de sete dias foram considerados uma amostra de cada grupo, e foi definido que o *pool* das gemas de cada amostra seria submetido a purificação das IgY.

3.4 Purificação da fração proteica contendo IgY

Os ovos armazenados em geladeira foram utilizados para o isolamento das imunoglobulinas. Para este processo, a gema foi separada da clara, lavada com água destilada e envolvida em papel toalha a fim de se remover o máximo de albumina aderida na superfície da gema. Posteriormente, a membrana da gema foi perfurada e seu conteúdo transferido para um béquer. A gema foi diluída em água ultrapura na proporção de 1:10 e homogeneizada. A mistura foi acidificada com ácido clorídrico 0,3 M até que o pH alcançasse 5,0 para precipitar os lipídeos indesejáveis. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, a 4 °C durante 30 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi precipitado com sulfato

de amônio para se obter a fração 0 – 30%. Para a purificação, foi utilizado a coluna HiTrap® IGY Purification (GE Healthcare®). Para isso, a fração F 0-30 foi aplicada em um matriz previamente equilibrada (com fosfato de sódio 20 mM com sulfato de fosfato 0,5 M pH 7,5). As proteínas não retidas foram eluídas com a solução de equilíbrio enquanto a proteína retida foi removida da matriz com tampão de fosfato de sódio 20 mM pH 7,5. Frações de 1 mL foram coletadas e monitoradas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm. As frações contendo IgY foram reunidas, dialisadas contra água ultrapura e secas por congelamento para uso posterior.

3.5 Quantificação de proteínas

Após o término da extração das imunoglobulinas IgY totais, a concentração proteica foi estimada em todas as frações por meio do método de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina como padrão.

3.6 Western Blot

Para imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente foi realizado ensaio de *Western blot* a fim de avaliar a especificidade do anticorpo policlonal IgY anti-VGL. Para avaliar a especificidade do anticorpo policlonal anti-VGL, foi realizado um ensaio de western *blotting* (MAHMOOD e YANG, 2012). Para isso, a lectina de *Vatairea guianensis* foi separada em gel SDS-PAGE 12%. Para monitorar a corrida eletroforética e a transferência de proteínas, o marcador molecular TrueColor High Range Protein Marker S2600 (Sinapse®) foi usado. A corrida eletroforética foi realizada em condições padrão, de acordo com o método anteriormente descrito. Em seguida, as proteínas adsorvidas no gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (GE Healthcare®) por meio do SE300 miniVE Blot System (Hofer®) com tensão de 25 V e corrente a 300 mA por 3 h. A solução de Tris-HCl 25 mM, glicina 183 mM e metanol 20% foi usada como a solução de transferência. Tanto o gel de eletroforese, quanto a membrana e as demais partes do sistema de transferência, foram previamente condicionados com esta mesma solução. Após a transferência, a membrana foi incubada por 16 h com tampão TTBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e Tween 20 1%) mais leite desnatado a 0,5% para bloquear locais de interações não específicas. Em seguida, a membrana foi incubada por uma hora com o anticorpo policlonal anti-VGL na proporção de 1: 100 em

solução contendo TTBS e 0,5% de leite desnatado. Após a incubação, foram realizadas três lavagens da membrana (de 15 minutos cada) com TTBS para, então, proceder-se a segunda incubação com o anticorpo secundário. O ensaio aplicou anticorpo anti-IGY de galinha (IGG) conjugado com fosfatase alcalina (A9171, Merck®) em uma proporção de 1: 1000 com uma hora de incubação em TTBS com 0,5% leite desnatado. Após a incubação, três lavagens da membrana foram realizadas com TTBS, seguido do desenvolvimento com IP® / NBT (B5655, Merck®). A marcação da membrana com a lectina de *Vatairea guianensis* indica a especificidade do anticorpo anti-VGL.

4 RESULTADOS

4.1 Manutenção e imunização das aves

As galinhas foram mantidas em gaiolas, conforme descrito anteriormente. As aves permaneceram sadias durante todo o processo de imunização, não apresentando nenhuma anormalidade em seu desenvolvimento e postura.

Os animais foram imunizados conforme descrito no tópico 3.2 e de forma frequente examinava-se os locais de aplicação das injeções com o antígeno e não foram observados sinais de dor, desconforto ou edema. O curto tempo de manipulação no processo de inoculação (5 minutos por ave), bem como o comportamento calmo do manipulador durante a diligência, leva a crer que as aves foram expostas a baixos níveis de estresse. Tal fato pode ser comprovado comparando a postura dos diferentes grupos (Tabela 2).

4.2 Postura dos ovos

Foram coletados durante as 15 semanas do experimento de forma diária os ovos de cada um dos grupos experimentais. A produção de ovos se manteve estável durante todo o período com média de 19 ovos por grupo/semana (Tabela 2). Para cada semana foram selecionados aleatoriamente 3 ovos para a purificação da IgY. Essas três gemas dos ovos juntas foram denominadas *pool* de gemas. Tal procedimento se repetiu para cada semana em cada grupo.

Tabela 2. Número de ovos coletados durante as quinze semanas do experimento. Controle – grupo controle, imunizado com solução salina; VGL 200 µg – grupo imunizado com 200 µg de VGL por imunização; VGL 400 µg – grupo imunizado com 400 µg de VGL por imunização.

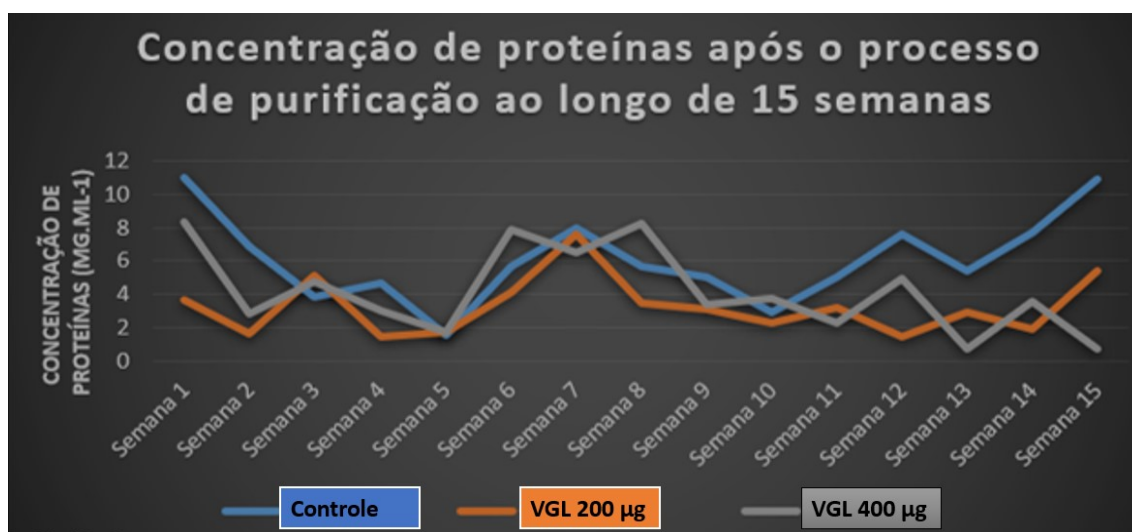
Semanas de experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total
Controle	17	19	19	18	20	19	21	19	21	20	19	20	18	20	20	290
VGL 200µg	18	17	20	18	19	19	20	20	19	18	21	18	21	20	19	287
VGL 400µg	19	21	19	20	18	20	21	20	19	20	21	20	18	18	20	294

