



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TECNOLOGIA IGY: PRODUÇÃO DE ANTICORPOS AVIÁRIOS PARA  
*Leishmania (Leishmania) amazonensis* COM O USO ÉTICO DOS  
ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO**

**ALINE RODRIGUES BERNARDO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Carlos Mazur**

*e Co-orientação da Professora*  
**Maria das Graças Miranda Danelli**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Área de Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2009

636.70896926

B518t

T

Bernardo, Aline Rodrigues, 1981-

Tecnologia IgY: produção de anticorpos aviários para Leishmania (Leishmania) amazonensis com o uso ético dos animais de experimentação / Aline Rodrigues Bernardo – 2009.

49f. : il.

Orientador: Carlos Mazur.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 41-49

1. Parasitologia veterinária – Teses. 2. Leishmaniase – Teses. 3. Imunocomplexos – Teses. 4. Galinha – Teses. I. Mazur, Carlos, 1960-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ALINE RODRIGUES BERNARDO**

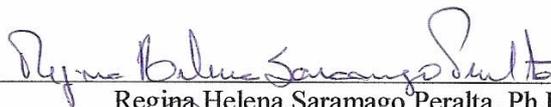
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/02/2009



---

Carlos Mazur. Ph.D. UFRRJ  
(Orientador)



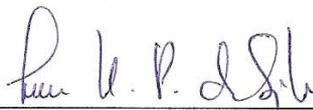
---

Regina Helena Saramago Peralta. Ph.D. UFF



---

Cecília Rosa Greco. Ph.D. UNRC/Argentina



---

Lucia Helena Pinto da Silva. Ph.D. UFRRJ

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais pelo amor, dedicação, confiança e apoio em todas as trajetórias de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me conceber saúde, sabedoria e força para a realização deste trabalho.

À professora Maria das Graças Miranda Danelli e o professor Carlos Mazur por fazerem parte do meu crescimento profissional e pessoal, através dos 6 anos de orientação, apoio, confiança, paciência e amizade.

À professora Lucia Helena Pinto da Silva do Laboratório de Víruses Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ, pelo carinho, apoio e incentivo.

À professora Cecília Rosa Greco da Universidade Nacional de Río Cuarto (UNRC), Argentina pelo apoio, carinho e incentivo.

Aos estagiários e pós-graduandos (Verônica e Isabela) do Laboratório de Víruses Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ, pela constante ajuda e amizade.

À professora Cristina Amorim Ribeiro de Lima, Departamento de Nutrição Animal do Instituto de Zootecnia, UFRRJ, pelo carinho e constante ajuda.

À professora Regina Helena Saramago Peralta e ao professor Jose Mauro Peralta do Instituto de Microbiologia, UFRJ pela paciência, carinho e ajuda.

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes, a professora Sonia Regina de Souza e seus orientados de pós-graduação (Leandro e Carlos) e de graduação (Marcos e Osmário) do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Departamento de solos, Instituto de Agronomia, por me receberem com carinho em seu laboratório.

À professora Aurea Echevarria e suas orientadas de pós-graduação (Kenia Pissinate e Andressa Esteves de Souza) do Laboratório Núcleo de Síntese e Química Medicinal, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ, por permitir a utilização de seu laboratório.

À professora Elvira M. Saraiva e Michelle T. C. Nascimento do Laboratório de Imunobiologia das Leishmaioses, Instituto de Microbiologia, UFRJ, pelo carinho e apoio técnico.

Ao Pedro Paulo e Bernardo do Departamento de Patologia / IOC – FIOCRUZ pelo o apoio técnico.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias por possibilitar a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

BERNARDO, Aline Rodrigues. **Tecnologia IgY: produção de anticorpos aviários para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com o uso ético dos animais de experimentação**. 2009. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A produção de anticorpo específico (IgY) em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e sua purificação a partir da gema do ovo vem atraindo o interesse da comunidade científica devido as inúmeras vantagens sobre os anticorpos IgG de mamíferos. Baixo custo, produção em quantidades elevada, reconhecimento de proteínas altamente conservadas de mamíferos, além de se evitar o sofrimento e morte de animais de experimentação, são as principais vantagens. O objetivo geral de nosso estudo foi desenvolver, padronizar e implantar a “Tecnologia IgY” para produção de anticorpos aviários, tendo como meta a obtenção de IgY-específica para formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Inicialmente, foi realizada adequação de dois métodos de precipitação e a comparação entre eles, visando a obtenção da IgY pura a partir da gema de ovos brancos adquiridos no comércio. O método de purificação empregando polietilenoglicol (PEG-6000) foi capaz de extrair IgY com pureza comparável ao padrão IgY comercial (Sigma) e superior a obtida pelo método com sulfato de amônio 25%. Posteriormente, galinhas foram inoculadas com três doses de antígeno inativado (formas promastigotas de *L. amazonensis*) misturados com adjuvante incompleto de Freund, nos tempos 0, 14 e 21 dias, por via intramuscular. Elevado rendimento da IgY total e específica foi obtido, sendo determinado através dos métodos de Bradford e ELISA, respectivamente. Os anticorpos IgY apresentaram elevada especificidade (Imunofluorescência indireta), sensibilidade e avidéz (ELISA) para formas promastigotas de *L. amazonensis*, a partir da segunda imunização. O nível de anticorpos IgY-específicos permaneceu elevado até o final da análise, por volta do 56º dia. Com base nos resultados obtidos podemos concluir que a “Tecnologia IgY” possibilita a obtenção de anticorpos com alta especificidade e sensibilidade, de forma ética, podendo ser utilizada com sucesso em diversos campo da ciência.

**Palavras-chave:** IgY, PEG-6000, *Leishmania amazonensis*.

## ABSTRACT

BERNARDO, Aline Rodrigues. **IGY Technology: production of antibodies to broiler avian *Leishmania (Leishmania) amazonensis* with the ethical use of animals for experimentation.** 2009. 49 p. Dissertation (Master of Science, Animal Health). Institute of Veterinary, Department of Veterinary Parasitology, University Rural of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The production of specific antibody (IgY) in chickens (*Gallus gallus domesticus*) and its purification from the yolk of the egg is attracting the interest of the scientific community due to the numerous advantages of the IgG of mammals. Low cost, high volume production, recognition proteins highly conserved in mammals, in addition to preventing the suffering and death of animals for experimentation, are the main advantages. The aim of our study was to develop, standardize and deploy the "technology IgY" for aviaries production of antibodies with aim to obtain IGY-specific forms to promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Initially, matching was performed by two methods of precipitation and the comparison between them, to obtain the pure IgY from the yolk of egg white obtained in trade. The method of purification employing polietienoglicol (PEG-6000) was able to extract IgY with purity comparable to commercial standard IgY (Sigma) and more than obtained by the method with 25% ammonium sulfate. Later, chickens were inoculated with three doses of inactivated antigen (promastigotes forms of *L. amazonensis*) mixed with incomplete Freund's adjuvant, at 0, 14 and 21 days, IM route. High yield of total and specific IgY was obtained, as determined by the methods of Bradford and ELISA, respectively. The IgY antibodies showed high specificity (indirect immunofluorescence), sensitivity and avidity (ELISA) for promastigotes forms of *L. amazonensis*, from the second immunization. The level of IgY-specific antibodies remained high until the end of the analysis, around 56 days. Based on the results we can conclude that the "Technology IgY" allows to obtain antibodies with high specificity and sensitivity, in ethics, can be used successfully in various fields of science.

Key words: IgY, PEG-6000, *Leishmania amazonensis*.

## LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1** Concentração de proteína total obtida após dois diferentes métodos de extração de IgY, a partir da gema de ovo..... **24**
- Tabela 2.** Concentração e rendimento de proteína total e IgY específica, respectivamente, obtida após a purificação por PEG 6000 da gema antes (tempo 0) e durante (14, 28, 42 e 56 dias) o período de imunização das aves..... **29**
- Tabela 3.** Índice da Avidéz (IA) dos anticorpos IgY, produzidos durante a imunização da aves com antígeno de *L. amazonensis*..... **30**

## LISTAS DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Espécies de <i>Leishmania</i> que causam doenças em humano.....	<b>12</b>
<b>Quadro 2.</b> Vacinação das galinhas da linhagem comercial Hy-line variedade Brown recebidas para experimentação.....	<b>18</b>

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura das imunoglobulinas de mamífero (IgG) e de galinhas (IgY).....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> .....	<b>14</b>
<b>Figura 3.</b> Distribuição geográfica de Leishmanioses cutâneas.....	<b>15</b>
<b>Figura 4.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condição não redutora, corado pelo reagente <i>Comassie Bue</i> R250 (Bio-Rad).....	<b>25</b>
<b>Figura 5.</b> (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições não redutoras e redutoras, (B) <i>Immunoblot</i> mostrando o reconhecimento da IgY por anticorpos específicos.....	<b>26</b>
<b>Figura 6.</b> Cinética de resposta imune de galinhas imunizadas com antígeno de <i>L. amazonensis</i> , levando-se em conta proteína total (A), empregando o método Bradford e, IgY específica (B), detectado por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Marcação de <i>L. amazonensis</i> com anticorpo IgY específico em reações de imunofluorescência indireta examinadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META) utilizando campo escuro (A, C e E) e campo claro (B, D e F).....	<b>31</b>
<b>Figura 8.</b> Marcação de <i>L. amazonensis</i> com anticorpo IgY não específico em reações de imunofluorescência indireta examinadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META) utilizando campo escuro (A, C e E) e campo claro (B, D e F).....	<b>33</b>
<b>Figura 9.</b> Marcação de <i>L. amazonensis</i> sem anticorpo IgY em reações de imunofluorescência indireta examinadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META) utilizando campo escuro (A) e campo claro (B).....	<b>34</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 SISTEMA IMUNE HUMORAL NAS GALINHAS .....	4
2.2 RESPOSTA DE ANTICORPOS .....	6
2.3 TRANSFERÊNCIA PASSIVA DA IMUNIDADE EM GALINHAS .....	7
2.4. COMPOSIÇÃO DA GEMA DO OVO .....	8
2.5 PURIFICAÇÃO DE IGY .....	8
2.6 UTILIZAÇÃO DA IGY COMO IMUNOBIOLÓGICO .....	9
2.7 LEISHMANIOSE .....	11
2.8 CICLO .....	13
2.9 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA .....	14
2.10 SINTOMATOLOGIA .....	15
2.11 DIAGNÓSTICO .....	16
2.12 LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E OVOS .....	18
3.2 ANTÍGENO ( <i>L. AMAZONENSIS</i> ) .....	19
3.3 IMUNIZAÇÃO .....	19
3.4 SELEÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DOS OVOS .....	19
3.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO .....	20
3.6 DOSAGEM DE PROTEÍNA .....	20
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) .....	20
3.8 <i>WESTERN BLOT</i> .....	21
3.9 <i>IMMUNOBLOT</i> .....	21
3.10 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO .....	22
3.11 ELISA-AVIDEZ .....	22
3.12 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....	23
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 ESCOLHA DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA IGY OBTIDA .....	24
4.2. AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E DA CINÉTICA DA PROTEÍNA TOTAL E DE IGY ESPECÍFICA NA GEMA DOS OVOS DAS AVES IMUNIZADAS .....	27
4.3. VERIFICAÇÃO DA AVIDEZ DA RESPOSTA IMUNE .....	29
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA IGY ESPECÍFICA AOS ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE DA FORMA PROMASTIGOTA DE <i>L. AMAZONENSIS</i> POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....	30
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>40</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A “Tecnologia IgY” está pautada na imunização de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e na extração de anticorpos IgY-específicos da gema do ovo. Esta tecnologia é aceita internacionalmente como um método alternativo pelo Centro europeu para validação de métodos alternativos e pelo *Office vétérinaire federal* da Suíça por se tratar de um procedimento não invasivo.

Atualmente não há dúvidas que anticorpos aviários possam ser produzidos e utilizados de forma similar aos anticorpos de mamíferos. Dependendo das circunstâncias envolvidas, o emprego de anticorpos IgY oferece uma série de vantagens econômicas: galinhas apresentam menor custo no mercado do que coelhos e cabras na produção de 17-35 gramas de IgY total/ano, muito mais que a quantidade de anticorpos produzidos em coelhos no mesmo período; além disso, a grande quantidade de anticorpos obtidos favorece seu emprego no campo da terapia e/ou profilático na medicina humana e veterinária.

Diversos experimentos já demonstraram com sucesso o uso da IgY no diagnóstico e no tratamento de diversas patologias como a diarreia em suínos, bovinos e humanos; na profilaxia da cárie dentária; na produção de anti-venenos de cobra; no tratamento bacteriano de peixes e até mesmo, no campo do bioterrorismo, com o uso de anticorpos aviários específicos para detecção e neutralização de toxinas.

A Leishmaniose é uma doença parasitária de distribuição mundial, transmitida para humano por flebótomos infectados pelo protozoário do gênero *Leishmania*. É classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como categoria I do Programa de Doenças Tropicais, referente a doenças emergentes e fora de controle, sendo atualmente considerada a 3ª doença em importância mundial com transmissão por vetor.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) está entre as endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido sua ampla distribuição pelo território nacional, a ocorrência de formas clínicas graves e pelas dificuldades referentes ao diagnóstico e tratamento. Existem pelo menos sete espécies de leishmanias descritas, sendo que no Brasil a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as espécies mais amplamente distribuídas.

A importância dos animais domésticos na manutenção da LTA vem sendo revista na literatura, sugerindo que os cães podem desempenhar papel fundamental nas áreas endêmicas urbanas, como principal reservatório doméstico ou elo na cadeia de transmissão humana. Recentemente, felinos vem sendo acometidos pela LTA, havendo relatos na literatura de leishmaniose cutânea felina por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* no Brasil.

A caracterização das espécies de *Leishmania* tem implicações não só epidemiológicas como também no prognóstico e na terapêutica. O desenvolvimento de métodos mais sensíveis de detecção de *Leishmania* continua sendo objetivo de estudo de múltiplos investigadores em todo mundo.

O objetivo geral de nosso estudo foi desenvolver, padronizar e implantar a “Tecnologia IgY”, produzindo anticorpos aviários contra antígenos de *Leishmania amazonensis* (formas promastigotas).

No intuito de alcançar tal objetivo, traçamos as seguintes metas:

- Avaliar métodos de extração de IgY a partir da gema do ovo, levando-se em conta a pureza dessa preparação;
- Analisar o rendimento total e antígeno-específico da IgY obtida;
- Estudar a cinética de aparecimento da IgY na gema dos ovos de galinhas imunizadas com formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar a especificidade e a avidéz dos anticorpos produzidos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A obtenção de anticorpos IgY a partir da gema de ovos de galinhas imunizadas com um antígeno específico vem sendo muito empregada na pesquisa biomédica, principalmente para proteínas altamente conservadas entre diferentes espécies de mamíferos (TINI et al., 2002). As aves possuem distância evolucionária suficiente para que proteínas de mamíferos possam ser reconhecidas como estranhas e provoquem uma resposta imune humoral na ave. Por esse motivo, não foi possível produzir anticorpos de mamíferos para uma forma anormal de proteínas prion (PrP), enquanto em galinhas, elevadas quantidades de anticorpos IgY purificados da gema de ovos foram obtidos e empregados como ferramenta no diagnóstico e estudo da encefalopatia espongiforme bovina (SOMERVILLE et al., 1997).

Klemperer, em 1893, foi o primeiro a demonstrar que a imunização de galinhas resultava na transferência de anticorpos específicos para a gema do ovo. A inoculação de ratos com extratos de gemas obtidas de ovos de galinhas imunizadas com caldo de cultivo de *Clostridium tetani* os protegeram contra posteriores desafios letais da toxina inoculada intraperitonealmente. Os ratos que não receberam o extrato de gema anteriormente ao desafio letal da toxina morriam rapidamente (apud MOREIRA, 2007). Este experimento demonstrou a proteção específica na gema, conhecida hoje como transferência passiva de anticorpos.

Apesar dos ótimos resultados, estes conhecimentos não foram utilizados para fins científicos. Somente a partir do final da década de 1950, com a preocupação do bem estar animal, este tema foi atualizado por Russel e Burch (1959) que citaram a obtenção da IgY, a partir de ovos de galinha, como uma técnica alternativa para reduzir o sofrimento de animais utilizados na pesquisa (apud RUSSEL; BURCH, 1992).

A partir de 1980 a IgY passou a ser mais utilizada nos ensaios laboratoriais, devido à disponibilidade de reagentes comerciais para a purificação rápida e simples da IgY, de padrão IgY comercial e de anticorpos específicos anti-IgY marcados com fluoresceína, fosfatase alcalina ou peroxidase (CHACANA et al., 2004).