4.3 Quantificação de proteínas

Durante as 15 semanas do experimento foi realizada a quantificação de proteínas solúveis totais, (Bradford, 1976) para se adquirir dados sobre a resposta imune das galinhas dos três diferentes grupos. Os resultados estão apresentados na figura 9. Os resultados obtidos na leitura de Bradford são comparativos das aves imunizadas nos dois grupos, VGL 200µg e VGL 400µg nas semanas de 1 a 15.

A concentração de proteínas após a precipitação do *pool* de gemas com sulfato de amônio (fração 0-30%) variou ao longo das semanas de experimento entre 11 e 0,6mg/mL nos grupos estudados. Foi notada uma aparente queda na concentração de proteínas na quinta semana em todos os grupos. Na sexta, sétima e na oitava semana a concentração protéica aumentou, seguida de uma nova baixa nas semanas subsequentes (Figura 9).

Figura 9. Concentração proteica ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) após o processo de purificação por precipitação por sulfato de amônio de gemas de ovos de galinhas imunizadas com VGL a 200 e 400 µg ao longo de 15 semanas. As aves do grupo controle foram imunizadas com solução salina.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.4 Purificação de IgY anti-VGL

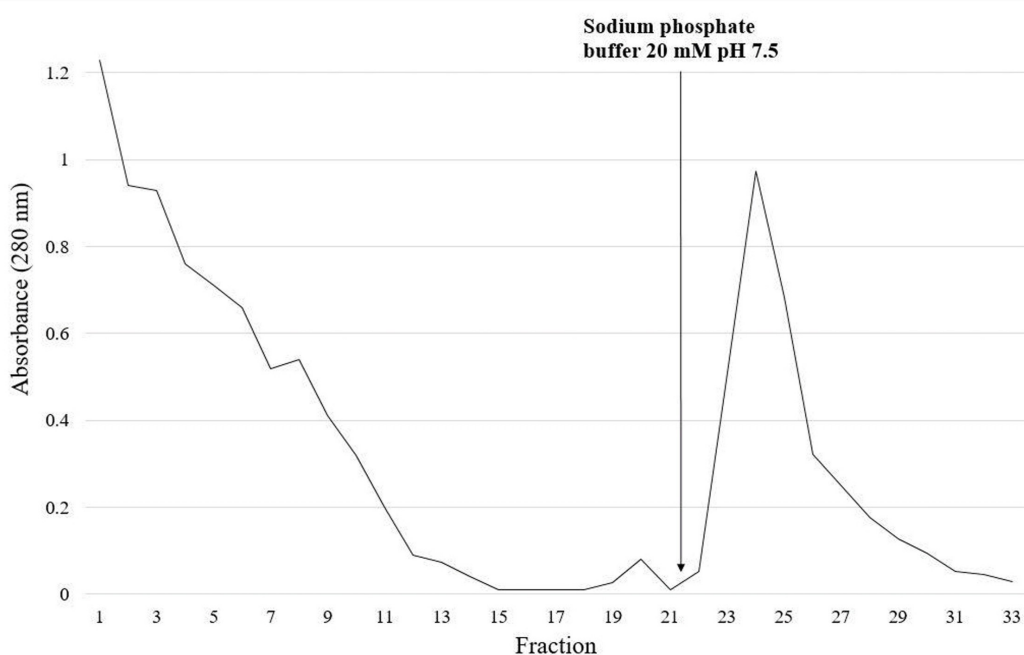
Para isolar IgY das gemas de ovos vários processos são avaliados, e podem ser usados em combinação, de acordo com a quantidade, pureza e atividade biológica desejada. O início de todo o processo de extração se dá pela separação da gema e da clara.

Em geral, estes métodos podem ser divididos em três grupos principais:

1. Métodos de precipitação: Envolvendo sulfato de amônio e sódio, polietilenoglicol (PEG) ácido caprílico e carragenana;
2. Métodos cromatográficos: Cromatografia de afinidade, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação tiofílica e cromatografia de gel filtração;
3. Ultrafiltração.

Neste trabalho, a IgY anti-VGL produzida, tanto do grupo administrado com 200 μg como do grupo administrado com 400 μg , foram purificadas em duas etapas a partir das gemas dos ovos, a primeira etapa consistiu na precipitação de sulfato de amônio seguida de cromatografia de afinidade, na qual o anticorpo foi retido na matriz e eluído com tampão fosfato como representado na figura 10 referente ao grupo administrado com 400 μg de lectinas.

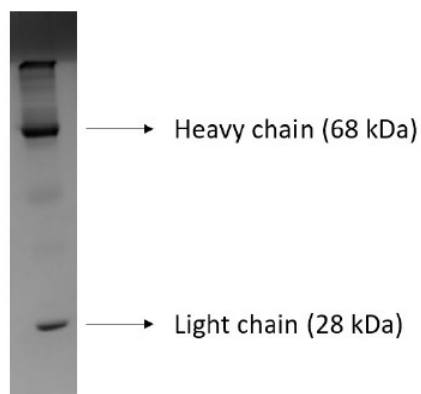
Figura 10. Cromatograma da purificação de IgY em matrix *HiTrap® IGY Purification*.



Fonte: Arquivo pessoal.

O conteúdo de proteínas solúveis era cerca de 8 mg/mL. O SDS-PAGE apresentou 2 bandas correspondentes a 68 kDa e 28 kDa, indicando a pureza da preparação da IgY anti-VGL referente ao grupo em que foi administrado 400µg de lectina VGL (Figura 11).

Figura 11. SDS-PAGE da amostra de IgY purificada em cromatografia de afinidade.



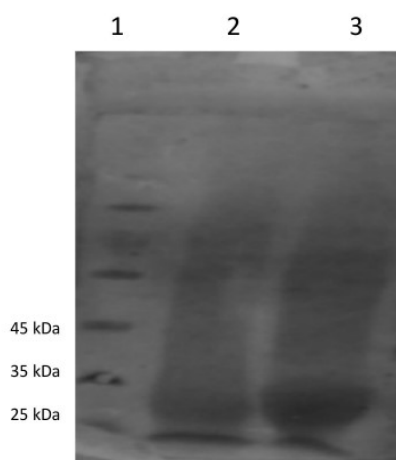
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Avaliação da especificidade do anticorpo anti-VGL por immunoblotting

A fim de avaliar a especificidade do anticorpo policlonal anti-VGL, foram realizados ensaios de *Western blot*, tanto para o grupo administrado com 200 como para o grupo administrado com 400µg da lectina VGL. A lectina de *Vatairea guianensis* (VGL) foi separada através de um gel de SDS-PAGE 12 %.

A marcação da membrana referente a lectina de *Vatairea guianensis* (VGL) indicou a especificidade do anticorpo anti-VGL apenas no grupo administrado com 400µg da lectina VGL. Ou seja, os resultados de *western blotting* demonstraram a especificidade do anticorpo policlonal anti-VGL IgY referente ao grupo que recebeu a maior concentração da lectina (Figura 12).

Figura 12. Resultado do teste de *Western blotting* indicando a capacidade do IgY produzido em reconhecer VGL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo produziu e purificou anticorpos da classe IgY contra a lectina extraída de sementes de *Vatairea guianensis* (VGL). Para tanto, a proteína em questão foi utilizada como antígeno para desafiar galinhas poedeiras. As galinhas utilizadas foram da linhagem *Dekalb White* e os anticorpos IgY policlonais anti-VGL extraído da gema dos ovos.

LI *et al.* (1998) realizaram um estudo comparativo entre galinhas brancas da linhagem *White Leghorn* e galinhas vermelhas da linhagem *Rhode Island Red* para a produção de anticorpos IgY específicos anti-albumina sérica bovina (BSA). Os autores demonstraram que a concentração de proteínas e a quantidade de anticorpos anti-BSA, para cada mL de gema pura, foi similar nas duas linhagens.

As aves utilizadas permaneceram sadias durante todo o processo de imunização, não apresentando nenhuma anormalidade em seu desenvolvimento. O curto tempo de manipulação dos animais durante o processo de inoculação (5 minutos por ave) causaram nos animais baixos níveis de estresse e comportamento calmo durante os procedimentos.

5.1 Imunização das aves

As galinhas podem ser imunizadas através de diferentes rotas dependendo do protocolo de imunização (DIAS da SILVA; TAMBOURGI, 2010). Contudo, para a produção

de IgY policlonais, na maior parte das vezes, são imunizadas por via intramuscular com antígenos protéicos e adjuvantes de Freund (SHADE et al., 1996; ARAÚJO et al., 2010).

Nesse estudo, as galinhas foram imunizadas através da via intramuscular o que, segundo Wooley e Landon (1995), resulta em altos níveis de anticorpos 28 dias após a imunização. Além disso, o anticorpo resultante pode apresentar uma especificidade 10 vezes maior quando comparado com galinhas imunizadas com o mesmo antígeno pela via subcutânea. Mais ainda, galinhas imunizadas pela via intramuscular continuam produzindo anticorpos específicos durante mais de 200 dias (HORTON et al., 1984). De igual modo, galinhas podem tolerar o uso de adjuvantes imunológicos comuns (AKITA; NAKAI, 1993), como o adjuvante oleoso utilizado nesse estudo.

5.2 Capacidade de postura das aves

Normalmente, a capacidade de postura da galinha é pouco afetada pela injeção do antígeno (SCHADE et al., 2005; de PAULA et al., 2011; MATHEIS; SCHADE, 2011). Por outro lado, alguns autores relatam um efeito colateral frequente em galinhas, que é a queda transitória na produção de ovos durante o período de imunizações (HATTA et al., 1993; SCHWARZKOPF; THIELE, 1996; CHALGHOUMI et al., 2008). A distribuição do inóculo em locais diferentes reduz a inflamação local e pode evitar a redução na produção de ovos (SCHWARZKOPF; THIELE, 1996) possivelmente pela divisão do processo inflamatório em vários pontos sendo menos agressivo para as aves.

As reações inflamatórias locais são uma preocupação, embora nem sempre sejam observadas em galinhas. Os resultados demonstram que essas reações não foram perceptíveis no experimento conduzido. Esse fato se deve, possivelmente, pela baixa concentração do antígeno e pela sua aplicação em vários pontos do músculo peitoral. Além disso, não foi notada queda significativa na postura dos ovos.

5.3 Tempo de resposta ao antígeno

A passagem transovariana da IgY leva aproximadamente 5 dias (MOHAMED et al., 1998). A meia-vida da IgY circulante em aves adultas é aproximadamente de 36 a 65 horas (PATTERSON et al., 1962). Isto é muito mais curto do que a meia-vida da IgG de ovinos, a qual é de aproximadamente 15 dias (WOOLEY et al., 1995).

De acordo com vários autores, anticorpos específicos do soro são transportados para a gema com um atraso de 5-6 dias (PATTERSON et al., 1962) ou 3-4 dias (WOOLEY et al., 1995). O retardo pode estar envolvido com ovos submetidos ao seu processamento final, durante o qual a IgY é transferida para a gema junto com outras proteínas selecionadas (PATTERSON et al., 1962). A quantidade de IgY transferida parece ser independente do tamanho do ovo (DOHMS et al., 1978; BOLLEN et al., 1997).

5.4 Quantidade de IgY na gema

A quantidade de IgY produzida por uma galinha pode ser de 20 a 40 g por ano (SCHADE et al., 2005). Segundo Carlander (2002), a concentração de IgY nas gemas dos ovos é constante e é possível obter cerca de 100mg de IgY purificada em um único ovo. A produtividade de anticorpos IgY em aves pode ser de 5 a 10 vezes maior que a produtividade de IgG em coelhos (200mg IgG/ 40mL sangue) (SCHADE et al., 2001). Dentro desta quantidade de IgY produzida, apenas cerca de 3 a 3,2% dos anticorpos são específicos aos antígenos administrados (AKITA; LI CHAN, 1998). Acredita-se que uma quantidade relativamente alta de IgY anti-VGL tenha sido produzida nesse experimento, esse fato se suporta pelos dados dos testes realizados neste estudo.

Os anticorpos IgY aparecem no soro da galinha em aproximadamente 4 dias depois da inoculação do antígeno, alcançando um título máximo em 6 a 8 dias, e declinando depois disso. O título de anticorpos pode ser fortemente aumentado por imunizações de reforço. De acordo com os resultados de Patterson et al. (1962), algumas galinhas respondem com uma cinética de anticorpos similar a de mamífero, enquanto outras respondem para o mesmo protocolo de imunização com um aumento no título de anticorpos seguindo a primeira imunização, mas falham para trazer qualquer mudança significativa depois da segunda imunização.