O conceito “Tecnologia IgY”, criado em 1995 por C. Staak, é definido pela obtenção e o uso da imunoglobulina G das galinhas (IgY), a partir da gema do ovo (apud CHACANA et al., 2004). O estudo da IgY vem sendo estimulado nas últimas décadas, principalmente quando se observa o custo de produção, a facilidade de manejo e o aumento da produção de ovos por ave (280 ovos/ano) (Karlsson et al., 2004). Individualmente, uma galinha é capaz de produzir muito mais anticorpos que coelhos, cabras, equinos e roedores (SCHADE, 2001).

O Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos recomenda o uso da IgY em substituição a IgG de mamífero, na tentativa de se reduzir o sofrimento e morte de animais experimentais. A tecnologia IgY também foi aprovada como método alternativo em favor do bem estar animal pelo *Office Vétérinaire Federal* da Suíça (CHACANA et al., 2004; SCHADE et al., 2005).

## 2.1 Sistema imune humoral nas galinhas

A semelhança dos demais vertebrados, as galinhas também produzem anticorpos específicos para proteção contra organismos invasores. Uma vez estimuladas por antígenos e com assistência apropriada das células T helper, as células B se diferenciam em células plasmáticas produtoras de anticorpos. Todavia, o desenvolvimento das células B nas aves é diferente quando comparado ao dos mamíferos.

As células B precursoras, originadas das células tronco, crescem primeiramente no saco vitelino e, subsequentemente, na medula óssea. Essas células pré-B migram da medula óssea para um órgão único das aves denominado Bursa de Fabricius, localizado próximo à cloaca (TIZARD, 2002).

A Bursa de Fabricius alcança seu tamanho máximo entre 8-10 semanas, após a eclosão dos ovos e involui gradativamente (CIRIACO et al., 2003). A remoção cirúrgica da Bursa promove diminuição importante na concentração de anticorpos circulantes, o desaparecimento das células B e das células plasmáticas. A bursectomia no início do estágio embrionário leva a geração de poucas células precursoras, incapazes de produzir anticorpos específicos em resposta a um antígeno. A Bursa de Fabricius não é indispensável para a produção de moléculas de anticorpos, mas apresenta um papel crítico na criação, diversificação e expansão do repertório dessas moléculas. É na Bursa que os genes das imunoglobulinas presentes na superfície das células B são rearranjados e sua diversidade aumenta para que as aves possam responder a uma enorme variedade de antígenos nesse ambiente. Essa diversificação, isto é, o desenvolvimento do repertório de anticorpos, ocorre dentro dos folículos bursais, por um processo chamado conversão gênica (RATCLIFFE, 2006).

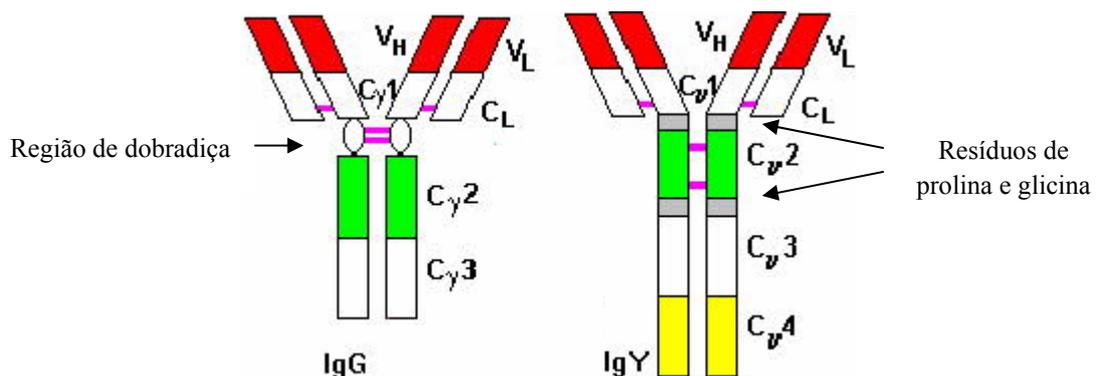
Somente após seu amadurecimento no microambiente da Bursa, as células B já maduras migram para os órgãos linfóides secundários, onde podem encontrar antígenos externos e secretar anticorpos. Dependendo do antígeno e do ensaio sorológico utilizado, anticorpos são usualmente detectados no soro entre 4 a 8 dias após a administração do antígeno (TIZARD, 2002).

Anticorpos são glicoproteínas altamente conservadas em sua estrutura geral (4 cadeias peptídicas, sendo 2 pesadas e 2 leves) que pertencem à superfamília das imunoglobulinas. Cada anticorpo é formado por dois pares de cadeia pesada e dois pares de cadeia leve e, cada cadeia é codificada pelo seu próprio locus gênico específico. Ao contrário dos mamíferos, que possuem dois diferentes loci para codificar cadeia leve (tipo kappa e lambda), as galinhas têm apenas um locus para cadeia leve (tipo lambda). As galinhas também possuem apenas um locus para cadeia pesada com três genes para região constante. Cada gene codifica uma cadeia pesada ( $\mu$ ,  $\alpha$  e  $\nu$ ) gerando três classes de imunoglobulinas IgM, IgA e IgY, respectivamente (TIZARD, 2002).

**Imunoglobulina M:** a estrutura e as propriedades da IgM das galinhas são similares às dos mamíferos. É uma imunoglobulina polimérica (900 kDa), formada por cinco monômeros, embora uma pequena quantidade de IgM monomérica (180 kDa) pode ser detectada. Além de ser predominante no soro, a IgM também é encontrada no líquido seminal, na bile, no conteúdo intestinal e na clara dos ovos. Por ser multivalente, a IgM é mais eficiente que a IgY nos testes de aglutinação e sua concentração no soro varia de  $0,71 \pm 0,18$  mg/mL a 1,25 mg/mL (TIZARD, 2002).

**Imunoglobulina A:** a IgA é predominante nas secreções intestinal e respiratória e na clara do ovo, sendo responsável pela proteção das mucosas contra invasões microbianas. A IgA existe nas formas dimérica (340 kDa), contendo cadeia J, e monomérica (170 kDa). A IgA é produzida nos tecidos linfóides difusos da vesícula biliar e no trato intestinal superior, sendo encontrada em alta concentração na bile e no fluido intestinal, na forma de IgA secretória (IgA complexada a uma peça secretória de 350 kDa). A concentração sérica da IgA está em torno de 0,6 mg/mL (TIZARD, 2002).

**Imunoglobulina Y:** a IgY é o anticorpo predominante no soro das galinhas (4,5 a 5,0 mg/mL) e corresponde a IgG dos mamíferos. De forma análoga a IgG, a estrutura da IgY é composta de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, com peso molecular em torno de 180 kDa. A cadeia leve da IgY pesa em torno de 18 kDa e o seu fragmento Fab, pesa em torno de 45 kDa (SUN et al., 2001). Sua cadeia pesada ( $\nu$ ), com peso molecular entre 65-105 kDa, apresenta certa homologia entre seus domínios constantes com os da IgG de mamífero, mesmo possuindo um domínio constante a mais (BIZANOV; JONAUSKIEN, 2004). Além desse domínio constante a mais, a região de dobradiça da IgY não é desenvolvida como na IgG de mamíferos mas, os resíduos de prolina (ácido pirrolidino-2-carboxílico) e glicina existentes entre as regiões  $C_{\nu 1}$ -  $C_{\nu 2}$  e  $C_{\nu 2}$ -  $C_{\nu 3}$  possibilitam a flexibilidade limitada do fragmento Fab da IgY, conforme podemos observar na figura 1 (NARAT, 2003).



**Figura 1.** Estrutura das imunoglobulinas de mamífero (IgG) e de galinhas (IgY) (<http://www.mcmaster.ca/inabis98/immunology/szabo0509/two.html>).

Estudos estruturais e da seqüência protéica indicam que a IgY ocorre nas classes dos anfíbios, répteis e aves, diferentemente da IgG, presente somente em mamíferos (WARR et al., 1995). A molécula IgY é mais hidrofóbica do que a IgG, apresenta ponto isoelétrico entre 5,7-7,6, é mais sensível à desnaturação ácida (perde completamente sua atividade na faixa de pH entre 3 e 4) do que a desnaturação térmica, sendo estável a temperaturas acima de 60 °C (JARADAT; MARQUARDT, 2000; DAVALOS-PANTOJA et al., 2000). Apresenta estabilidade variável em diferentes temperaturas de conservação; mantida em temperatura ambiente, a meia vida da IgY é superior a 6 meses e a 37 °C é de apenas um mês. Quando congelada a -70°C por 12 meses, a IgY perde aproximadamente 50% de sua atividade, enquanto congelada a -20°C, pelo mesmo período, a perda é mínima (LEE et al., 2002; STAAK et al., 2001).

## 2.2 Resposta de anticorpos

A resposta de anticorpos em aves é geralmente similar à observada em mamíferos. A IgM é formada predominantemente durante a resposta imune primária, sendo detectada 72 horas após a inoculação de um antígeno; entretanto, a resposta é curta. Após uma única inoculação de um antígeno protéico, ocorre um pico de IgM entre o 4º e 8º dias, que declina rapidamente e é acompanhada pela produção de anticorpos IgY. Entretanto, a qualidade e quantidade dessa resposta dependem de diversos fatores como: dose do imunógeno, tipo de adjuvante, via de aplicação, linhagem da galinha, idade e manejo (SCHADE et al., 2005).

A dose de antígeno utilizada para imunização é bastante variada. Vários autores tiveram bons resultados utilizando 0,010 a 1,0 mg de antígeno ou então  $10^9$  células/mL, no caso de bactérias. Esta dose pode ser associada a um adjuvante para melhorar a resposta imunológica (SCHWARZKOPT et al., 2001; AMARAL et al., 2002; KINDLEIN, 2002).

Os adjuvantes são moduladores que estimulam as células B de forma independente e não específica. Eles promovem resposta imune celular e humoral e induzem uma memória imunológica de melhor magnitude. O processo inflamatório local gerado pelos adjuvantes possibilita uma liberação prolongada do antígeno tendo desta forma um efeito prolongado. O adjuvante mais empregado em experimentação animal é o adjuvante de Freund, sendo mais tolerado em galinhas do que coelho (SCHWARZKOPT et al., 2001; SCHADE et al., 2005).

Atualmente, a via de administração mais comum para imunização em galinhas é a intramuscular, mas há autores que utilizam outras vias, como: subcutânea, endovenosa ou oral. No caso da via endovenosa, não se pode associar adjuvante e a aplicação tem que ser feita de forma lenta para evitar choque anafilático (SCHADE et al., 2005).

Outro fator que influencia no sucesso de uma imunização é o intervalo entre a administração das doses. Há autores que fazem as administrações com zero, 14 e 28 dias, outros inoculam uma vez por semana, durante sete semanas consecutivas, ou então com intervalo de dez dias, entre as doses de reforço. Como visto, existem distintos protocolos, porém o mais importante é que esses intervalos sejam suficientes para o desenvolvimento da memória imunológica. Inoculações frequentes e em intervalos de tempo curtos podem resultar na depressão do sistema imune (SCHADE et al., 2005).

Além de todos os cuidados com o preparo do imunógeno, deve-se ter em mente que a resposta imune pode ser influenciada por fatores nutricionais, genéticos ou relacionados ao manejo.

Os níveis de nutrientes ótimos para o crescimento, ganho de peso e conversão alimentar máximo não são suficientes para uma resposta imune adequada (KLASING, 1998). Para alcançar uma resposta imune eficiente, são necessários níveis mais altos de alguns ingredientes do que realmente é recomendado para crescimento e produção. Por outro lado, alguns elementos presentes na dieta das aves podem alterar a resposta imune, como: metais pesados, micotoxinas e contaminantes (MORGULIS, 2002).

A seleção genética, objetivando inicialmente o ganho de peso e conversão alimentar, acabou por selecionar aves que produzem menos anticorpos que linhagens utilizadas na década de 50. Os hormônios também são capazes de alterar diversos parâmetros da resposta

imune; desta forma aves altamente produtoras de anticorpos possuem baixos níveis de testosterona (MORGULIS, 2002).

O manejo incorreto promove a liberação de altas cargas de corticosterona, podendo ocasionar a involução dos tecidos linfóides (timo, bursa de Fabrício e baço) e a supressão da imunidade humoral e celular. Por isso, os cuidados com o manejo de luz, alimentação, higiene e vacinações se iniciam nas primeiras semanas de vida (EDANS et al., 1983; GLICK, 1980; GROSS et al., 1980; SIEGEL, 1971).

### **2.3 Transferência passiva da imunidade em galinhas**

A transferência de imunoglobulinas da mãe para o filho é comum em muitas espécies de vertebrados (BRAMBELL, 1970). Em mamíferos, essa transferência passiva ocorre no útero ou após o nascimento, através da ingestão do colostro ou leite. Em ambos os casos, a IgG é transportada através de uma barreira celular, via transcitose, por um receptor específico para a fração constante da IgG, denominado FcRn (GHETIE; WARD, 2000). Todavia, a transferência passiva da imunidade não está confinada aos mamíferos, ocorrendo também em aves e em alguns répteis (TIZARD, 2002).

Em galinhas, os recém-nascidos emergem de um ambiente estéril (ovo) e, como acontece nos mamíferos, necessitam de uma assistência imunológica temporária para sobreviverem a um ambiente inóspito. As imunoglobulinas séricas são rapidamente transferidas do soro para o ovo ainda em formação no ovário da ave. A IgY é transportada ativamente para gema, através do epitélio folicular. As imunoglobulinas se ligam a um receptor específico, denominado FcRY, homólogo ao receptor para fosfolipase A2 e distinto do receptor FcRn dos mamíferos (WEST et al., 2004). A quantidade transferida está relacionada com a concentração no soro sanguíneo da galinha, sem nenhum tipo de seleção prévia para sua especificidade (MOHAMMED et al., 1998; MORRISON et al., 2001; KITAGUCHI et al., 2007). Quando o ovo passa pelo oviduto, a IgM e a IgA presentes nas secreções do oviduto são incorporadas, junto com a albumina, à clara do ovo, em quantidades limitadas (CARLANDER et al., 2002).

Para que haja transferência da IgY para a gema, é necessário que a fração Fc da imunoglobulina esteja intacta, já que é preciso a ligação desta fração com receptores específicos presentes no epitélio do oócito (MORISSON et al., 2001; DE SOUSA, 2008). Acredita-se também, que as imunoglobulinas IgA e a IgM de galinha são excluídas da gema do ovo devido a sua característica estrutural (KITAGUCHI et al., 2007).

Em resposta a uma imunização, os anticorpos séricos e da gema podem ser detectados após um período de sete a dez dias, respectivamente; porém, flutuações podem ocorrer no período de aparecimento e nos níveis desses anticorpos. A vida média da IgY na circulação de uma galinha adulta é curta e varia entre aproximadamente 36 a 65 horas (PATTERSON et al., 1962; WOOLLEY; LANDON, 1995). A concentração de IgY na gema independe do tamanho do ovo e é proporcional a concentração de IgY no soro materno, podendo variar entre 10 e 20 mg/mL de gema e de 100 a 400 mg de IgY por ovo. Esta variação depende da linhagem genética ou raça da ave e do seu biorritmo (CARLANDER et al., 2002; DOHMS et al., 1978).

Com o desenvolvimento embrionário, o pinto absorve a IgY da gema, que passa para a circulação sanguínea. As IgA e IgM maternas se difundem através do líquido amniótico e são ingeridas pelo embrião de forma que ao nascimento, o pinto possui a IgY no soro e IgM e IgA na mucosa do intestino (TIZARD, 2002).

#### **2.4. Composição da gema do ovo**

A gema do ovo é constituída de matéria seca (51,3%) e água (48,7%), totalizando 36% do peso de um ovo fresco de galinha. Seus principais componentes são lipídios e proteínas, em torno de 65% e 33% do peso seco da gema, respectivamente. Os lipídios da gema estão exclusivamente associados às proteínas e são compostos de triglicerídeos (62%), fosfolipídios (33%), colesterol (< 5%) e carotenóides (< 1%). As proteínas estão presentes na forma livre ou como apoproteínas (associadas a lipídios). Essa interação entre proteínas e lipídios resulta na formação de lipoproteínas de baixa e alta-densidade, os quais representam o principal constituinte da gema. Desta forma, com base no seu peso seco, a gema é formada por cinco constituintes principais: 68% de lipoproteínas de baixa-densidade (LDL), 16% de lipoproteínas de alta-densidade (HDL), 10% de proteínas globulares (livetinas), 4% de fosfoproteínas (fosfovitina) e 2% de proteínas menores (ANTON, 2007).

Dentro da fração protéica existe um conjunto de proteínas denominadas livetinas que são divididas em  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -livetinas. A proporção entre as três livetinas na gema é 2:5:3, respectivamente. Todas as livetinas são solúveis em água e correspondem as proteínas séricas. O principal componente da  $\alpha$ -livetina é a albumina, enquanto a  $\alpha$ -2-glicoproteína é o principal componente das  $\beta$ -livetinas. A IgY é a fração predominante das  $\gamma$ -livetinas, encontrada exclusivamente na gema dos ovos (SCHADE; CHACANA, 2007).

A gema pode ser facilmente separada em duas frações após diluição com NaCl a 0,3 M e uma centrifugação a 10.000 xg, por 30 minutos. Por este método, pode-se observar um sobrenadante amarelo escuro, chamado plasma, e um sedimento pálido, denominado grânulo. Os grânulos representam 19-23% do peso seco da gema, contendo em torno de 70% de HDL, 16% de fosfovitina e 12% de LDL. O plasma representa 77-81% do peso seco da gema, sendo composto de 85% de LDL, 15% de livetina (ANTON, 2007).

#### **2.5 Purificação de IgY**

Diversas técnicas, separadamente ou em combinação, podem ser utilizadas para isolar a IgY da gema com objetivo de se obter quantidade, pureza e/ou atividade biológica. A extração de IgY pode ser obtida por precipitação com sais, cromatografia de afinidade ou ultrafiltração, mas primariamente utilizam-se solventes orgânicos, substâncias hidrófilas ou congelamento a -20 °C, para separar a fase aquosa da gema, onde se encontra a IgY, da fase lipídica (STAAK et al., 2001).

O polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) é um polímero de alto peso molecular formado a partir do etileno glicol. O uso desse polímero para extração de IgY da gema foi introduzido por Polson et al. (1980) sendo considerado um método padrão. Akita e Nakai (1993)

utilizaram o PEG-6000 para precipitação da IgY, em função da vantagem de se trabalhar em temperatura ambiente, sem nenhum risco de desnaturação do anticorpo.

Outros métodos de purificação vêm sendo empregados isoladamente ou em conjunto: precipitação com sulfato de amônio (SCHWARZKOPF; THIELE, 1996), ácido caprílico (MCLAREN et al., 1994; CHACANA et al., 2003), sistemas de ultrafiltração (KIM; NAKAI, 1998) e cromatografia de afinidade (MEULENAER; HUYGHEBAERT, 2001). A escolha de um ou outro método de extração irá depender da infra-estrutura de cada laboratório, considerando suas facilidades e limitações como também, o grau de pureza e o rendimento do processo.

## 2.6 Utilização da IgY como imunobiológico

Em relação à tecnologia convencional de produção da IgG, existem diversas características que tornam vantajosa a utilização da IgY como imunobiológico empregado na pesquisa biomédica, na Medicina Veterinária e Humana e no diagnóstico, a saber:

2.6.1. Estabilidade: a IgY mostra-se mais estável a variação de temperatura, podendo ser estocada em solução salina 0,85% a 4°C com 0,02% de azida sódica por até 10 anos. Além disso, anticorpos biotinizados e purificados por imunoafinidade mantiveram sua reatividades quando estocados a 4°C, por cinco anos. Até mesmo no ovo, *in natura* estocado a 4°C, preserva sua atividade, por pelo menos seis meses (OLOVSSON; LARSSON, 1993).

2.6.2. Rendimento: o rendimento de IgY é muito superior ao rendimento da IgG obtida em mamíferos, variando conforme os protocolos de imunização e de purificação empregados. Svendsen et al. (1996), conseguiram um rendimento de 5 a 10 vezes superior ao da IgG produzida em um coelho, dependendo do adjuvante utilizado durante a imunização. Segundo Gottstein e Hemmeler (1985), a quantidade de IgY purificada produzida em um mês foi 18 vezes maior que a IgG isolada do soro de um coelho imunizado com o mesmo antígeno. Ntakarutimana et al. (1992) afirmaram ainda, que 4 mg de IgY específica para transferrina humana foram extraídas de um único ovo, enquanto que coelhos imunizados com o mesmo antígeno produziram somente 1,74mg/mL de IgG no soro.

2.6.3. Distância filogenética da IgG de mamífero: devido à distância genética entre aves e mamíferos, antígenos de mamíferos inoculados em aves geram uma resposta imune forte, com elevada afinidade e avidéz, sendo necessárias menores quantidades de antígenos e de tempo de inoculação, quando comparados aos utilizados nos mesmos processos com uso de mamíferos (GASSMANN et al., 1990; ROSOL et al., 1993; WOOLLEY; LANDON, 1995). Por esta razão, o uso de mamíferos não é viável na produção de anticorpos para proteínas altamente conservadas de mamíferos. Com a distância evolutiva entre aves e mamíferos, proteínas conservadas de mamíferos têm maior probabilidade de serem detectadas como “não próprias” pelo sistema imune de uma ave, que podem ainda detectar mais epítomos nessas mesmas proteínas.

2.6.4. Incapacidade da ativação do Sistema Complemento de mamíferos: a capacidade da IgG ativar o complemento pode influenciar nos resultados de um teste imunológico. Segundo Campbell et al. (1980), quando há ativação da cascata do complemento, o componente C4 ativado pode ligar-se ao fragmento Fab da IgG, podendo interferir com a

ligação do antígeno e gerar resultados subestimados ou falso-negativos. Gigli e Austen, em 1971, constataram que a IgY é incapaz de ativar as proteínas do sistema complemento do soro de coelhos, cobaias, bovinos, ratos, caprinos, cães e gatos, por não se ligar ao componente C1 do complemento, evitando esse problema.

2.6.5. Não se liga aos fatores reumatóides: fatores reumatóides são reconhecidamente uma das causas mais freqüentes de reações inespecíficas em testes imunológicos. Em testes de ELISA direto, esta ligação pode ocasionar resultados falso-positivos; contudo, a IgY não tem afinidade com fatores reumatóides, não sendo capaz de gerar resultados falso-positivos no ELISA (LARSSON et al., 1991).

2.6.6. Não se liga a receptores celulares de Fc de anticorpos: o fragmento cristalizável (Fc) de anticorpos de mamíferos contém um domínio responsável pela ligação a receptores celulares. Alguns receptores celulares têm alta afinidade por IgG mamífero e, quando se trabalha com cultivo celular, a interação com receptores para Fc pode causar uma ativação celular e mudar a expressão de proteínas de superfície nesta célula. Tal fato dificulta o estudo de outras proteínas de superfície celular por citometria de fluxo, imunohistoquímica (LINDAHL et al., 1992). A IgY não é reconhecida por receptores celulares para Fc, o que credencia essa imunoglobulina como anticorpo primário em ensaios envolvendo componentes celulares (ROSOL et al., 1993; SCHIMIDT et al., 1993; MOTOI et al., 2005).

2.6.7. Não se liga a receptores bacterianos para Fc: proteínas A e G são proteínas bacterianas amplamente usadas como imunoabsorventes em ensaios imunológicos devido à sua habilidade de se ligar ao Fc da IgG. Entretanto, estas proteínas podem constituir um problema, quando encontradas em amostras bacterianas. Neste caso, sua ligação a anticorpos com especificidade para outros tipos bacterianos pode ocorrer, levando a resultados falso-positivos. Hoffman et al. (1996) demonstraram que a IgY não reage com tais proteínas, não interferindo, em testes imunológicos onde estas proteínas estão presentes.

2.6.8. Bem-estar animal: uma grande vantagem em se trabalhar com anticorpos presentes na gema de ovos de galinhas está relacionada ao bem-estar animal. Em se tratando dos conceitos de “reduzir, substituir e refinar”, muito discutido pelas comissões de ética em pesquisa com animais, a tecnologia IgY favorece a redução das manipulações dolorosas dos animais. A coleta de ovos é um método simples, não invasivo e reduz o número de animais utilizados na produção de anticorpos (GOTTSTEIN; HEMMELER, 1985).

2.6.9. Viabilidade econômica: a utilização de galinhas como produtoras de anticorpos policlonais é economicamente mais interessante que a utilização de mamíferos para o mesmo fim. O manejo de galinhas é considerado simples, relativamente barato. Sistemas automatizados de alimentação diminuem custos, principalmente, devido à redução do número de trabalhadores necessários. Além de produzir IgY rapidamente e em grandes quantidades, as galinhas mantêm altos níveis de anticorpos específicos por um longo período (POLSON et al., 1980).

Anticorpos policlonais de galinhas também podem representar uma alternativa de menor custo, tempo e trabalho em relação ao uso de anticorpos monoclonais. Em 1991, Kunz et al compararam o uso da IgY e de anticorpos monoclonais específicos para clamídias, em cortes histológicos de diversos órgãos e espécies animais, por imunohistoquímica. A ausência de diferença significativa entre os dois tipos de imunoglobulinas usadas, recomenda o uso da IgY em substituição aos anticorpos monoclonais.

2.6.10. Aplicações na pesquisa biomédica e na medicina veterinária e humana: todas as vantagens acima citadas credenciam a IgY como anticorpo para uma variedade de campos da pesquisa. Ensaio imunológico como ELISA e RIA, empregando IgY, vêm sendo utilizados na quantificação de proteínas e peptídeos na pesquisa básica e no diagnóstico clínico. Os anticorpos IgY são usados com sucesso na imunohistoquímica para detecção de antígenos virais, bacterianos, de plantas ou de origem animal, na pesquisa de parasitas intestinais em animais domésticos e na contaminação de alimentos por toxinas ou drogas. Durante a década passada, a IgY passou a ser empregada em um novo contexto, como “alimento funcional” na terapia e profilaxia de infecções intestinais, da fibrose cística, da colite e da doença celíaca, de doenças que atingem peixes, de envenenamentos e, na prevenção da cárie dentária (ANTON, 2007).

No futuro, devido a todas as vantagens da tecnologia IgY (baixo custo de produção; elevado título de anticorpos; estabilidade térmica; elevada especificidade; possibilidade de conjugação a enzimas, corantes fluorescentes ou outros sistemas de revelação; uso em kits para pesquisa de antígenos, determinantes celulares ou imunoglobulina espécie-específica e, emprego em sistemas de imunodiagnóstico automatizados), os anticorpos aviários serão amplamente utilizados pela ciência, incluindo a Medicina Veterinária e Humana.

## 2.7 Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença parasitária de distribuição mundial, transmitida para humano por um grupo de aproximadamente 30 espécies de flebotomos infectados pelo protozoário do gênero *Leishmania*. Estima-se que dois milhões de novos casos ocorrem todo ano no mundo e que 1,5 milhões de casos são de leishmaniose cutânea. Acredita-se que o número de pessoas infectadas exceda a 12 milhões, já que os dados oficiais são subestimados pela falta de diagnóstico, grupo de indivíduos assintomáticos e pela falta de notificação obrigatória de leishmaniose (WHO, 2007). Uma classificação recente da Organização Mundial de Saúde (OMS) elevou as leishmanioses à categoria I do Programa de Doenças Tropicais, referente a doenças emergentes e fora de controle (REMME et al., 2002). Atualmente é considerada a 3ª doença em importância mundial com transmissão por vetor (REITHINGER; DAVIES, 2002).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) está entre as endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido a sua ampla distribuição pelo território nacional, pela ocorrência de formas clínicas graves e pelas dificuldades referentes, tanto ao diagnóstico como ao tratamento das mesmas. No Brasil, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. braziliensis*) e *L. (Leishmania) amazonensis* (*L. amazonensis*) são as espécies mais amplamente distribuídas (DORVAL et al., 2006).

O primeiro relato na história da descoberta do gênero *Leishmania* foi feito por Cunningham (1885), na Índia, em casos de leishmaniose visceral. No Brasil, Lindenberg, em 1909, encontrou pela primeira vez formas de leishmania em lesões cutâneas e nasofaríngeas idênticas a *L. tropica* (Wright, 1903) da leishmaniose do Velho Mundo. Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o batizou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcer de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir”. No Brasil, até a década de 70, todos os casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação

dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas como causadoras da LTA (apud BASANO; CAMARGO, 2004), conforme o quadro 1.

**Quadro 1:** Espécies de *Leishmania* que causam doenças em humano.

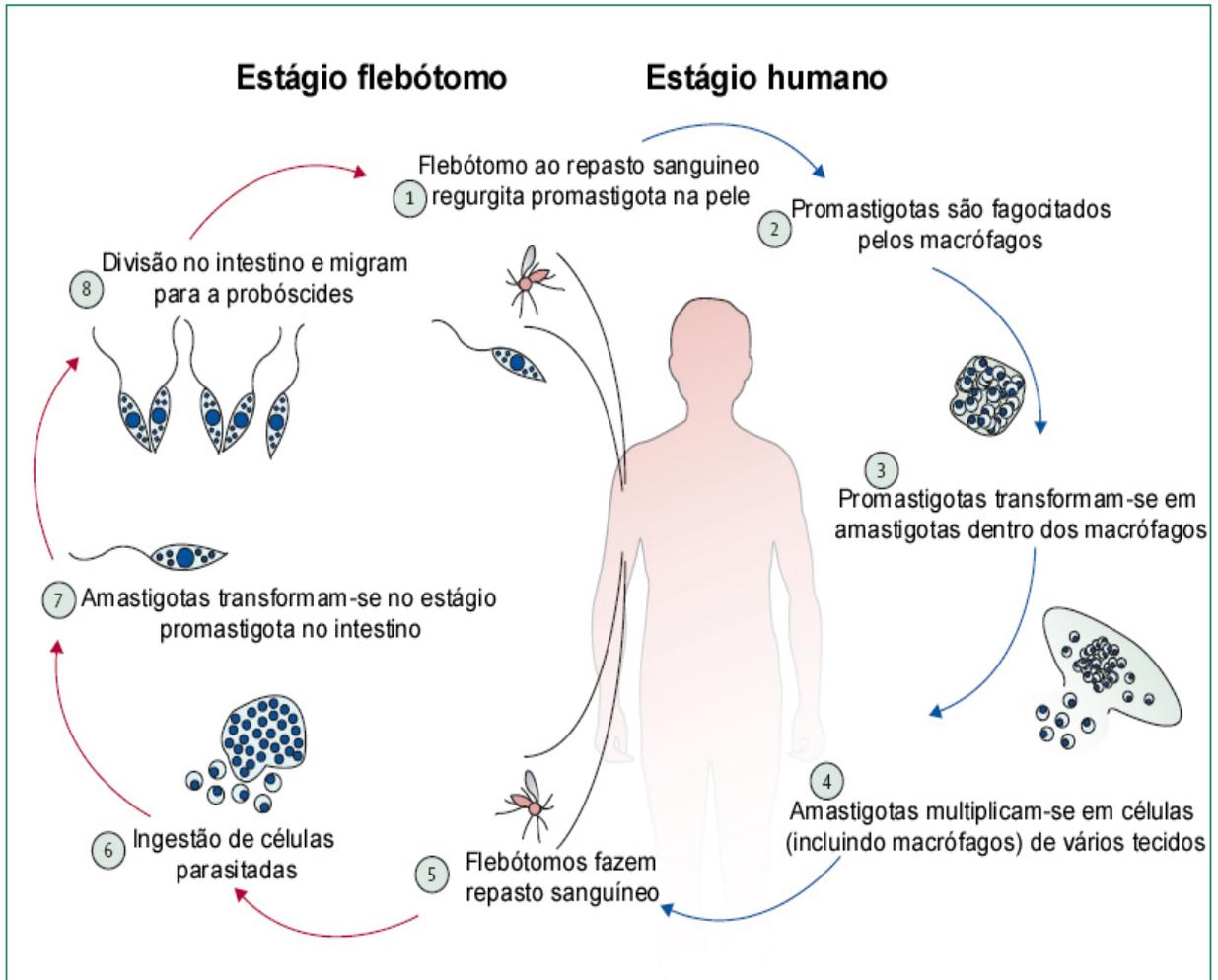
	Principal Patologia Clínica	Ciclo de transmissão	Distribuição Geográfica
<b>Leishmania spp. no Novo Mundo</b>			
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LCL, mucosa	Zoonótico	América do Sul, parte da América Central, México
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LCL, mucosa	Zoonótico	Norte da América do Sul, Sudeste da América Central
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LCL	Zoonótico	Peru
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LCL	Zoonótico	América do Sul
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LCL	Zoonótico	América do Sul
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LCL	Zoonótico	Norte da América do Sul
<i>L. (leishmania) amazonensis</i>	LCL, DCL	Zoonótico	América do Sul
<i>L. (leishmania) mexicana</i>	LCL, DCL	Zoonótico	América Central, México, Estado Unidos
<i>L. (leishmania) pifanoi</i>	LCL	Zoonótico	América do Sul
<i>L. (leishmania) venezuelensis</i>	LCL	Zoonótico	Norte da América do Sul
<i>L. (leishmania) garnhami</i>	LCL	Zoonótico	América do Sul
<b>Leishmania spp. no Velho Mundo</b>			
<i>L. (leishmania) aethiopica</i>	LCL, DCL	Zoonótico	Etiópia, Kenia
<i>L. (leishmania) killicki</i>	LCL	Zoonótico	Norte da África
<i>L. (leishmania) major</i>	LCL	Zoonótico	Ásia Central, Norte da África, Oriente médio, Ásia Oriental
<i>L. (leishmania) tropica</i>	LCL	Antroponótico	África, Ásia Central, Sudeste da Ásia
<i>L. (leishmania) donovani</i>	Visceral, LCL	Antroponótico	
<b>Leishmania spp. no Velho e Novo Mundo</b>			
<i>L. (leishmania) infantum</i>	Visceral, LCL	Zoonótico	Europa, Norte da África, América Central, América do Sul
LCL: leishmaniose cutânea localizada. DCL: leishmaniose cutânea difusa. Sudeste da Ásia inclui o subcontinente Indiano e China			

Fonte: Reithinger et al., 2007

## 2.8 Ciclo

A leishmaniose é uma doença geralmente zoonótica causada por protozoários digenéticos da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. É um parasito heteroxeno que necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Um dos hospedeiros é o canídeo doméstico ou silvestre e o homem. Esse último geralmente participa como hospedeiro acidental, exceto nas formas antroponóticas da doença no Velho Mundo. O outro hospedeiro é invertebrado díptero hematófago pertencente à família *Phlebotomidae*, gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e o gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) (SILVA, 2007; CHAVES, 2003; REY, 2002).