5.5 Vantagens de IgY em relação a IgG

Os anticorpos IgY apresentam vantagens em relação aos de mamíferos, que são geralmente usados para imunodiagnóstico, pois não ativam o sistema complemento de mamíferos e não interagem com o fator reumatoide, diminuindo assim a ocorrência de resultados falso-positivos (LARSSON et al., 1998).

A produção limitada da IgG pelo pequeno rendimento torna a produção do anticorpo muito dispendiosa. Neste projeto foi tentada a implementação do método proposto por George et al. (2003), substituindo coelho por galinhas como animal de produção de anticorpos, como também consideramos os benefícios teóricos descritos na literatura relacionados a tecnologia IgY para a produção de anticorpos policlonais e sua aplicação na pesquisa científica.

Tu (2001), comparou títulos de anticorpos em coelhos e galinhas imunizadas 0, 2, 4 e 6 semanas com lactoferrina bovina. Neste estudo os autores demonstram que após a oitava semana a titulação dos anticorpos foi similar. Outros autores demonstram diferenças entre essas concentrações como Clark (1995) título de anticorpos no soro de coelhos foi 10 vezes maior do que no soro de galinhas.

Por outro lado, Reddy (1993) produziu anticorpos em galinhas (soro) e camundongos contra reovírus de aves (tipo S1133) e percebeu que o título de anticorpos produzidos pelas galinhas foi 15 vezes maior depois da terceira imunização do que o obtido em camundongos.

É importante lembrar que existe a possibilidade da coleta não invasiva de anticorpos através da purificação da gema dos ovos. Assim, a produção de anticorpos em aves apresenta uma grande vantagem pois pode se dar por um longo período de tempo.

Além disso, existe um grande número de trabalhos os quais mostram, em princípio, que não existem diferenças significativas entre a atividade e afinidade de IgY e IgG (PEREZ et al., 1994).

5.6 Métodos para purificação de IgY

Existem muitos métodos para purificação de imunoglobulinas de ovos. Os principais deles incluem: Métodos de precipitação envolvendo sulfato de amônio ou sulfato de sódio (AKITA; NAKAI, 1992; AKITA; NAKAI, 1993), polietilenoglicol (PEG) (POLSON et al., 1980, 1985, 1990; SHAFIQ et al., 1997), ácido caprílico (McLAREN et al., 1994) e carragenana (CHANG et al., 2000); Métodos cromatográficos: Cromatografia de afinidade (LESLIE et al., 1997), cromatografia de troca iônica (STAAK et al., 2000), cromatografia de interação hidrofóbica (HASSL; ASPÖCK, 1988), cromatografia de interação tiofílica (HANSEN et al., 1998) e cromatografia de gel filtração (STAAK et al., 2000) e ultrafiltração (KIM et al., 1998). Todas as técnicas citadas acima, bem como os protocolos derivados dessas metodologias, se mostraram eficientes para a purificação da

Imunoglobulina Y. Neste trabalho optamos, por razões econômicas, pela precipitação protéica com sulfato de amônio.

5.7 Aplicações da IgY na biotecnologia

No século XIX foi descoberto que o soro imune poderia ser usado no tratamento de doenças infecciosas. No início do século XX, a soroterapia foi usada para o tratamento de uma grande variedade de infecções bacterianas, incluindo as causadas pelo *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, Neisseria meningitides, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* grupo A e *Clostridium tetani* (CASADEVAl et al., 1994, 1995).

No início dos anos 30, a soroterapia foi largamente utilizada para pneumonia lobar. Muitos experimentos demonstraram que a administração de soro específico reduzia a morte de pacientes infectados com pneumococcus em aproximadamente 50% (CASADEVAl et al., 1994). Entretanto, quando a quimioterapia antimicrobiana foi descoberta na metade da década de 30, a soroterapia para infecções bacterianas foi rapidamente abandonada.

Além das aplicações para tratamento e diagnóstico existe uma série de possibilidades para aplicações de IgY. No caso específico da IgY produzida no nosso estudo podemos aplica-las em estudos de imunohistoquímica como também podem apresentar-se como uma ferramenta de maior potencial de uso prático na pesquisa científica que os anticorpos obtidos em coelhos.

5.8 Western Blot

Como resultado da análise de *western blot* efetuado utilizando amostra do grupo que recebeu a maior concentração de lectina (400µg), foi possível verificar a confirmação da identidade IgY através da especificidade do anticorpo policlonal anti-VGL. Durante a corrida de SDS-PAGE foram utilizadas duas alíquotas de VGL obtidas a partir de duas preparações diferentes e ambas foram detectadas a partir da reação com o substrato da fosfatase alcalina sinalizando a ligação do anticorpo IgY anti-VGL na proporção de 1:100 ao anticorpo secundário. Ao demonstrar a afinidade do anticorpo IgY anti-VGL produzido em aves poedeiras, nossos resultados instigam a utilização do presente anticorpo em análises futuras com métodos de imunodiagnóstico.

De acordo com a análise realizada com amostras do grupo que recebeu 200 μ g da lectina VGL, revelou que a quantidade administrada não foi o suficiente para induzir resposta imune nas aves e produzir IgY anti-VGL em uma quantidade detectável pelo método.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados alcançados podemos concluir que galinhas poedeiras imunizadas com 400 μ g de VGL induziu a produção de anticorpos policlonais IgY contra essa lectina. A produção dos anticorpos anti-VGL utilizando galinhas poedeiras é uma tecnologia acessível, além disso, foi produzido uma quantidade significativa de IgY anti-VGL por meio de uma metodologia simples. Nesse sentido, IgY produzidas e purificadas com sucesso neste trabalho constituem uma poderosa ferramenta biotecnológica a ser disponibilizada para estudos futuros e portas abertas para sua aplicação em lectinologia, bem como em estudos histoquímicos.