As espécies do gênero *Leishmania* possuem formas distintas durante seu ciclo de vida: formas amastigotas e promastigotas (Figura 1). As formas amastigotas são estruturas arredondadas ou ovaladas sem flagelos livre, que parasitam o hospedeiro vertebrado em seu sistema monocitário. Alojам-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos onde vivem e se multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula. A disseminação do parasito é pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a quimiotaxia de outros macrófagos gerando um ciclo vicioso (BASANO; CAMARGO, 2004). As formas promastigotas são alongadas e apresentam um longo flagelo livre. Essas formas vivem no trato alimentar das fêmeas hematófagas dos flebotomíneos. (DEANE, 1956; IVERSON et al., 1983; MARZOCHI et al., 1985; TESH, 1995).



**Figura 2.** Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.

Fonte: Reithinger et al., 2007

## 2.9 Epidemiologia da Leishmaniose cutânea

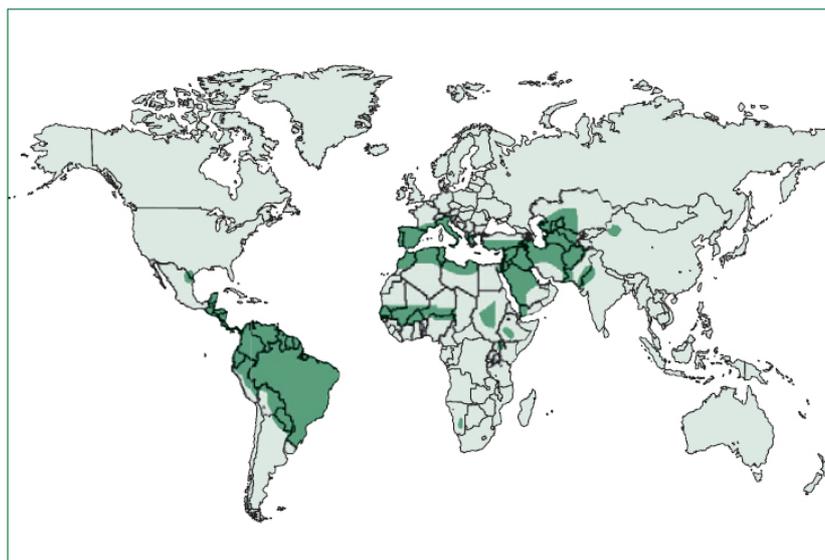
Cada espécie de *Leishmania* tem peculiaridades quanto aos seus reservatórios e vetores, distribuição geográfica, condições de transmissão e doença que causam no homem e animais. Todos os aspectos devem ser bem compreendidos para a implementação das medidas de controle e prevenção cabíveis. Muitas vezes a aplicação dessas medidas é dispendiosa e não viáveis, como é o caso do combate ao hospedeiro intermediário (*Lutzomyia flaviscutellata*) de *L. amazonensis*, cujo habitat é a floresta (CHAVES, 2003).

A leishmaniose cutânea tem como agentes a *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e dermatropic *L. infantum* no Velho Mundo. Os agentes no Novo Mundo são a *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. venezuelensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi* e *L. infantum* (*Leishmania* subgênero) dermatrópica (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

A leishmaniose cutânea no Velho Mundo ocorria geralmente em clima semi-árido e desértico; já no Novo Mundo, está associado a florestas. Esta última está adaptada a ambientes silvestres, domésticos e peridomésticos, disseminando-se em áreas não endêmicas

devido à urbanização, desmatamento e práticas agrícolas. Além disso, dificuldades econômicas, desastres naturais, conflito armado e turismo, fazem com que a população migre para áreas endêmicas de leishmaniose cutânea (REITHINGER et al., 2007).

Os maiores focos de leishmaniose cutânea estão localizados na África, Ásia e a na maioria dos países da América Latina. No Brasil a leishmaniose cutânea apresenta ampla distribuição. No caso da *L. amazonensis*, descrita originalmente na região Amazônica brasileira, observa-se uma vasta distribuição geográfica em diferentes estados do Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Guiana Francesa, Panamá e Venezuela, como pode ser visto na figura 3 (apud REITHINGER et al., 2007).



Fonte: Reithinger et al., 2007.

**Figura 3.** Distribuição geográfica das Leishmanioses cutâneas.

Um exemplo de interação entre urbanização e leishmanioses foi documentado em Manaus, Brasil. Projetos industriais e comerciais atraíram migrantes do interior para outros estados gerando vários subúrbios a margem de florestas primárias. A ocupação dessas novas áreas urbanizadas fez com que algumas pessoas entrassem em contato com o ciclo zoonótico da *L. guyanensis*, promovendo uma nova incidência de casos de leishmaniose cutânea localizada, excedendo 1000 casos por ano (BARRETT; SENRA, 1989).

## 2.10 Sintomatologia

Embora a maioria das infecções sejam assintomáticas, o primeiro sinal da infecção, após o período pré-patente, é evidenciado por pequenos eritemas. O eritema desenvolve em uma pápula única ou múltipla que podem progressivamente ulcerar, às vezes acompanhadas de linfadenopatia localizada que se curam espontaneamente em alguns meses ou anos, desenvolvendo-se resistência à re-infecção. A leishmaniose cutânea difusa raramente ocorre e

é causada por *L. aethiopica* no Velho Mundo e, principalmente por *L. amazonensis*, mas também por *L. mexicana* no Novo Mundo, devido falha na resposta efetiva do sistema imune. É caracterizada por nódulos, que não ulceram, ricos em parasitos que se disseminam por todo o corpo, incluindo cartilagens e mucosa oronasofaríngea (MURRAY, 2005; GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

## 2.11 Diagnóstico

Durante muito tempo, pouco se sabia sobre os ciclos de transmissão da doença, mas, ao longo dos últimos anos, o campo da investigação e da aplicação da biologia molecular permitiu a realização de progressos significativos na compreensão dos diferentes elos da cadeia de transmissão. Além disso, novos testes de diagnóstico simples, práticos, viáveis e barato foram recentemente desenvolvidos. Essas técnicas estão à disposição dos países para a rápida detecção e tratamento precoce da doença (WHO, 2007). Baseia-se na identificação do parasito e em provas imunológicas. O material pode ser pele, mucosa, ou gânglios linfáticos acometidos (FUNASA, 2000).

O diagnóstico diferencial é importante em função de outras doenças que causam aspectos clínicos similares e são comuns em áreas endêmicas de leishmanioses como, lepra, câncer de pele, tuberculose e micoses cutâneas. O método parasitológico, por esfregaço e histopatologia, permanece como padrão ouro no diagnóstico da leishmaniose cutânea, por causa da alta especificidade, baixo custo e a disponibilidade em áreas endêmicas. O cultivo em cultura possibilita a identificação e a caracterização das espécies, mas requer conhecimento técnico, consome tempo e é caro. No entanto, a sensibilidade destas técnicas é baixa e pode ser variável dependendo do número e dispersão do parasito na biópsia, nas técnicas especializadas e no meio de cultura (FUNASA, 2000).

O diagnóstico molecular parasitológico (PCR) para leishmaniose cutânea foi desenvolvido extensivamente durante a década passada para detecção de casos com baixas cargas parasitárias (como nos pacientes com leishmaniose cutânea em terapia). O diagnóstico molecular parasitológico tem uma especificidade de aproximadamente 100% e sua sensibilidade é de 20 a 30% maior nas leishmanioses cutâneas localizadas quando comparada ao diagnóstico parasitológico convencional. Sua aplicabilidade ainda é prejudicada pela exigência de infra-estruturas laboratoriais, conhecimentos técnicos e custo (REITHINGER et al., 2007).

As reações sorológicas de imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA) expressam os níveis de anticorpos circulantes e são úteis, principalmente, nos casos de lesões extensas e múltiplas e nas lesões mucosas. Estas técnicas, raramente são utilizadas no diagnóstico da leishmaniose cutânea devido à sua sensibilidade e especificidade variáveis. O teste cutâneo de Montenegro tem grande valor preditivo devido à sua sensibilidade e especificidade, sendo positivo em mais de 90% dos casos de leishmaniose tegumentar americana. Nas áreas onde predomina a *L. (L) amazonensis*, a positividade pode ser mais baixa. É ocasionalmente utilizado no diagnóstico da doença cutânea para levantamento epidemiológico por ser simples, porém não distingue infecção passada da atual (REITHINGER et al., 2007; FUNASA 2000).

## 2.12 Leishmaniose cutânea em animais domésticos

Pedroso (1913) e Brumpt & Pedroso (1913) foram uns dos primeiros a observar leishmaniose cutânea em infecções naturais de cães no Estado de São Paulo, sendo considerados os cães ao longo dos anos, hospedeiros acidentais, assim como o homem (apud TOLEZANO et al., 2007; SANTOS et al., 1998; REITHINGER; DAVIES, 1999). Entretanto, após o surto nos anos 70, vários autores demonstraram presença de cães infectados com relativa frequência, especialmente na Região Sudeste. Falqueto et al. (1986) descobriu uma relação entre a presença de cães infectados com surto de novos casos humanos, sugerindo que os cães desempenham papel fundamental para a manutenção da doença nas áreas endêmicas, particularmente urbanas, atuando como principal reservatório doméstico ou elo na cadeia de transmissão humana (apud SILVA, 2007). Contudo, a importância dos cães na transmissão da LTA ainda não está esclarecida (DOS SANTOS et al., 2008).

Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) canina tem sido registrada em várias regiões do Brasil, como Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais, Bahia e Amazonas (TAFURI et al., 1993). O Serviço de Zoonoses - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (IPEC) - FIOCRUZ vem observando no Rio de Janeiro, a ocorrência de um número crescente de casos caninos de LTA, sugerindo que essa doença venha ocorrendo com certa frequência na região (DOS SANTOS et al., 2008).

A LTA é uma doença de evolução crônica. As lesões cutâneas geralmente são úlceras únicas, eventualmente múltiplas, indolores, com bordos elevados e fundo granuloso, com ou sem exsudato, podendo ocorrer à formação de crostas. Essas lesões estão localizadas no nariz, orelhas e bolsa escrotal. Os membros e cauda são acometidos ocasionalmente e pode estar associado à pele e as mucosas (DOS SANTOS et al., 2008).

O diagnóstico da LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial da LTA canina pode ser realizado por métodos parasitológicos (diretos e indiretos), imunológicos e moleculares, semelhantes aos realizados na doença humana (REY, 2002). A esporotricose vem se tornando o principal diagnóstico diferencial para LTA canina no Rio de Janeiro, devido à sobreposição de áreas endêmicas e à semelhança clínica entre ambas as doenças em diferentes estágios de infecção (DOS SANTOS et al., 2008).

Em relação à leishmaniose felina, vários estudos de diferentes partes do mundo têm descrito a infecção em gatos. No Brasil há ocorrência de leishmaniose cutânea felina por *L. amazonensis* (DE SOUZA et al., 2005), leishmaniose cutânea felina americana por *L. brasiliensis* (SCHUBACH et al., 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais experimentais e ovos

Este trabalho foi realizado de acordo com as normas éticas do Conselho de Medicina Veterinária (RESOLUÇÃO Nº 879, 2008) sendo submetido (processo nº. 013771) à Comissão de Ética da UFRRJ.

Duas galinhas de postura da linhagem comercial *Hy-line*, variedade *Brown*, com 16 semanas de idade, vacinadas de acordo com o quadro 2 e oriundas da granja Mayra no município de Pedralva/MG, foram gentilmente doadas pelo Instituto de Zootecnia da UFRRJ. As galinhas foram mantidas no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Veterinária da UFRRJ, em gaiolas individuais próprias para galinhas de postura, com água à vontade. A ração foi balanceada de acordo com as necessidades nutricionais padronizadas, conforme especificação da Dra. Cristina Amorim Ribeiro de Lima, do Departamento de Nutrição Animal do Instituto de Zootecnia, UFRRJ.

**Quadro 2.** Vacinação das galinhas da linhagem comercial Hy-line variedade Brown recebidas para experimentação.

Data de Vacinação										
Vacinação	22/02*	28/02	12/03	20/03	22/03	27/03	21/04	26/04	29/05	05/06
Marek	x									
Bouba	x <sup>a</sup>							x <sup>b</sup>		
Newcastle		x		x			x			
Bronquite H-120		x		x			x			
Gumboro CT		x	x	x						
Coriza					x <sup>c</sup>				x <sup>d</sup>	
SDS						x				
Encefalomielite								x		
EDS New Bronz Vac										x

\* primeiro dia de idade; a. Bouba suave; b. Bouba forte; c. Coriza aquosa; d. Coriza oleosa, SDS (Pneumovirose aviária), EDS New Bronz vac (Doença de newcastle, bronquite infecciosa e síndrome da queda de postura).

O manejo de luz (fotoperíodo) para estimular a postura de ovos foi iniciado quando as aves completaram 19 semanas de idade. Na primeira semana, as aves receberam 14 horas diárias de luz. Nas quatro semanas seguintes foram acrescentados 30 minutos de luz por semana, atingindo 16 horas diárias. Nas três semanas posteriores, adicionou-se mais 20 minutos de luz por semana, completando 17 horas de luz por dia.

Para avaliação dos métodos de extração de IgY (sulfato de amônio e PEG-6000), foram empregados ovos comuns brancos adquiridos no comércio.

### 3.2 Antígeno (*L. amazonensis*)

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM /BR/75/Josefa) foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da UFRJ. As culturas foram mantidas a 26°C em meio *Schneider's Insect Medium* (Sigma, Saint Louis, MO), suplementado com 10% de urina humana e 10% de soro fetal bovino (Cripion, SP, Brasil) inativado a 56 °C, por 30 minutos. As culturas foram mantidas por repiques a cada três dias, com inóculos de 5 a 10% v/v.

### 3.3 Imunização

**Preparo dos inóculos para as imunizações:** suspensões de formas promastigotas de *L. amazonensis*, na fase estacionária (cinco ou seis dias de cultivo), foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada (SST), pH 7,2 para remoção do meio de cultura e inativados com paraformolaldeído a 2% (Sigma), por 1 hora, em temperatura ambiente (TA). Após a inativação, foi realizada uma centrifugação de 1922 xg por 13 minutos, a TA. O sedimento foi ressuspenso e lavado duas vezes com SST, pH 7,2. Após a lavagem, o número de parasitas foi determinado por contagem em câmara de *Newbauer*.

Para cada imunização das aves (23 semanas de idade) utilizou-se uma solução contendo aproximadamente  $10^7$  formas promastigotas de *L. amazonensis* misturado com adjuvante incompleto de *Freund's* (AIF) na proporção 1:1 no volume final de 1,0 mL. As inoculações foram realizadas, via intramuscular, em cinco diferentes sítios do músculo peitoral (200 µL/sítio). O intervalo de imunização foi de 14 dias em um total de três inoculações.

### 3.4 Seleção e processamento inicial dos ovos

A partir da primeira imunização, os ovos foram coletados diariamente, identificados e armazenados a 4°C até o início do processamento para extração das IgY. Os ovos das aves imunizadas e os obtidos no comércio foram quebrados e as gemas separadas e secas em papel toalha, para a remoção completa da clara. Posteriormente, as gemas foram pesadas e volume medido em proveta, individualmente.