REFERÊNCIAS

- AINOUZ, I.L.; Sampaio, A.H.; Benevides, N.M.B.; Freitas, A.L.P.; Costa, F.H.F.; Carvalho, M.R.; Joventino, F, P. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae extracts. **Botanica Mar.**, [s.l.], 1992, v. 35, p. 447-479, 1992.
- AKERSTROM, B, Brodin T, Reis K, Björck L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **J Immunol.**, [s.l.]. v. 135, p.2589-2592, 1985.
- AKITA E. M.; LI-CHAN, E.C. Isolation of bovine immunoglobulin G subclasses from milk, colostrum, and whey using immobilized egg yolk antibodies. **J. Dairy Sci.** [s.l.]. v. 81, n. 1, p.54-63, 1998.
- AKITA, E. M., NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from egg laid by hens immunised with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **J. Immunol. Methods**, [s.l.], v. 160, p. 207-214, 1993.
- AKITA, E.M.; NAKAI, S. Immunoglobulin from egg yolk: Instalation and purification. **J. Food. Sci.**, [s.l.], v. 57, p. 629-634. 1992.
- ALZARI, P.N. Three dimensional structure of antibodies. **Ann. Rev. Immunol.**, [s.l.], v. 6, p. 555-580, 1988.
- ARAÚJO, A. S. et al. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon.**, [s.l.], v. 55, n. 4, p. 739-744, 2010.
- BAUMGARTNER S, Bremer M, Kemmers-Voncken A, Smits N, Haasnoot W, Banks J, Reece P, Danks C., Tomkies V, Immerd U, Schmitt K, Krska R. Detection of hidden hazelnut protein in food by IgY-based indirect competitive enzyme-immunoassay. **Anal. Chim. Acta**, [s.l.], v. 520, 223–228, 2004.
- BEN L, Hommel U, Oertel M, Hauschild S. Kinetics of IgY formation after immunisation of hens with different protein antigens. **ALTEX**, [s.l.], v. 18, p. 18-21, 1969.
- BIES, C; Lehr, CM; Woodley, JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 56, p. 425-35, 2004.
- BIZANOV, G.; JONAUSKIENE, 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. **J. Lab. Anim. Sci.**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 121-130, 2004.
- BOLLEN LS, HAU J. Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. **In Vivo**, [s.l.], v. 11, p. 395-398, 1997.
- BOLLEN, L. S. et al. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG a comparasion of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using different adjuvants **J immunolol. Methods**, [s.l.], 1996, v. 191, p. 113-120, 1996.

BOYD, W.C., SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins) **Science**, [s.l.], v. 119, P.419, 1954.

BOYDEN, S. V. Natural antibodies and the immune response. **Adv. Immunol.**, [s.l.], v. 5, p. 1-28, 1966.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.**, [s.l.], 72:248-254. 1976.

BRUNDA, G.; SASHIDHAR, R. B.; SARIN, R. K. Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom in biological samples of forensic origin. **Toxicon**, [s.l.], v. 48, n. 2, p. 183-194, 2006.

BURLEY, R. W.; VADEHRA, D. V. **The Avian Egg, Chemistry and Biology**. Ed. John Wiley: New York, USA. 1989. 472p.

CALZADO, E. J. G. et al. Obtención de un conjugado anti-IgG de ratón – FITC mediante la tecnología IgY para uso como anticuerpo secundario em la detección de antígenos de superficie celular. **CENIC Ciencias Biológicas**, Brasil, v. 38, n. 1, p. 85-89, 2007.

CAMENISCH, G. et al. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1. **FASEB J.** [s.l.], v. 13, n. 1, p. 81-88, 1999.

CARLANDER, D. **Avian IgY antibody**: in vitro and in vivo. 2002. 53 f. Tese (Doutorado) - Faculty of Medicine (Sweden), University of Uppsala, Uppsala, 2002.

CARLANDER, D. et al. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunol. Res.**, [s.l.], v. 21, n. 1, p 1-6, 2000.

CARLANDER, D.; STALBERG, J.; LARSSON, A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Ups. J. Med. Sci.**, [s.l.], v. 104, n. 3, p. 179-189, 1999.

CASADEVAL L A. Antibody-Based Therapies for Emerging Infectious Diseases. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], Vol.2 N°.3, 200-208. 1995.

CAVADA, B. S. et al Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the *Diocleinae* subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci.**, [s.l.], v. 2, p. 123-35, 2001.

CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., GRANGEIRO, T. B. Primary structures and functions of plant lectins. **Braz. J. Veg. Fis.**, Brasil, 1993, 5, 193-201.

CHACANA, P. A. et al. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, Brasil, v. 85, n. 5, p. 179-189, 2004.

CHALGHOUMI R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnol Agron Soc Environ.**, [s.l.], v. 13, p. 295-308, 2009

CHALGHOUMI, R. et al. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. **Poultry Science**, Champaign, v.87, n.1, p. 32-40, 2008.

CHANG HM, Lu TC, Chen CC, Tu YY, Hwang JY. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 48, p. 995-999, 2000.

CHUANJING, W. et al. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. **J. Immunol. Methods**. [s.l.], v. 277, p. 157-169, 2003.

CLARK, J.R. MARQUARDT, RR; FROHLIEH, AA. **Comparative studies on the specificity and Agricultural Immunology**, [s.l.], v. 7, p. 33-42. 1995.

CONN, P. M. **Sourcebook of Models for Biomedical Research**. Totowa: Humana Press. 2008. 778 p.

DA SILVA, I. B. **Caracterização estrutural de uma lectina nociceptiva obtida de sementes da espécie *Platypodium elegans* Vogel**, 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará, 2017.

DAVALOS-PANTOJA, L. et al. Comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **J. Biomater Sci. Polym.** [s.l.], v. 11, n. 6, p. 657-673, 2000.

DAVIES, D. R.; PADLAN, E. A., SHERIRIFF, S. Antibody-Antigen Complexes. **Annual Review of Biochemistry**, [s.l.], v. 59, p. 439-473., 1990.

de PAULA VS, DA SILVA AS, de Vasconcelos GA, Iff ET, Silva ME, Kappel LA, Cruz PB, Pinto MA. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. **J Virol Methods**. [s.l.], v. 171, p. 102-106, 2011.

DIAS DA SILVA W, TAMBOURGI DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Vet Immunol Immunopathol.**, [s.l.], v. 135, p.173-180, 2010.

DOHMS, J.E., SIF, Y.M. & BACON, W.L. Studies on metabolism and concentration of immunoglobulin G in the newly hatched turkey poult. **American Journal of Veterinary Research**, [s.l.], v. 39, p. 1466-1471, 1978.

FRYER, J. et al. IgY anti-porcine endothelial cell antibodies effectively block human anti-porcine xenoantibody binding. **Xenotransplantation**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 98–109, 1999.

GALLEGO DEL SOL, F. et al Diocleinae lectins clues to delineate structure/function correlations. **Methods in Proteome and Protein Analysis**, [s.l.], v. 32, p. 81-91, 2004.

GANDHI, S. et al. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. **Biosens Bioelectron.**, [s.l.], v. 25, p. 502–505, 2009.

GEE, S. C. et al. The purification of IgY from chicken egg yolk by preparative electrophoresis. **Protein. Expr. Purif.**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 151-155, 2003.

GEORGE, K. M. et al. Differentiation between acetylcholinesterase and the organophosphate-inhibited form using antibodies and the correlation of antibody recognition with reactivation mechanism and rate. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 46, p.45512-45518, 2003.

HANSEN, P. et al. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. **J. Immunol. Methods**, [s.l.], v. 215, n. 1-2, p. 1-7, 1998.

HASSL A, ASPÖCK H. Purification of egg yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. **Journal of Immunological Methods**. [s.l.], v. 110, p. 225-228, 1988.

HATTA, H. et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, [s.l.], v.31, n. 4, p. 268-274, 1997.

HATTA, H. et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s.l.], v.57, n.3, p.450-454, 1993.

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. **J. Immunol. Methods**, [s.l.], v. 198, n. 1, p. 67-77, 1996.

HORTON, J.; HOLDEN, C.; WARD, P.; MACDONALD, D.; SANDERSON, A. Exploitation of phylogenetic distance in cell surface immune labeling studies with b2-microglobulin **Journal of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 85, p. 96–99, 1984.

IKEMORI, Y. et al. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. **Vet Microbiol.**, [s.l.], v. 58, n. 2-4, p. 105-111, 1997.

IKEMORI, Y. et al. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Am. J. Vet. Res.**, [s.l.], v. 53, n. 11, p. 2005-2008, 1992.

ISÍDRIO, R. **Caracterização bioquímica e especificidade fina da lectina de sementes de *Vatairea guianensis***. 2002. Tese (Doutorado em Bioquímica) -Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em

Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

JACOBSEN, L. et al. The chicken oocyte receptor for lipoprotein deposition recognizes alpha 2-macroglobulin. **J Biol Chem.**, [s.l.], v. 270, n. 12, p. 6468-6475, 1995.

JACQUES, A. V.; **Avaliação do efeito neuroprotetor de lectinas frente à neurotoxicidade glutamatérgica.** 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

JANEWAY, C. A. J.; WALPORT, M.; TRAVERS, P. **Imunobiologia.** 7. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010. 908 p.

JARADAT, Z. W.; MARQUARDT, R. R. Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. **Food and Agricultural Immunology**, [s.l.], v. 12, p. 263-272, 2000.

JENSENIUS, J. C. et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. **J. Immunol. Methods**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 63-68, 1981.

JUNIOR AB, MACARI M. Doenças das Aves. 1º ed. Brasil: Facta; 2000. 490p.

KAPOOR, P.; COMPTON, M. M.; HOWARTH, B. Immunization of chickens with quail and turkey perivitelline membrane proteins: production of antibodies and their effects on fertility. **Poult Sci.**, [s.l.], v. 79, p. 245-256, 2000.

KIM H, NAKAI S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 63, p. 485-490, 1998.

KITAGUCHI, K. et al. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, [s.l.], v. 121, n. 3-4, p. 290-299, 2008.

KOCOUREK, J.; HOREKSI, V. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". **In lectin biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, [s.l.], v. 3, p. 3-6, 1983.

KOWALCZYK, K. et al. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in chicken. **Immunology**, [s.l.], v. 19, p. 157-167, 1985.

LARSSON, A. et al. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution — A review. **Poult. Sci.**, [s.l.], v. 72, p. 1807-1812, 1993.

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Immunology**, [s.l.], v. 10, p. 29-36, 1998.

LEE, K. A. et al. Acid stability of anti- *Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **J. Biochem. Mol. Biol.**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 488-493, 2002.

LEENAARS MPPA, Hendriksen CFM, Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R, Halder M, Hanly WC, Hartinger J, Hau J, Lindblad EB, Nicklas W, Outschoorn IM, Stewart-Tull

- DES. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. **ATLA**, [s.l.], v. 27, p. 79-102, 1999.
- LESLIE A S, GROSKREUTZ DJ. Simple affinity purification of antibodies using *in vivo* biotinylation of a fusion protein. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 207, p. 147-155, 1997.
- LESLIE, G. A.; CLEM, L.W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. **J. Exp. Med.**, [s.l.], v. 130, n. 6, p. 1337-1352, 1969.
- LESLIE, G. A.; MARTIN, N. Studies on the secretory immunologic system of fowl serum and secretory IgA of the chicken. **J. Immunol.**, [s.l.], v.110, n.1, p.1-9, 1973.
- LEVESQUE, S.; MARTINEZ, G.; FAIRBROTHER, J. M. P. S. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. **Poult Sci.**, [s.l.], v. 86, n. 4, p. 630-635, 2007.
- Li X, Nakano T, Sunwoo HH, Paek BH, Chae HS, Sim JS. Effects of Egg and Yolk Weights on Yolk Antibody (IgY) Production in Laying Chickens. **Poultry Sci.**, [s.l.], v. 77(2), p. 266-70, 1998
- Li X, Shuai JB, Fang WH. Protection of *Carassius auratus Gibelio* against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. **J Zhejiang Univ SciB.**, [s.l.], v. 7, p. 922-928, 2006.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Bioch Bioph Acta**, [s.l.], v. 1572, p. 198-208, 2002.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Bioch Bioph Acta**, [s.l.], v. 1383, p. 9-36. 1998.
- MAC LACHLAN, I.; NIMPF, J.; SCHNEIDER, W. J. Avian riboflavin binding protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. **J. Biol. Chem.**, [s.l.], v. 269, n. 39, p. 24127- 24132, 1994.
- MAHMOOD, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: técnica, teoria e solução de problemas. **North American Journal of Medical Sciences**, [s.l.], 4 (9), 429 434.
- MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Anticorpos Humanizados. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasil, n. 23, p. 338-343, 2001.
- MATHEIS, W.; SCHADE, R. Development of an IgY-based rocket-immunoelectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. **J. Immunol. Methods**, [s.l.], v. 369, n. 1-2, p. 125-132, 2011.
- MATSUDA, H. et al. A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. **FEMS Immunol Med Microbiol.** [s.l.], v. 23, n. 3, p. 189-194, 1999.
- MATSUSHITA, K. et al. Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. **J. Vet. Med. Sci.**, [s.l.], v. 60, n. 6, p. 777-779, 1998.

McLAREN RD, PROSSER CG, GRIEVE RCJ, BORRISENKO M. The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunised with ovine α -lactalbumin. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], 1994; 177, 175-184.

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. **J. Med. Food**, v. 5, n. 3, p. 159-69, 2002.

MOHAMMED, S. M. et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 115-25, 1998.

MOREIRA, R. A.; CAVADA B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.

MORRISON, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Mol. Immunol.**, [s.l.], v. 38, n. 8, p. 619-625, 2001.

MUMENE, C. N. **Development of chicken polyclonal and mouse monoclonal-based enzyme immunoassays for the detection of β -cyclocitral in catfish pond water**. 2004. 118 f. Dissertação - Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, 2004.

MUNHOZ, L. S. et al. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in Immunodiagnostic. **Ciência Rural**, Brasil v. 44, p. 153-160, 2014.

NARAT, M. Production of Antibodies in Chickens. **Food Technol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 41, n. 3, 259-267, 2003.