### 3.5 Método de extração

**3.5.1 Polietilenoglicol-6000 (PEG-6000):** o método foi realizado conforme descrito por Polson et al. (1980) com modificações. Para a delipidação foi feita uma emulsão da gema, na proporção 1:3 (v/v) em SST, pH 7,5, seguida de congelamento a -20°C e descongelamento lento a 4 °C. Após esta etapa, adicionou-se o PEG-6000 a uma concentração final de 3,5% (p/v), gradualmente, sobre a gema emulsificada, sob agitação constante, por 20 minutos a TA. A mistura foi centrifugada (eppendorf centrifuge 5810R) a 14000 xg por 10 minutos, a 10°C, o sobrenadante obtido foi filtrado em filtro de papel e a camada lipídica (amarela) descartada. PEG-6000 a uma concentração final de 12% (p/v) foi adicionado ao filtrado, lentamente, sob agitação constante, por 20 minutos na TA, seguido de centrifugação (eppendorf centrifuge 5810R) a 14000 xg por 10 minutos, a 10 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense com SST, pH 7,5, ao volume original da gema e adicionado uma concentração final de 12% (p/v) de PEG-6000, como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 2,0 mL de SST, pH 7,5, sendo dialisado contra SST, pH 7,5 empregando membrana de diálise (*Spectrum*, MWCO: 25.000 Da).

**3.5.2 Método de extração por sulfato de amônio:** o método a seguir foi descrito por Bizanov e Jonauskiene (2003) e Moreira (2007). Para a delipidação foi feita diluição da gema na proporção 1:5 (v/v) em água destilada, pH 5,0, seguida de congelamento a -20°C e descongelamento lento a 4°C. Em seguida, foi realizada centrifugação (Sigma 4k15) a 800 xg, por 40 minutos, a 10 °C, e o sobrenadante filtrado em papel de filtro. Após filtração, sulfato de amônio a uma concentração final de 25% (p/v) foi adicionado, lentamente, ao sobrenadante. A amostra foi mantida sob agitação constante por 30 minutos a TA. Após este período, a amostra foi centrifugada (Sigma 4k15) a 2000 xg, por 20 minutos, a 10 °C. O sedimento formado foi ressuspense em 2,0 mL de SST, pH 7,5, e dialisado contra SST, pH 7,5, em membrana de diálise (*Spectrum*, MWCO: 25.000 Da).

### 3.6 Dosagem de proteína

Após diálise, a quantificação de proteína total da gema foi realizada pelo método de Bradford (1976), empregando uma curva padrão com soro albumina bovina nas concentrações de 0,1 a 0,8 mg/mL.

### 3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras de IgY extraídas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% (gel de empilhamento) e 10% (gel de separação), empregando o sistema da BIO-RAD (Mini protein tetra cell). A técnica foi realizada conforme recomendada por Laemmli (1970).

As amostras de IgY obtidas foram analisadas sob condições redutoras ( $\beta$ -mercaptoetanol a 5%, Sigma) e não redutoras, em relação ao padrão de IgY (Sigma). Para as análises as amostras foram aquecidas em água fervente, por 5 minutos, antes da eletroforese. O padrão de peso molecular dual core (BIO-RAD) foi empregado em todas as análises por eletroforese.

As amostras foram aplicadas nos poços do gel de empilhamento no volume final de 10  $\mu$ L. As eletroforeses, submetidas a uma corrente de 100 V, foram interrompidas quando o corante utilizado nas amostras atingiu a base do gel de separação após, aproximadamente, 1 hora e 20 minutos de corrida. Após a sua retirada do sistema, o gel foi corado com Comassie blue R (Sigma) por, no mínimo, 1 hora e em seguida tratado com uma solução descorante de Comassie blue R para a visualização das bandas protéicas (FERRAZ et al., 2001).

### **3.8 Western blot**

Para execução do ensaio imunoenzimático sobre membrana de nitrocelulose (*immunoblot*), a IgY extraída e a IgY padrão, sob condições redutoras e não redutoras, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito anteriormente e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose com poros de 0,2  $\mu$ m de diâmetro (Bio-Rad). A técnica descrita por Tsang et al. (1983) foi utilizada com algumas modificações, empregando-se uma câmara de eletrotransferência (Mini V 8.10 Blot Module) e uma corrente elétrica de 100V por 1 hora (apud FERRAZ et al., 2001).

Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (Sigma), para verificação da transferência e, em seguida, lavadas em água destilada para a retirada do corante, e estocadas em papel filtro a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até a realização do teste imunoenzimático.

### **3.9 Immunoblot**

O ensaio foi realizado conforme descrito por Ferraz (2001). Inicialmente, as membranas com as amostras de IgY foram descongeladas a TA e bloqueadas com SST, pH 7,2, contendo 0,3% de Tween 20 (SSTT) e leite desnatado (Molico<sup>®</sup>), a 5% do volume final, sob agitação por 30 minutos, em TA. Posteriormente, anticorpo de coelho anti-galinha (*Zymed, Invitrogen, USA*), na diluição 1:2000, foi adicionado a esta solução de bloqueio, incubando-se a TA, sob agitação constante, por 30 minutos. A membrana foi lavada três vezes em SSTT por três minutos cada. Em seguida, adicionou-se o conjugado (anticorpos de cabra anti-coelho marcado com peroxidase - *Zymed, Invitrogen, USA*) na diluição 1:4000 em SSTT, com 5% de leite desnatado, incubando-se por mais 30 minutos, a TA, sob agitação constante. A membrana foi lavada três vezes em SST, por três minutos. A reação enzimática foi revelada com diaminobenzidina preparado em Tris, adicionado de peróxido de hidrogênio (60mg de DAB, 100 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%, dissolvidos em 100mL de Tris 0,15 M, pH 7,6). A membrana ficou sobre agitação constante até a visualização das bandas reativas. A reação foi interrompida por lavagens sucessivas em água destilada.

### 3.10 Ensaio Imunoenzimático

As placas de ELISA (Costar 3590) foram sensibilizadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $10^6$  células/50µL/cavidade), preparadas conforme descritas para imunização das galinhas, em tampão carbonato de sódio, 0,06 M, pH 9,6 e mantidas a 4°C, por uma noite. O antígeno não adsorvido à placa foi removido através de três lavagens com SST pH 7,2 com Tween 20 a 0,05 % (SSTT). Em seguida, 100µL de soro fetal bovino (SFB, Cripion, SP, Brasil) inativado a 56 °C/30 minutos e diluídos a 10% em SST, foram distribuídos em cada cavidade da placa e incubados por 30 minutos em TA. Após três lavagens com SSTT, 50µL de IgY nos tempos 0, 14, 28, 42 e 56 dias, diluída (1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000) em SSTT com SFB a 10% foram adicionados, por cavidade e em duplicata. O controle negativo foi feito em duplicata, incubando as cavidades sensibilizadas com 50µL de SFB a 10%. Após 30 minutos de incubação em TA, todas as cavidades foram lavadas três vezes com SSTT. Em seguida, adicionou-se em cada cavidade 50µL de anticorpos de coelho anti-galinha (Zymed, Invitrogen, USA) diluído 1:2000 em SSTT com SFB a 10%, incubando-se por mais 30 minutos a TA. Após este período, as cavidades foram lavadas três vezes com SSTT. Adicionou-se em cada cavidade 50µL do conjugado cabra anti-coelho marcado com peroxidase (Zymed, Invitrogen, USA), diluído 1:2000 em SSTT com SFB a 10%, incubando-se por mais 30 minutos a TA. As cavidades foram novamente lavadas por mais três vezes com SST. Após lavagem, 50µL da solução reveladora de OPD (30-40mg de O-phenylenediamine dihydrochloride em 100mL de tampão citrato/fosfato 0,1 M pH5,0 + 40µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%) foram adicionados por cavidade e a reação incubada no escuro, em TA por 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida com adição de 50µL de ácido sulfúrico a 2,0 M. As densidades ópticas foram analisadas no comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro para placas de microtitulação (Bio-Rad).

### 3.11 ELISA-avidez

Para esta análise, placas de ELISA (Costar 3590) foram sensibilizadas com *L. amazonensis* e incubadas com a IgY (1:2000), conforme descrito no item anterior. Em seguida foram adicionados em cada cavidade 50µL de uréia a 6 M em SST, pH 7,2, por cinco minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com SSTT, o anticorpo coelho anti-galinha (Zymed, Invitrogen, USA) adicionado e a reação desenvolvida, conforme descrito acima.

Os resultados foram expressos em índice de avidez (IA), determinados pela razão entre os valores de densidade óptica das amostras tratadas com uréia (U+) e a densidade óptica das amostras não tratadas (U-) e expresso em porcentagem ( $IA = U+/U- \times 100$ ), sendo  $IA < 40\%$  considerados de baixa avidez,  $IA$  entre 41 e 70% de média avidez e  $IA > 70\%$  de alta avidez (DE SOUZA et al., 2005).

### 3.12 Reação de imunofluorescência indireta

A reação de imunofluorescência indireta foi adaptada de Chaves, 2003. Suspensões de formas promastigotas de *L. amazonensis*, na fase estacionária, foram lavadas duas vezes em SST, pH 7,2 e fixadas com paraformaldeído a 2%, por 30 minutos em TA. Em seguida, as suspensões foram lavadas mais duas vezes em SST, pH 7,2, e dispensadas em lamínulas de vidro 13mm<sup>2</sup> com poli-L-lisina a 0,001% (Sigma, Saint Louis, MO), em uma concentração de 10<sup>5</sup> células por lamínula. Após 30 minutos, as lamínulas foram lavadas em SST, pH 7,2 e secas a TA.

Após bloqueio de 30 minutos com SST contendo soro albumina a 3%, as lamínulas foram incubadas por 1 hora em TA com as amostras de IgY, obtidas das aves imunizadas com as formas promastigotas de *L. amazonensis* nas diluições de 1:10, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000, e com amostras de IgY, obtidas das aves antes da imunização nas diluições de 1:500 e 1:1000 em SST, pH 7,2, contendo soro albumina a 3%. Nesta etapa, apenas SST, pH 7,2 contendo soro albumina 3% foi adicionado como controle do conjugado. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em SST, pH 7,2 três vezes por cinco minutos.

Após as lavagens, as lamínulas foram incubadas por mais uma hora em TA, com o conjugado (anticorpos de coelho para galinha marcados com fluoresceína, Invitrogen, USA) na diluição 1:100 em SST, pH 7,2, contendo soro albumina a 3%. Depois, as lamínulas foram lavadas mais três vezes em SST, pH 7,2, por cinco minutos. Posteriormente, azul de Evans (Sigma) a 0,05% foi adicionado e as lamínulas incubadas por mais 5 minutos, seguindo-se de três lavagens com SST, pH 7,2, de cinco minutos cada. As lamínulas foram secas e montadas em líquido de montagem (Vectashield –Vector) e examinadas por microscópio confocal para imunofluorescência (Zeiss LSM 510 META).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Escolha da técnica de extração e caracterização da IgY obtida

A técnica de extração de IgY empregada no trabalho foi selecionada a partir da comparação entre o rendimento e a pureza da imunoglobulina obtida a partir de dois métodos de purificação: polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) ou sulfato de amônio. A IgY foi extraída de duas gemas obtidas a partir de ovos comuns adquiridos no comércio.

O rendimento de IgY obtida por ambos os métodos estão descritos na tabela 1. A extração por sulfato de amônio apresentou um rendimento de 5,4 vezes maior (1,86 mg/g de gema) do que a extração por PEG 6000 (0,34 mg/g de gema).

**Tabela 1.** Concentração de proteína total obtida após dois diferentes métodos de extração de IgY, a partir da gema de ovo.

Método de Extração	Peso inicial (g)	Volume* inicial (mL)	Concentração de proteína total		
			mg/mL	mg/vol. total	mg/g de gema
Polietilenoglicol 6000	12,52	10,0	0,43	4,30	0,34
Sulfato de amônio	12,52	10,0	2,33	23,30	1,86

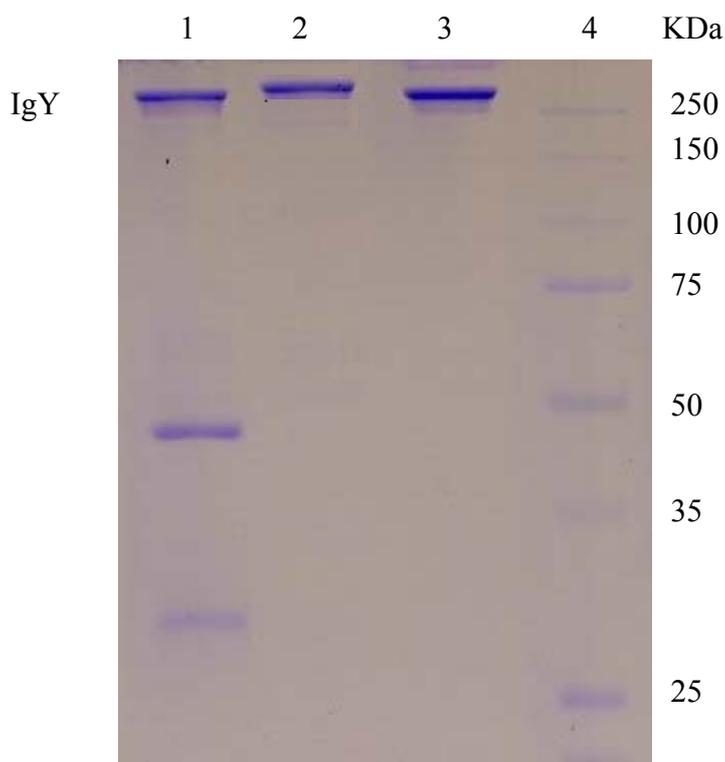
\* Duas gemas obtidas de dois ovos comuns foram misturadas e seus volumes divididos por dois para serem processadas por ambos os métodos de extração empregados no estudo

O isolamento e a purificação da IgY a partir da gema pode ser observado através da técnica de SDS-PAGE e Western Blot, Figuras 4 e 5, respectivamente. Através do gel de poliacrilamida a 10%, sob condição não redutora (Figura 4), pode-se verificar que o método de extração com sulfato de amônio (nº. 1) apresentou três bandas peptídicas bem coradas, com aproximadamente 30, 50 e 250 kDa. O método de extração com PEG 6000 (nº. 2) apresentou uma única banda protéica bem corada com cerca de 250 kDa. A banca protéica de aproximadamente 250 kDa, extraída por ambos os métodos, apresentou um bandejamento similar à banda protéica obtida da amostra de IgY padrão, Sigma (nº. 3).

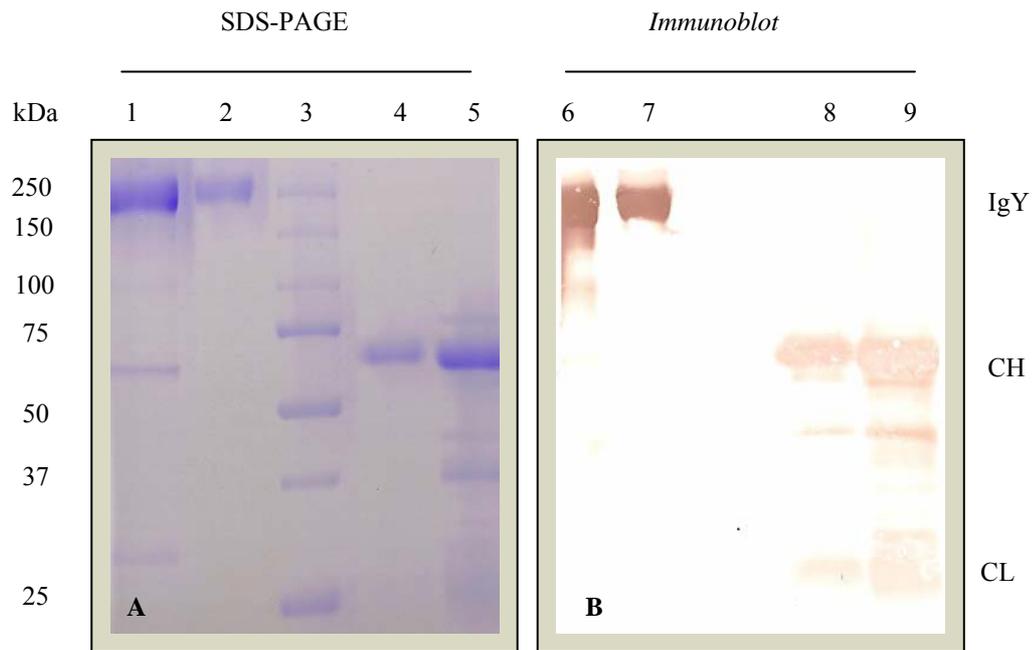
A caracterização da IgY, foi realizada através da análise do material purificado com PEG 6000 por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, em condições não redutoras e redutoras, e por *immunoblot*.

A figura 5A mostra que a banda peptídica de cerca de 250 kDa, em condições redutoras, foi capaz de gerar duas bandas peptídicas de aproximadamente 68 e 25 kDa (nº. 5), de forma similar à obtida pela IgY padrão (nº. 4), correspondentes à cadeia pesada (CH) e à cadeia leve (CL) da imunoglobulina, respectivamente.