NISHINAKA, S. et al. Two chicken B cell lines resistant to ouabain for the production of chicken monoclonal antibodies. **J. Vet. Med. Sci.**, [s.l.], v. 58, n. 11, p. 1053-1056, 1996.

NUNES, G. S. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. **Revista Química Nova**, Brasil, v. 28, n. 3, p. 462-471, 2005.

O'FARRELLY, C.; BRANTON, D.; WANKE, C. A. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. **Infect Immun.**, [s.l.], v. 60, n. 7, p. 2593-2597, 1992.

OLBRICH, C. Stable biocompatible adjuvants--a new type of adjuvant based on solid lipid nanoparticles: a study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. **Altex**, [s.l.], v. 30, n.4, p. 443-458, 2002.

OLOVSSON, M.; LARSSON, A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. **Comp Immunol Microbiol Infect Diseases.**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 145-152, 1993.

OSTERNE, V. J. S. **Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica: uma potencial ferramenta anticâncer**.

2016. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará, 2016.

PARVARI, R. et al. Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. **EMBO J.**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 739–744, 1988.

PATTERSON, R. et al. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. **J Immunol.**, [s.l.], v. 89, p. 272-278, 1962.

PAULY, D. et al. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethyleneglycol (PEG) precipitation. **J. Vis. Exp.**, [s.l.], v. 51, p. 3084, 2011.

PAULY, D. et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poult Sci.**, [s.l.], v. 88, n. 2, p. 281-90, 2009.

PEREZ, G.; PEREZ, C.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; RICHARDSON, M. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmani* and *Canavalia maritima*. **Phytochemistry**, Elmsford, 30:2619-2621, 1991.

PEREZ, RC.M., MEJIA, C.M.; QUINTERO, L.Z. **Produccion de anticuerpos antiprogesteron a partir de La yema de huevo de gallinas y del suero sanguíneo de conejos, para ser utilizados em radioimmunoanálisis**. Veterinaria Mexicana 25, 117-125. 1994.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, [s.l.], v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectin: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.**, [s.l.], v. 33, p. 209-58, 1998.

POLSON A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. **Immunological Investigations**, [s.l.], 1990; 19, 253-258.

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**, [s.l.], 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**, [s.l.], v.9, n.5, p.475-493, 1980.

RAHIMI, S. et al. Prevention of Salmonella Infection in Poultry by Specific Egg-Derived Antibody. **Int. J. Poult Sci.** [s.l.], v. 6, n. 4, p. 230-235, 2007.

RAMOS, M. V. et al. Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. **Protein Peptide Letters**, [s.l.], v. 7, p. 241–248, 1997.

RECHEIS, B. et al. Receptor-mediated transport and deposition of complement component C3 into developing chicken oocytes. **Cell Mol Life Sci.** [s.l.], v. 62, n° 16m, p. 1871-1880m 2005.

REDDY, S, K., SY, D; SILIM, A. Radioimmunoprecipitation of avian reovirus polypeptides using virus-specific IgM and IgG murine monoclonal and chicken polyclonal antibodies. **Journal of Virological Methods**, [s.l.], 42, 13-22. 1993.

REYNAUD, C. A. et al. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. **Cell**, [s.l.], v. 48, n° 3, p. 379-388, 1987.

REYNAUD, C. A. et al. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. **Cell**. [s.l.], v. 40, n° 2, p. 283-291, 1985.

REYNAUD, C. A.; DAHAN A, ANQUEZ V, WEILL JC. Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. **Cell**. [s.l.], v. 59, p.171-183, 1989.

ROSE, M. E.; ORLANS, Es; BUTTRESS N. Immunoglobulin classes on the hen's egg: their segregation in yolk and white. **Eur. J. Immunol.** [s.l.], v. 4, p. 521–523, 1974.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of Humane Experimental Technique.** London, UK: Methuen, 1959.

SANTORO ML. et al. Simultaneous isolation of platelet factor 4 and glycoprotein IIb-IIIa complex from rabbit platelets, and characterization of specific chicken antibodies to assay them. **J. Immunol. Methods**, [s.l.], v. 284, n. 1-2, p. 55-72, 2004.

SASAI, K. et al. Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognizes the apical complex of *Eimeria acervulina* sporozoites and partially inhibits sporozoite invasion of CD8+ T lymphocytes in vitro. **J. Parasitol.**, [s.l.], v. 82, n. 1, p. 82-7, 1996.

SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and in human and veterinary medicine. **ATLA.**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 129-154, 2005.

SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies, production and application: **IgY-Technology.** Germany: Springer, 2000. 249 p.

SCHADE, R. et al. Chickens egg yolk antibodies, production and applications – **IgY – Technology.** Berlin: Springer-Verlag, 2001, 255p.

SCHADE, R. et al. Specificity of chicken (IgY) versus rabbit (IgG) antibodies raised against Cholecystokinin octapeptide (CCK-*). **Altex**, [s.l.], v. 13, Suppl. 1, p. 80-85, 1996.

SCHADE, R.; HLINAK, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. **Altex**, [s.l.], v. 13, n. 5, p. 5-9, 1996.

SCHWARZKOPF, C.; THIELE, B. Effectivity IF alternative adjuvants in comparison to Freund's complete adjuvant. **Altex**, [s.l.], v.13, n 5, Suplemento 96, p.22-25,1996.

SHAFIQ MK, AFZAL H, KHAMUM N, ARSHAD M. Isolation of egg yolk immunoglobulins (IgY) by chloroform polyethylene glycol technique and assaying of antibodies against avian infectious bronchitis. **Veterinary Medicine Journal**. [s.l.], v. 45, p. 273-278, 1997.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Science**, [s.l.], v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON, N; Lis, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **Federation American Societies Experimental Journal**, Bethesda, v. 4, p. 3198-208, 1990.

SHARON, N; Lis., H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, [s.l.], v. 177, p. 949-59, 1972.

SHIMIZU, M. et al. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. **J Food Sci**. [s.l.], v. 59, n. 4, p. 763-772, 1994.

SHIMIZU, M. et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Biosci Biotechnol Biochem.**, [s.l.], v. 56, n. 2, p. 270-274, 1992.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHI MOTO, K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. **Comp. Biochem PhysiolB.**, [s.l.], v. 106, n. 2, p. 255-261, 1993.

SHIMIZU, M.; NAKAI, S.; FITZSIMMONS, R. C. An-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **J. Food Sci.**, [s.l.], v. 5, p. 1360-1366, 1988.

SHIN, J. H. et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Diagn Lab Immunol.**, [s.l.], v. 9, n. 5, p. 1061-1066. 2002.

SILVA, C. T. L. **Avaliação biológica dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet)**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SILVA, H. C.; NAGANO, C. S.; SOUZA L. A. G.; NASCIMENTO, K. S.; ISÍDRO, R.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SAMPAIO, A. H.; ASSREUY, A. M. S.; PIRES, A. F.; DAMASCENO, L. E. A.; MARQUES-DOMINGOS, G. F. O.; CAVADA, B. S. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 47(12), p. 2347-2355, 2012.