A figura 5B mostra o reconhecimento dessas bandas peptídicas pela técnica de *immunoblot*, empregando anticorpo específico para IgY, o qual foi detectado com conjugado marcado com peroxidase e revelado por solução cromógena contendo peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina. Pode-se observar a marcação forte e específica da banda peptídica de, aproximadamente, 250 kDa, sob condições não redutoras (PEG 6000/ nº. 6; IgY padrão/ nº. 7), e marcação nas frações relativas a cadeia pesada (CH) e leve (CL) do material extraído pelo PEG 6000 (nº. 9) e da IgY padrão (nº. 8), sob condições redutoras.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condição não redutora, corado pelo reagente *Comassie Blue* R250 (Bio-Rad). Preparações de IgY obtidas pelos métodos de extração sulfato de amônio e PEG 6000. (1) 2,5 µg de IgY extraída por sulfato de amônio; (2) 2,5 µg de IgY extraída por PEG 6000; (3) 2,5 µg de IgY padrão (Sigma); (4) 3 µL de padrão de peso molecular (DuoCore, BioRad).



**Figura 5.** (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições não redutoras e redutoras, corado pelo reagente *Comassie Blue* R250 (Bio-Rad). As preparações de IgY obtidas pelo método de extração PEG 6000 foram distribuídas na seguinte ordem: (1) 2,5 $\mu$ g de proteína IgY purificada, sob condição não redutora; (2) 2,5 $\mu$ g de IgY padrão (Sigma), sob condição não redutora; (3) 3 $\mu$ L de padrão de peso molecular (DuoCore, BioRad); (4) 2,5 $\mu$ g de IgY padrão (Sigma), sob condição redutora; (5) 2,5 $\mu$ g de proteína IgY purificada, sob condição redutora. (B) *Immunoblot* mostrando o reconhecimento da IgY por anticorpos específicos. As bandas peptídicas identificadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose na mesma posição original do gel, através da técnica de *Western Blot*: sob condição não redutora (6) IgY purificada e (7) IgY padrão (Sigma); sob condição redutora (8) IgY padrão (Sigma) e (9) IgY purificada. CH (cadeia pesada); CL (cadeia leve).

## 4.2. Avaliação do rendimento e da cinética da proteína total e de IgY específica na gema dos ovos das aves imunizadas

A figura 6 apresenta a cinética da resposta imune de ambas as galinhas inoculadas com três doses de antígeno (*L. amazonensis*), por até 56 dias. Inesperadamente, uma das aves (galinha 2) parou a postura após a terceira imunização, por 27 dias. Desta forma, podemos observar na figura 6 que em uma das aves falta o ponto do 42º dia.

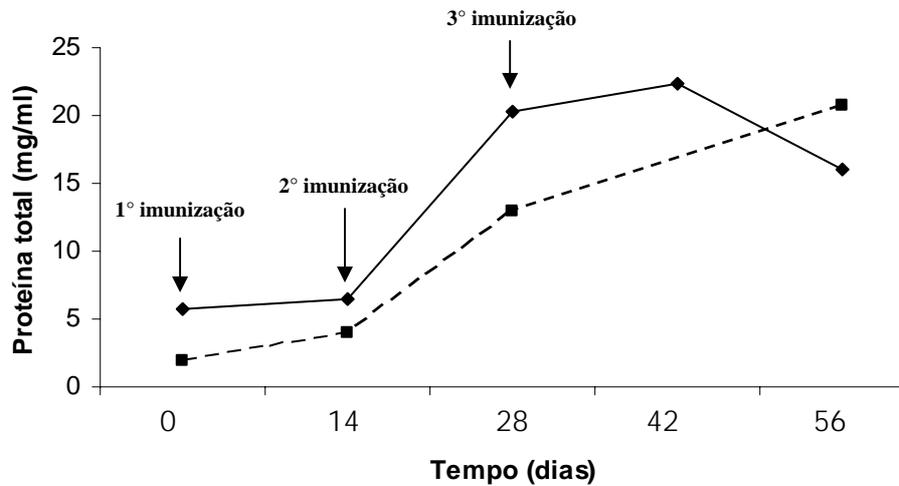
A figura 6A mostra o aumento da concentração de proteína total no material purificado através do método de PEG-6000, a partir da primeira dose de reforço (14 dias). Ao 28º dias de imunização, a galinha 1 alcançou níveis elevados de proteína total, com 20,31 mg de proteína/mL de gema (Tabela 2), não havendo aumento significativo após a administração da segunda dose de reforço (28 dias). Verificou-se também (Tabela 2), que o aumento da concentração de proteína total, em ambas as galinhas, foi praticamente o mesmo após a administração das doses de reforço (14 e 28 dias). Apresentaram um aumento na concentração de proteína total em torno de 3,3 vezes após a segunda imunização (14 dias) e que após a terceira imunização (28 dias) esse aumento foi discreto.

Na padronização do teste de ELISA verificou-se que os anticorpos IgY diluídos 1:2000 não apresentaram reatividade inespecífica para as formas promastigotas de *L. amazonensis*. A densidade óptica da IgY no tempo 0 foi baixa, semelhante à densidade óptica do controle negativo.

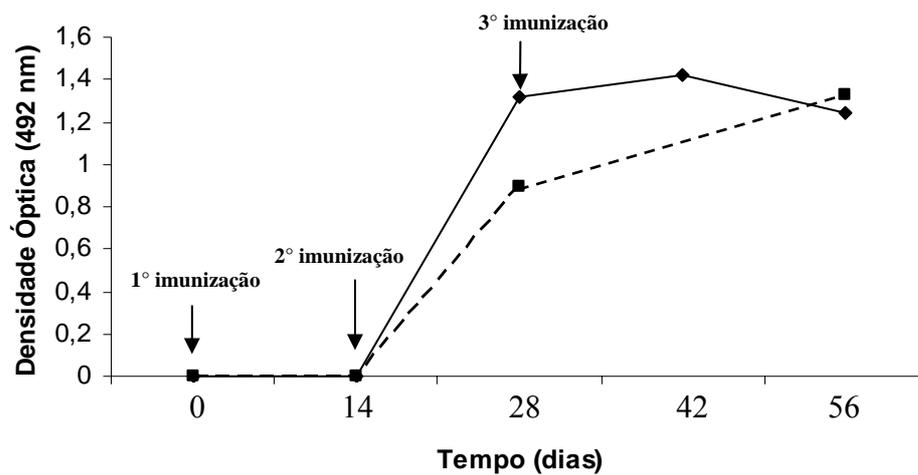
O teste de ELISA confirmou a capacidade de ligação da IgY com o antígeno *L. amazonensis* e seu padrão de resposta durante o período de imunização (Figura 6 B). Tal capacidade foi evidenciada a partir da administração da primeira dose de reforço (segunda inoculação), mantendo-se elevada até o final do período de observação (56 dias). Na tabela 2, pode-se observar o aparecimento de IgY antígeno específica, a partir da segunda inoculação, sendo detectada em níveis elevados no 28º dia. Este nível de anticorpos específicos se manteve alto até o final do período avaliado.

De forma interessante, pode-se observar, em ambas as aves, que o peso ou o volume da gema não tiveram relação direta com a concentração de proteína total ou de IgY específica, obtida através do método de extração PEG-6000.

A



B



**Figura 6.** Cinética de resposta imune de galinhas imunizadas com antígeno de *L. amazonensis*, levando-se em conta proteína total (A), empregando o método Bradford e, IgY específica (B), detectado por ensaio imunoenzimático (ELISA). Três doses de antígeno foram administradas com intervalo de 14 dias entre as doses e a resposta imune humoral avaliada por 56 dias. Os valores de densidade óptica expressos na figura 6B foram obtidos empregando a diluição de 1/2000 do material purificado pelo PEG-6000, a partir da gema dos ovos das aves imunizadas. Galinha 1, linha contínua; galinha 2, linha tracejada.

**Tabela 2.** Concentração e rendimento de proteína total e IgY específica, respectivamente, obtida após a purificação por PEG 6000 da gema antes (tempo 0) e durante (14, 28, 42 e 56 dias) o período de imunização das aves.

Tempo (dias)	Gema		Concentração de proteína total			IgY específica
	Volume		mg/mL	mg/vol. total	mg/g	D.O. (492 nm)
	Peso (g)	(mL)				
0	13,47	9,0	5,69	51,21	3,80	0
14	11,04	9,0	6,40	57,60	5,22	0
28	12,00	11,0	20,31	223,41	18,62	1,317
42	12,12	9,0	22,28	200,52	16,54	1,420
56	17,09	15,0	16,00	240,00	14,04	1,246

Tempo (dias)	Gema		Concentração de proteína total			IgY específica
	Volume		mg/mL	mg/vol. total	mg/g	D.O. (492 nm)
	Peso (g)	(mL)				
0	12,65	11,0	1,98	21,78	1,72	0
14	13,96	9,0	3,98	35,82	2,57	0
28	13,15	10,0	12,95	129,50	9,85	0,891
42	nr	nr	nr	nr	nr	nr
56	10,69	10,0	20,67	206,70	19,33	1,331

A. galinha 1; B. galinha 2; nr, não realizado.

### 4.3. Verificação da avidéz da resposta imune

A avidéz da resposta da IgY antígeno-específica foi pesquisada por ELISA, nos diferentes intervalos de observação (14, 28, 42 e 56 dias pós-imunização). Quatorze dias após a primeira imunização, não foi detectada a presença de anticorpos específicos (tabela 2) e, desta forma, o índice de avidéz calculada foi zero. Quatorze dias após a administração da primeira dose de reforço (no 28º dia de imunização), pode-se observar que os anticorpos específicos obtidos apresentaram um índice de avidéz elevado (> 70%) para ambas as aves, permanecendo assim até o 56º dia (Tabela 3).

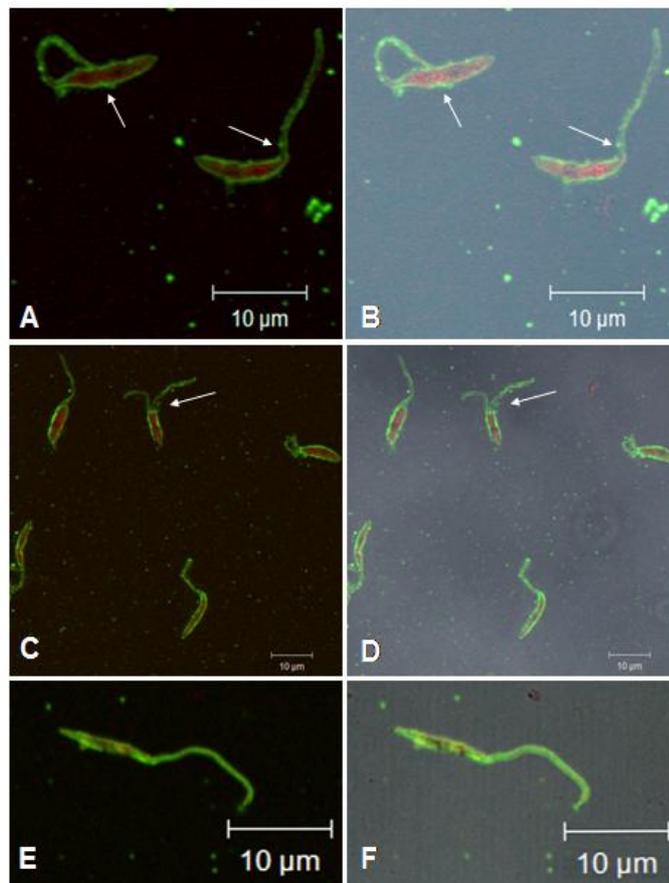
**Tabela 3.** Índice da Avidéz (IA) dos anticorpos IgY, produzidos durante a imunização das aves com antígeno de *L. amazonensis*.

Galinha	Índice de Avidéz <sup>1</sup> (%)			
	14	28	42	56
1	0	83	90	95
2	0	117	nr	118

<sup>1</sup>IA: < 40% (baixa); 41-70% (média); >70% (alta); nr (não realizado)

#### **4.4 Caracterização da ligação da IgY específica aos antígenos de superfície da forma promastigota de *L. amazonensis* por imunofluorescência indireta.**

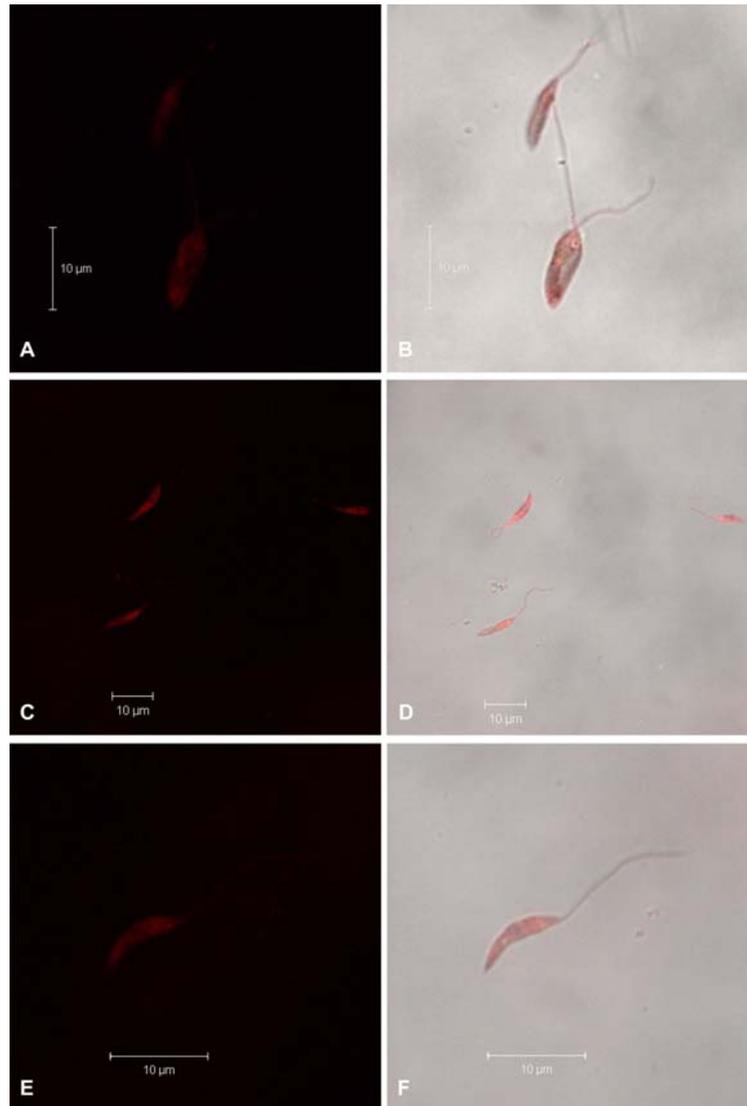
Para caracterizar a ligação através da imunofluorescência indireta, a IgY específica foi diluída 1:10, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000 e, em todas as diluições a intensidade de fluorescência foi à mesma. A figura 6 mostra a imunofluorescência indireta através da microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META), utilizando anticorpo IgY específico aos antígenos de superfície da forma promastigota de *L. amazonensis*. A IgY apresentou marcação fluorescente em toda superfície do parasito (corpo e flagelo) como também, marcações pontuais puntiformes em sua extensão. Os anticorpos IgY reconheceram os antígenos de superfície em diferentes fases da forma promastigota de *L. amazonensis*: fase pró-cíclica (Figura 6: A e B), em divisão celular, evidenciados pela presença de dois flagelos e dois cinetoplastos (Figura 6: C e D) e a fase metacíclica (Figura 6: E e F).



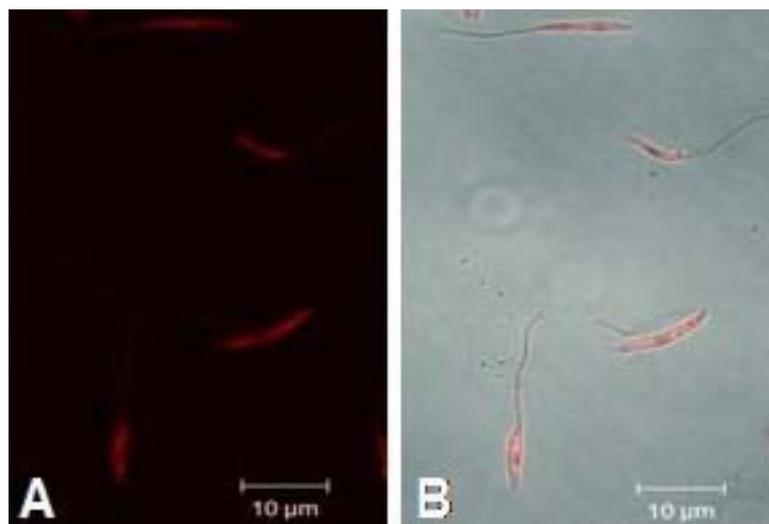
**Figura 7.** Marcação de *L. amazonensis* com anticorpo IgY específico em reações de imunofluorescência indireta examinadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META) utilizando campo escuro (A, C e E) e campo claro (B, D e F). As formas promastigotas foram marcadas com: A, B, C e D - IgY (diluição 1:10); E e F - IgY (diluição 1:200). As reações foram contracoradas com azul de Evans a 0,05%.

Para caracterizar a ausência de ligação da IgY não específica aos antígenos de superfície da forma promastigota de *L. amazonensis* pela imunofluorescência indireta, anticorpo IgY não específico foi diluído 1:500 e 1:1000 e em ambas diluições não houve fluorescência. A figura 7 mostra a imunofluorescência indireta, através da microscopia confocal, utilizando anticorpo IgY não específico aos antígenos de superfície da forma promastigota de *L. amazonensis*. A IgY na diluição 1:1000 (Figura 7: A, B, C, D, E e F) não apresenta marcação fluorescente na superfície do parasito em diferentes fases da forma promastigota de *L. amazonensis*: fase pró-cíclica (Figura 7: C, D, E e F), e em divisão celular (A e B).

A figura 8 mostra a imunofluorescência indireta através da microscopia confocal sem a utilização do anticorpo primário IgY. O controle negativo com conjugado diluído 1:100 (Figura 8: A e B) não apresenta marcação fluorescente na superfície do parasito.



**Figura 8.** Marcação de *L. amazonensis* com anticorpo IgY não específico em reações de imunofluorescência indireta examinadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META) utilizando campo escuro (A, C e E) e campo claro (B, D e F). As formas promastigotas não interagiram com IgY não específicas (diluição 1:1000). A reação foi contracorada com azul de Evans a 0,05%.



**Figura 9.** Marcação de *L. amazonensis* sem anticorpo IgY em reações de imunofluorescência indireta examinadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META) utilizando campo escuro (A) e campo claro (B). O controle negativo (A e B) foi incubado apenas com o anticorpo secundário (diluição 1:100). A reação foi contracorada com azul de Evans a 0,05%.

## 5. DISCUSSÃO

A produção de anticorpos monoclonais ou policlonais em animais é uma importante ferramenta na pesquisa biomédica, ou seja, são componentes essenciais para a realização de métodos diagnósticos visando à pesquisa de uma ampla variedade de moléculas biológicas.

Anticorpos policlonais são produzidos em coelhos e outros roedores, ou mesmo em animais de maior porte, como equinos e caprinos, em procedimentos que envolvem imunização e obtenção dos anticorpos através de sangria. O emprego de galinhas na produção de anticorpos policlonais não apenas promove a substituição da sangria pela coleta do ovo, mas também é uma alternativa valorosa no que se refere ao “princípio dos três Rs” de Russel e Burch (1959) – *refine, reduce, replace* - na realização de experimentação animal (SCHADE, 2001).

A utilização de imunobiológicos em pesquisa ou diagnóstico demanda a purificação, pelo menos parcial, do reagente a ser empregado. No caso da IgY, diversos métodos podem ser utilizados, isoladamente ou em combinação, de acordo com os critérios: quantidade, pureza e atividade biológica. Os inconvenientes e o custo envolvidos em cada processo são também fatores relevantes.

Os métodos de purificação da IgY descritos na literatura são compostos de duas etapas: delipidação da gema, que consiste em separar as livetinas das demais lipoproteínas e, purificação do extrato aquoso para a separação da IgY de outros componentes.

Existem na literatura diversas técnicas de delipidação, diferindo em seus resultados em relação à pureza e quantidade de IgY extraída (POLSON et al., 1980; JENSENIUS et al., 1981; AKITA; NAKAI, 1992; HORIKOSHI et al., 1993; CHANG et al., 2000; BIZANOV et al., 2006).

Meulenaer e Huyghebaert (2001) recomendaram o método de congelamento/descongelamento para a delipidação da gema, que consiste em um método eficiente, o qual utiliza o mínimo de substâncias químicas, com redução do custo e do número de etapas envolvidas no processo.

Polson et al., 1980, descreveram um método alternativo para a delipidação da gema. Os autores empregaram polietilenoglicol (PEG-6000) em baixa concentração (3,5%) à gema diluída em SST. A vantagem dessa técnica seria dispensar a etapa de congelamento/descongelamento, possibilitando o processamento da IgY imediatamente após a coleta dos ovos.

Neste trabalho, devido ao impedimento técnico de processamento da gema logo após a coleta dos ovos, a gema foi primeiramente diluída e depois congelada a -20 °C, até o momento do processamento e depois descongelada lentamente a 4 °C. Esse procedimento de delipidação foi empregado para ambas às técnicas de extração (sulfato de amônio e PEG-6000), modificando a técnica descrita por Polson et al. (1980), nessa etapa.

A purificação da IgY do extrato aquoso é feita após a etapa de delipidação. Existem três métodos, amplamente descritos na literatura, que são realizados de forma isolada ou em associação, são eles: precipitação com sais, cromatografia de afinidade e ultrafiltração (MOREIRA, 2007).

Segundo Meulenaer e Huyghebaert (2001) a precipitação é um método de fácil realização, que envolve menor custo. As técnicas de precipitação descritas empregam sais, como o sulfato de sódio e o sulfato de amônio (DEIGNAN, 2000), polietilenoglicol (AKITA; NAKAI, 1993), ácido caprílico (MCLAREN et al., 1994) e dextransulfato (JENSENIUS et al., 1981).

A comparação dos dois métodos de extração de IgY (PEG-6000 e sulfato de amônio) mostrou que, apesar da extração com sulfato de amônio render 5,4 vezes mais (Tabela 1), o extrato apresentava menor grau de pureza, quando comparado ao obtido com a purificação com PEG-6000. A figura 4 mostra a presença de duas bandas peptídicas, com peso molecular em torno de 30 e 50 kDa, no material obtido no método de extração pelo sulfato de amônio, ausentes na amostra purificada pelo PEG-6000.

Ruan et al. (2005) avaliaram o rendimento e a pureza da IgY obtida a partir de 4 métodos de purificação: três protocolos de purificação, em duas etapas, empregando ácido caprílico e sulfato de amônio, e o protocolo tradicional com precipitação em sulfato de amônio 50%. De forma similar ao encontrado neste trabalho, os autores também observaram um rendimento protéico superior para o método de sulfato de amônio (13,0 mg/mL gema), quando comparado com os demais protocolos (1,2; 4,8 e 9,6 mg/mL gema). O grau de pureza dessas amostras foi inversamente proporcional ao rendimento obtido (70% para o método de sulfato de amônio e acima de 90% para os demais protocolos).

O método de extração com sulfato de amônio 25%, empregado nesse trabalho, seguiu as recomendações de Moreira (2007). Todavia, os resultados obtidos foram contraditórios: o sulfato de amônio proporcionou melhor rendimento de IgY e amostras mais puras, quando comparado com o método de PEG-6000 no protocolo de Moreira (2007). Tal discrepância pode ser devido à diferença de protocolos. Moreira (2007) utilizou apenas uma etapa de purificação com PEG-6000 em diferentes concentrações (8%, 10%, 12%, 14% ou 16%), observando que o aumento da concentração de PEG-6000 promovia aumento na quantidade de proteína total, com precipitação de outras proteínas, além da IgY. O resultado final foi um precipitado impuro. A autora ainda sugere que a utilização do PEG-6000, em concentrações abaixo de 8%, poderia ser uma alternativa viável na elevação do grau de pureza da amostra.

Em nosso estudo, foi empregado o método de extração descrito por Polson et al. (1980), que recomenda o uso do PEG-6000 em baixa concentração (3,5%) durante a etapa de delipidação e, posteriormente, outras duas precipitações a 12%. Além disso, a etapa de congelamento/descongelamento, adicionada ao processo de delipidação, pode ter contribuído na promoção da pureza alcançada, similar à exibida pela IgY padrão (Figura 4).

O rendimento protéico total obtido pelo método de extração do PEG-6000, descrito por Polson et al. (1980), é menor quando comparamos com outros métodos de extração. Schwarzkopf (1994) comparou diversos procedimentos, empregando gemas de galinhas imunizadas com imunoglobulina de cão. O autor verificou que o método de extração do PEG-6000 (POLSON et al., 1980) apresentou menor rendimento (1,05 mg/mL), quando comparado com os métodos: PEG/etanol (6,45 mg/mL), dextransulfato (7,05 mg/mL) e diluição em água (17,1 mg/mL) (apud STAAK et al., 2001).

O rendimento protéico alcançado neste trabalho, através do método com PEG-6000, foi bem menor (0,43 mg/mL) que o descrito por Schwarzkopf (1994). Tal fato pode ser devido à modificação realizada na etapa de delipidação da gema, promovendo maior perda de proteína. Por outro lado, quando aplicamos o método do PEG-6000 para extração da IgY, a partir da gema das aves que seriam imunizadas (tempo zero), o rendimento protéico aumentou para 5,69 mg/mL (Tabela 2). Essa discrepância no rendimento obtido pelo mesmo método de extração pode ser devido à fonte de ovos empregados nos dois momentos do estudo. No primeiro momento, ovos brancos comuns obtidos no comércio foram empregados para a avaliação dos ensaios de purificação e, no segundo momento, ovos vermelhos de galinhas de outra linhagem foram utilizados para purificação da IgY, de idades provavelmente diferentes das aves anteriores e que receberam ração diferente durante todo o experimento. Kindlein (2002) demonstrou que alterações sutis de componentes da dieta podem ter importância crítica na quantidade de IgY no soro e, conseqüentemente, na gema.

O rendimento protéico obtido pelo método do sulfato de amônio (2,33 mg de proteína/mL de gema) foi similar (2,69 mg/mL) ao obtido por Moreira (2007), empregando precipitação com sulfato de amônio a 20%. Bizanov e Jonauskienė (2003) também encontraram valores semelhantes (1 a 3,8 mg/mL), sob as mesmas condições realizadas por Moreira (2007).

A banda protéica de aproximadamente 250 kDa, obtida do material extraído por ambos os métodos de purificação, foi caracterizado como IgY, através das técnicas de SDS-PAGE e por *immunoblotting*, empregando anticorpo anti-IgY específico (Figura 5). Não há um consenso sobre seu peso molecular, havendo divergências na literatura, que pode variar entre 167 a 206 kDa (MOREIRA, 2007). A eletroforese da IgY, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, promoveu a quebra da imunoglobulina em dois fragmentos de aproximadamente 65 e 30 kDa, compatíveis com os pesos moleculares das cadeias pesada e leve, respectivamente. Além disso, os fragmentos também foram reconhecidos pelo anticorpo anti-IgY específico por *immunoblotting* (Figura 5).

Após a escolha do PEG-6000 como método de extração de IgY, duas galinhas poedeiras foram imunizadas com formas promastigota de *L. amazonensis*, inativadas e emulsificadas em adjuvante incompleto de Freund (AIF). O Freund é o adjuvante de escolha para produção de anticorpos policlonais em animais de laboratório, sendo bem tolerado em galinhas, pois apresentam uma maior resistência tecidual, quando comparado a mamíferos (SCHADE et al., 2005).

Segundo Schade et al. (2005), a postura de galinhas inoculadas com determinados antígenos, com certo grau de toxicidade, pode diminuir ou parar por completo por até 3 semanas. Tal possibilidade pode explicar a parada de postura da galinha 2 por vários dias, após a terceira inoculação do antígeno.

As galinhas imunizadas apresentaram aumento na quantidade de proteína total na gema após a segunda inoculação, sem alteração significativa até o 56º dia de observação. Esse padrão de resposta foi comum para ambas às aves utilizadas. O aparecimento da IgY-específica na gema ocorreu após a segunda inoculação, detectando-se níveis elevados de anticorpos no 28º dia, sem alteração significativa até o final do experimento. As Figuras 6A e 6B apresentam cinéticas semelhantes de resposta, podendo-se relacionar o aumento do nível de proteína com o aumento de IgY na gema, após aplicação da primeira dose de reforço.

Resultado semelhante foi obtido por Zhen et al. (2008) com antígeno celular de *E. coli* O111, inativado e emulsificado com adjuvante de Freund. Galinhas foram inoculadas com 3 doses do antígeno celular, em intervalos de 0, 10 e 20 dias e a resposta de IgY-específica medida até o 160º dia, pela técnica de ELISA. A presença de anticorpos-específicos foi observada apenas a partir da segunda dose de reforço, isto é, após a administração da terceira dose do antígeno.

O retardo no aparecimento da IgY-específica na gema é normal, já que a IgY é seletivamente secretada da circulação sanguínea para a gema do ovo, sendo sua transferência proporcional à concentração de IgY no soro (HAMAL et al., 2006). Na cinética da resposta de anticorpos nas galinhas é mais frequente ocorrer um pequeno aumento transiente de IgY na resposta imune primária, após a primeira imunização e, após uma dose de reforço, uma resposta secundária caracterizada pelo aumento da concentração de IgY sérica, dentro de aproximadamente 10 dias. Essa quantidade de anticorpos pode se manter estável por várias semanas ou declinar em alguns dias (SCHADE et al., 2005). Anticorpos IgY-específicos são encontrados nos ovos com uma defasagem de 5-6 dias, em comparação com a concentração de anticorpos no soro. Tal fato pode ser explicado pelo tempo requerido para o desenvolvimento folicular e oviposição (PATTERSON, 1962).

A avidéz de um anticorpo é caracterizada pela soma total da força de ligação entre as regiões hipervariáveis do fragmento Fab de imunoglobulinas e seus epítomos antigênicos, através de múltiplas ligações (JANEWAY, et al., 2006). O protocolo de imunização desenvolvido nesse estudo foi capaz de promover a geração de anticorpos IgY com elevada força de ligação antígeno-anticorpo, demonstrado pelo índice de avidéz descrito na tabela 3. Estudos sobre avidéz demonstram que a IgY apresenta elevada afinidade e avidéz contra proteínas bacterianas e humanas, provavelmente devido à divergência evolutiva entre mamíferos e aves ou devido à diferença existente entre o processo de maturação da afinidade da IgG e a conversão gênica da IgY (WOOLEY; LANDON, 1995; ZHANG, 2003; SCHADE et al., 2005).

O emprego de anticorpos como biomarcadores depende unicamente da interação primária do reagente com seu alvo. O maior problema do uso de IgG de mamíferos no diagnóstico e na terapêutica é a reatividade com anticorpos anti-IgG de mamíferos, ou seja, anticorpos de camundongos anti-IgG humana, fator reumatóide e componentes do sistema complemento humano, resultando no aumento de reações inespecíficas. Anticorpos IgY, como biomarcadores, trazem inúmeras vantagens, conforme já descrito na revisão bibliográfica: não ativam complemento humano, não se ligam às proteínas A e G, a fatores reumatóides, ou a receptores Fc da superfície celular (ZHANG, 2003).

A IgY-específica para *L. amazonensis* foi capaz de reconhecer antígenos distribuídos na superfície do corpo celular e flagelo de formas promastigotas em diferentes fases (pré-cíclica, em divisão celular e metacíclica), com elevada especificidade, como pode ser observado pela imunofluorescência indireta (Figuras 6, 7 e 8). Cipolla et al. (2001) e Xiao et al. (2008) empregaram anticorpos IgY fluorescentes como biomarcadores para *Campylobacter fetus* e para duas linhagens de células neoplásicas MCF-7 e SK-BR-3, respectivamente. Os autores relataram o desenvolvimento de ensaios de imunofluorescência direta com maior sensibilidade e especificidade, quando comparados com anticorpos de mamíferos.

A IgY vem sendo usada com sucesso em outros ensaios imunológicos como: ELISA, *immunoblotting*, imunoprecipitação, imunohistoquímica e cell-sorting, com resultados comparáveis, ou mesmo melhores que os usam anticorpos IgG (CHACANA et al., 2004).

A caracterização inicial da IgY-específica para formas promastigotas *L. amazonensis* revelou elevada sensibilidade (ELISA), especificidade (imunofluorescência) e avidéz (ELISA) podendo, provavelmente, ser utilizada com sucesso em uma série de ensaios em áreas de pesquisa, diagnóstico, aplicação médica e biotecnológica.

Desta forma, como perspectivas futuras para esse estudo, pretendemos verificar a especificidade desse anticorpo para diferentes espécies de leishmanias, analisar o reconhecimento de formas amastigotas e avaliar sua capacidade opsonizante ou de interferência na fagocitose de leishmanias por macrófagos.