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 2000.

STIFANI, S.; NIMPF, J.; SCHNEIDER, W. J. Vitellogenesis in *Xenopus laevis* and chicken: cognate ligands and oocyte receptors. The binding site for vitellogenin is located on lipovitellin I. **J Biol Chem.** [s.l.], v. 265, n. 2, p. 882-888, 1990.

SUGITA-KONISHI, Y.S.; SHIBATA, K.; YUN, S.S. et al. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, [s.l.], v.60, n.5, p.886-888, 1996.

SUSEELAN, K.N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K.B.; KRISHNA, T.G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 407, n. 2, p. 241-247, 2002.

SVENDSEN, L. et al. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **J Immunol Methods.** [s.l.], v. 191, n. 2, p. 113-120, 1996.

SVENDSEN, L. et al. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Altex**, [s.l.], v. 45, n. 1, p. 89-93, 1995.

TINI, M. et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** [s.l.], v. 131, n. 3, p. 569-574, 2002.

TIZARD, I. et al. The Avian Antibody Response. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 2-14, 2002.

TSUBOKURA, K. et al. Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. **Clin Exp Immunol.**, [s.l.], v. 108, n. 3, p. 451-455, 1997.

TU, Y-Y., CHEN, C-C.; CHANG, H-M. Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgY) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. **Food Research International**, [s.l.], v. 34, p. 783-789, 2001.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Cr Rev Plant Sci**, [s.l.], v. 17, p. 575-692, 1998.

VIEIRA, A.V.; SANDERS, E. J.; SCHNEIDER, W. J. Transport of serum transthyretin into chicken oocytes. A receptor-mediated mechanism. **J. Biol. Chem.** [s.l.], v. 270, n. 7, p. 2952-2956, 1995.

WALJUNO, K., SCHOLMA, R. A., BIENTEM, J., MARIONO, A., HAHN, A. M. Aminoacid sequence of heveine. **Proc. Int. Rubber Conf., Kuala Lumpur.**, [s.l.], v. 2, p. 518-531, 1975.

WALSH, W. E. et al. Distribution of an immune response to chicken anti- α Gal immunoglobulin Y antibodies in wild-type and α Gal Knockout mice. **Immunology**, [s.l.], v. 101, n. 4, p. 467-473, 2000.

WARR, W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibody es. **Immunology Today**, [s.l.], v. 16, n. 8, p. 392-398, 1995.

WIEDEMANN, W. et al. Chicken Egg Antibodies for Prophylaxis and Therapy of Infectious Intestinal Diseases. **Zentralbl Veterinarmed B.**, [s.l.], v. 38, n. 4, p. 283-91, 1991.

WOOLLEY, J. A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. **J Immunol Methods.**, [s.l.], v. 178, n. 2, 253-265, 1995.

YAMAUCHI, D, et al Nucleotide sequence of cDNA for concanavalin A from *Canavalia gladiata* seeds. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 30, n. 1, p. 147-150, 1989.

YAMAUCHI, D.; MINAMIKAWA, T. Structures of the gene encoding concanavalina a from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 260, p 127,1990.

ANEXO A - PATENTE RESULTANTE DO PRESENTE TRABALHO

27/03/2020 870200040209
11:19

29409161916162532

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 006216 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 07272636000131

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av da universidade, 2853 - Benfica

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP: 60710-780

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IgY ANTI-LECTINA DE SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (VGL) (Leguminosae) A PARTIR DE OVOS DE AVES POEDEIRAS (*Gallus gallus*) DA LINHAGEM DEKALB WHITE

27/03/2020 870200040209
11:19

29409161916162532

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 006216 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 07272636000131

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av da universidade, 2853 - Benfica

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP: 60710-780

País: Brasil

Telefone: (85) 3366-9434

Fax: (85) 3366-9941

Email: patentes@ufc.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/03/2020 às 11:19, Petição 870200040209

Petição 870200040209, de 27/03/2020, pág. 1/30

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IgY ANTI-LECTINA DE SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (VGL) (Leguminosae) A PARTIR DE OVOS DE AVES POEDEIRAS (*Gallus gallus*) DA LINHAGEM DEKALB WHITE

Resumo: As lectinas constituem um grupo de proteínas presentes em diversos organismos vivos, sobretudo em vegetais e especialmente em sementes de leguminosas. Uma das possíveis abordagens para a investigação das mesmas em sistemas biológicos é a sua detecção através de técnicas que envolvam anticorpos. Neste sentido, os anticorpos tornam-se ferramentas biotecnológicas de grande valia uma vez que são capazes de reconhecer especificamente epítopos das moléculas alvo. As imunoglobulinas (Igs) são proteínas presentes em grande concentração no plasma sanguíneo de mamíferos. No caso das aves, a principal classe de imunoglobulinas (IgYs) pode ser encontrada não somente no sangue, mas também nas gemas dos ovos, permitindo sua purificação rápida, eficaz e eficiente, facilitando seu uso como insumos biotecnológicos. Dessa forma, esta invenção traz um método para o desenvolvimento de processo de produção e purificação de anticorpos IgY contra a lectina extraída da semente de *Vatairea guianensis* (VGL) em aves poedeiras (*Gallus gallus*), a saber que a IgY produzida nesse trabalho constitui uma potente ferramenta biotecnológica a ser disponibilizada para estudos futuros.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/03/2020 às 11:19, Petição 870200040209

Petição 870200040209, de 27/03/2020, pág. 3/30

Nome: CORNEVILE CORREIA NETO

CPF: 31080375368

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Sargento Barbosa 240

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: ccorreianeto@gmail.com

ANEXO B - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>**IJDR***International Journal of Development Research*
Vol. 10, Issue, 11, pp. 41810-41814, November, 2020
<https://doi.org/10.37118/ijdr.20382.11.2020>

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

ANTI-VATAIREA GUIANENSIS LECTIN IGY ANTIBODIES PRODUCED IN IMMUNIZED CHICKEN EGGS: PRODUCTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION**Corneville Correia-Neto¹, Messias V. Oliveira¹, Mayara T. L. Silva¹, Vanir R. Pinto-Junior^{1,3}, Sarah E. G. Correia¹, Ivanice B. Silva¹, Maria G. Q. Martins⁴, Jeanlex S. Sousa², Maria I. F. Guedes³, Kyria S. Nascimento¹, Vinicius J. S. Osterne^{*1,4} and Benildo S. Cavada¹**¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Brazil²Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Brazil³Centro Universitário INTA, Brazil⁴Departamento de Nutrição, Universidade Estadual do Ceará, Brazil