## 6 CONCLUSÕES

Com resultados obtidos nesse estudo podemos concluir que:

1. O método de precipitação empregando PEG-6000 foi capaz de extrair IgY da gema de ovos com alto grau de pureza quando comparado com a precipitação com sulfato de amônio 25%.
2. A imunização das galinhas gerou uma excelente resposta imune, proporcionando aumento na concentração de proteína total na gema do ovo. Este aumento foi proporcional ao aumento da IgY-específica para a forma promastigota de *L. amazonensis*.
3. A IgY obtida apresentou especificidade e avidéz para os antígenos distribuídos na superfície do corpo celular e flagelo de formas promastigotas de *L. amazonensis*.
4. A “Tecnologia IgY” é uma metodologia simples e de baixo custo, que possibilitou a obtenção de anticorpos específicos de alta especificidade de forma ética, podendo ser utilizado em diversos campos da ciência.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

\_\_\_\_\_. Anticorpos: formas solúveis de BCR. In: TIZARD, I.A. **Imunologia veterinária. Uma introdução**. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 154-167.

\_\_\_\_\_. Auto-imunidade e transplantes. In: JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença**. 5 ed. São Paulo: Artmed, 2002, p. 527-548.

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

AKITA, E.M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. **Journal of Food Science**, United States, v. 57, p. 629-634, 1992.

AMARAL, J.A.; M. FRANCO, T.; M. CARNEIRO-SAMPAIO, M.S.; CARBONARE, S.B. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. **Research in Veterinary Science**, England, V.72, n.,3, p.229-234, Jun. 2002.

ANTON, M. Composition and structure of hen egg yolk. In: In: HUOPALAHTI, R.; LÓPEZ-FANDINO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive Egg Compunds**. Berlim: Springer, 2007. p. 1-6.

BARRET, T.V.; SENRA; M.S. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. **Parasitology Today**, England, v. 8, p. 255-257, 1989.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3 p. 328-337, 2004.

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

BIZANOV, G.; NORMANTIENE, T.; JONAUSKIEN, I. Development of antibodies to Sendai virus in chickens and their isolation from yolk. **Biologija**, Lithuania, v. 2, n. 1, p. 68-71, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical biochemistry**, United States, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMBELL, F.W.R. **The Transmission of Passive Immunity from Mother to Young**. North Holland: Publishing Corporation, Amsterdam, 1970.

CAMPBELL, R.D.; DODDS, A.W.; PORT, R.R. The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. **The Biochemical journal**, England, v. 189, n. 1, p. 67-68, 1980.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. **BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy**, New Zealand, v. 16, p. 433-437, 2002.

CHACANA, P. A.; SCHADE, R.; TERZOLO, H. R. A new bacterium suitable for egg yolk immunoglobulin (IgY) large-scale chromatographic purification. **ALTEX : Alternativen zu Tierexperimenten**, Germany, v.3, n. 5, p. 165, 2003.

CHACANA, P.A.; TERZOLO, H.R.; CALAZADO, E.G.; SCHADE, R. Tecnologia IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v. 85, n. 2, p. 179-189, 2004.

CHANG, H.M.; LU, T.C.; CHEN, C.C.; TU, Y.Y.; HWANG, J.Y. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States, v. 48, p. 995-999, 2000.

CHAVES, C.S. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra estruturas de superfície de *Leishmania amazonensis***. 2003. 192 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

CIPOLLA, A; CORDEVIOLA, J; TERZOLO, H.; COMBESSIES, G.; BARDÓN, J.; RAMÓN, N.; MARTÍNEZ, A.; MEDINA, D.; MORSELLA, C.; MALENA, R. *Campylobacter fetus* diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates **ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten**, Germany, v. 18, n. 3, p. 165-170, 2001.

CIRIACO, E.; PÍÑERA, P.P., DÍAZ-ESNAL, B.; LAURÀ, R. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). **Microscopy Research and Technique**, United States, v. 62, n. 6, p.482-487, nov. 2003.

DAVALOS-PANTOJA, L.; ORTEGA-VINUESA, J.L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D.; HIDALGO-ÁLVAREZ, R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, Netherlands, V.11, n.6, p. 657-673, 2000.

DE SOUSA, S.M.M. **Conjugados fluorescentes produzidos com IgY de galinhas hiperimunizadas**, 2008, 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DE SOUZA, A.I.; BARROS, E.M.S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.N.; MARIN, G.R.B.; NUNES, V.L B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 128, n. 1-2, p.41-45, 2005.

DEANE, L.M., **Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre Reservatórios e Transmissores no Estado do Ceará**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária. 1956.

DEIGNAN, T.; KELLY, J.; ALWAN, A.; O'FARRELLY, C. Comparative analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. **Food Agricultural Immunology**, United States, v. 12, n. 1, p. 77-85, 2000.

DOHMS, J.E.; SAIF, Y.M.; BACON, W.L. Studies on metabolism and concentration of immunoglobulin G in the newly hatched turkey poult. **American Journal of Veterinary Research**, United States, v. 39, p. 1466-1471, 1978.

DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CUPOLLILO, E.; DE CASTRO, A.C.C.; ALVES, T.P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, v. 39, n. 1, p. 43-46, jan-fev. 2006.

DOS SANTOS, I.B.; DE MIRANDA, L.H.M.; OKAMOTO, T.; FIGUEIREDO, B.; SCHUBACH, T.M.P.; LEME, L.R.P.; QUINTELLA, L.P.; TORTELLY, R. Leishmaniose tegumentar americana canina no rio de janeiro – revisão. **Revista de Ciências da Vida**, Brasil, v. 28, n. 1, p. 27-38, jan-jun. 2008.

EDANS, F.W.; THAXTON, P.; MORGAN, G.W.; PARKHURST, C.R. Grouping in Japanese quail 2. Suppression and humoral immunity. **Poultry science**, United States, v. 62, n. 12, p. 2479-2485, 1983.

FERRAZ, P.N. **Emprego da proteína de 75KDa como marcador molecular na diferenciação da resposta vacinal de uma resposta imune causada por uma cepa selvagem de *Mycoplasma gallisepticum***. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

FUNASA ( Fundação Nacional de Saúde). **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**, 60 p., 5ª Edição (revisada), Brasília/DF, 2000. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu\\_leishman.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_leishman.pdf)> Acesso em: 03 nov. 2008.

GASSMANN, M.; TOHMES, P.; WEISER, T.; HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v. 4, p. 2528–2532, 1990.

GHETIE, V.; WARD, E.S. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. **Annual Reviews in Immunology**, United States, v.18, p. 739-766, 2000.

GIGLI, I.; AUSTEN, F. Phylogeny and function of the complement system. **Annual Review of Microbiology**, United States, V. 25, p. 309-332, 1971.

GLICK, B. The thymus and bursa of Fabricius: endocrine organs? In: EPPLER, A.; STETSON, M.H. **Avian Endocrinology**. ed. New York: Academic press, 1980. 209 p.

GOTTSTEIN, B.; HEMMELER, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, Germany, v. 71, p. 273–278, 1985.

- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, England v. 1, p. 1-8, 2005.
- GROSS, W.B.; SIEGEL, P.B.; DOMERMUTH, C.H.; DUBOSE, R.T. Production and persistence of antibodies to sheep erythrocyte. 2. Resistance to infectious disease. **Poultry Science**, United States, v. 59, n. 2, p. 205-210, 1980.
- HAMAL, K.R. I; BURGESS, S.C.; PEVZNER, I.Y.; ERF, G.F. Maternal Antibody Transfer from Dams to Their Egg Yolks, Egg Whites, and Chicks in Meat Lines of Chickens. **Poultry Science**, United States, v. 85, p. 1364-1372, 2006.
- HOFFMAN, W.L.; RUGGLES, A.O.; TABARYA, D. Chicken anti-protein A prevents Staphylococcus aureus protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 198, n. 1, p. 67-77, oct. 1996.
- HORIKOSHI, T.; HIRAOKA, J.; SAITO, M.; HAMADA, S. IgY antibody from hen egg yolks: purification by ethanol fractionation. **Journal of Food Science**, United States, v. 58, n. 4, p. 739-742, 1993.
- IVERSON, L.B.; CAMARGO, M.E.; VILLANOVA, A.; REICHMANN, M.I.A.B.; ANARADE, E.A.; TOLENZANO, J.E. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana no Município de São Paulo, Brasil (1979-1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brazil, v. 25, p. 310-317, 1983.
- 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**, United States, V.12, n.4, p.263-272, Dec. 2000.
- JENSENIUS, J.C.; ANDERSEN, I.; HAU, J.; CRONE, M.; KOCH, C. Eggs: conveniently packed antibodies. Methods for purification of yolk IgG. **Journal of immunological Methods**, Netherlands, v. 46, p. 63, 1981.
- KARLSSON, M.; LARSSON, A; KOLLBERG, H. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**. Champaign, v.60, p. 341-348, 2004.
- KIM, H., NAKAI, S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. **Journal of Food Science**, United States, v. 63, p. 485-490, 1998.
- KINDLEIN, G. **A influência da alimentação com diferentes níveis de vitamina E sobre a produção de imunoglobulina Y (IgY) no soro de poedeiras leves**. 2002. 94 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- KITAGUCHI, K.; OSADA, K.; HORIO, F.; MURAI, A. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 121, n. 3-4, p. 290-299, feb. 2007.

- KLASING, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, United States, v. 77, p. 1119–1125, 1998.
- KUNZ, U.S.; POSPISCHIL, A.; PACCAUD, M.F. Immunohistochemical detection of chlamydiae in formalin-fixed tissue sections: comparison of a monoclonal antibody with yolk derived antibodies (IgY). **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B**, Germany, v.38, n.4, p. 292-298, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, England, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARSSON, A. KARLSSON-PARRA, A.; SJOQUIST, J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clinical Chemistry**, United States, v. 37, p. 411-414, 1991.
- LEE, K.A.; CHANG, S.K.; LEE, Y.J.; LEE, J.H.; KOO, N.S. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Korea (South), v. 35, n. 5, p. 488-493, sep. 2002.
- LINDAHL, T.L.; FESTIN, R.; LARSSON, A. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: An improved method for detection of platelet activation. **Thrombosis and Haemostasis**, Germany, v. 68, p. 221-225, 1992.
- MACLAREN, R.D.; PROSSER, C.G.; GRIEVE, R.C.J. The use of caprylic acid for extraction of immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunized with ovine  $\alpha$ -lactalbumin. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 177, n. 1, p. 175-184, 1994.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A. SOUZA, P.P.; TOLEDO, L.M.; RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Brazil, v. 1, p. 432, 1985.
- MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. **Food and Agricultural Immunology**, United States, v. 13, n. 1, p. 275-288, 2001.
- MOHAMMED, S.M.; MORRISON, S.; WIMS, L.; TRINH, K.R.; WILDEMAN, A.G.; BONSELAAR, J.; ETCHES, R.J. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology**, Netherlands, v. 4, p. 115-125, 1998.
- MOREIRA, A.S.A.S. **Produção antiveneno botrópico em ovos de galinha**. 2007. 48 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- MORGULIS, M.S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.N.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frango de corte**. São Paulo. Funep, Fapesp, 2002. p. 231-235.
- MORRISON, S.L.; MOHAMMED, S.M.; WIMS, L.A.; TRINH, R.; ETCHES, R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, England, v. 38, p. 619-625, 2001.

- MOTOI, Y.; INOUE, S.; HATTA, H.; SATO, K.; MORIMOTO, K.; YAMADA, A.; Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Japan, v. 58, p. 115-118, 2005.
- MURRAY, H.W., BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 366, p. 1561–1577, 2005.
- NARAT, M. Production of Antibodies in Chickens. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v.41, n. 3, p.259–267, 2003.
- NTAKARUTIMANA, V.; DEMEDTS, P.; VAN SANDE, M.; SCHARPE, S. A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferin from egg yolk. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v.153, p. 133-140, 1992.
- OLOVSSON, M.; LARSSON, A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, England, v. 16, n. 2, p. 145-152, Apr. 1993.
- PATTERSON, R.; YOUNGNER, J.S.; WEIGLE, W.O.; DIXON, F.J. Antibody Production and Transfer to Egg Yolk in Chickens. **The Journal of Immunology**, v. 89, p. 2722-278, 1962.
- POLSON, A.; VON WECHMAR, M.B.; VAN REGENMORTEL, M.H. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Communications**, United States, v. 9, n. 5, p. 475-93, 1980.
- RATCLIFFE, M.J. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. **Developmental and Comparative Immunology**, United States, v. 30, p. 101–118, 2006.
- REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, England, v. 96, n.1, p. 123-126, 2002.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR H, P.C.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, United States, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- REITHINGER, R; DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, v. 61, p. 530-541, 1999.
- REMME, J.H.F.; BLAS, E.; CHITSULO, L.; DESJEUX, P.M.P.; ENGERS, H.D.; KANYOK, T.R.; KAYONDO, J.F.K.; KIOY, D.W.; KUMARASWAMI, V.; REY, L. O complexo “*Leishmania braziliensis*” e as leishmaniases tegumentares americanas. In: Rey, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 227-39.
- REY, L.C.; MARTINS, C.V.; RIBEIRO, H.B.; LIMA, A.A. M. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. **The Journal of Pediatrics**, United States, v. 81, n. 1, p. 73-78, 2005.

RESOLUÇÃO Nº 879. **Entidades de fiscalização do exercício das profissões liberais conselho federal de medicina veterinária.** Disponível em:

<ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe\_eletronico/2008/iels.abril.08/iels78/U\_RS-CFMV-879\_150208.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2008.

ROSOL, T.J.; STEINMEYER, C.L.; MCCAULEY, L.K.; MERRYMAN, J.I.; WERKMEISTER, J.R.; GRONE, A.; WECKMANN, M.T.; SWAYNE, D.E.; CAPEN, C.C. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (I-36). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v. 35, p. 321-337, 1993.

RUAN, G.-P.; MA, Li; HE, X.-W.; MENG, M.-J.; ZHU, Y.; ZHOU, M.-Q.; HU, Z.-M.; WANG, X.-N. Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A\*0201 heavy chain and light chain ( $\beta$ 2m). **Protein Expression and Purification**, United States, v. 44, p. 45-51, 2005.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The Principles of Human Experimental Technique.** Special Ed. Herts, U.K.:Universities Federation for Animal Welfare, 1992.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, A.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, England, v. 12, p.315-317, 1998.

SCHADE, R. IgY-antibodies, future prospects. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M. HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY-technology.** Berlin: Springer, 2001. p. 218-222.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; ASPLUND, J.P.; TERZOLO, H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, England, v.33, p. 1-26. 2005.

SCHADE, R.; CHACANA, P.A. **Livetin fractions.** In: HOUVALAHTI, R.; LOPEZ-FANDINO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. Bioactive egg compounds. Berlin: Springer, 2007, p. 25-32.

SCHMIDT, P., ERHARD, M.H.; SCHAMS, D.; HAFNER, A.; FOLGER, S.; Losch, U. Chicken egg antibodies for immunohistochemical labelling of growth-hormone and prolactin in bovine pituitary gland. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry**, United States, v. 41, p. 1441-1446, 1993.

SCHUBACH, T. M. P.; FIGUEIREDO, F. B.; PEREIRA, S. A.; MADEIRA, M. F.; SANTOS, I. B.; ANDRADE, M. V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, n.3, p.165-167. mar.2004.

SCHWARZKOPT, C.; STAAK, C.; BEHN, I.; ERHARD, M. Immunisation. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M. HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY-technology.** Berlin. Springer, 2001. p. 25-64.

SIEGEL, H.S. Adrenals, stress, and the environment. **World's Poultry Science Journal**, England, v. 27, p. 237-349. 1971.

SILVA, F. L. **Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores.** 2007.47 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SOMERVILLE, R.A.; BIRKETT, C.R.; FARQUHAR, C.F.; HUNTER, N.; GOLDMANN, W.; DORNAN, J.; GROVER, D.; HENNION, R.M.; PERCY, C.; FOSTER, J.; JEFFREY, M. Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. **Journal of General Virology**, England, v. 78, p. 2389–2396, 1997.

STAAK, C.; SCHWARZKOPF, C.; BEHN, I.; HOMMEL, U.; HLINAK, A.; SCHADE, R.; ERHARD, M.; Isolation of IgY from yolk. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chincken egg yolk antibodies, production and application. IgY technology.** Berlin. Springer, 2001. p.65-107.

SUN, S.; MO, W.; JI, Y.; LIU, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**, England, v.15, p. 708-712, 2001.

SVENDSEN, L.B.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G.; HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 191, n. 2, p. 113-120, 1996.

TAFURI, W.L.; Raso, P.; HERMETO, M.V.; VIEIRA-DIAS, D.; MAYRINK, W. Comparative histopathologic study of the skin test in dogs from an endemic area of tegumentary leishmaniasis, using 2 antigens: Leishvacin and P10.000G. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, v. 26, p. 11-4. 1993.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is it time to change strategies? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, v. 52, p. 287-292, 1995.

TINI, M.; JEWELL, U.R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, United States, v.131, n. 6, p.569-574. 2002.

TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.B.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.L.; BARBOSA, J.A.R.; BARBOSA, J.E.R.; Floeter-Winter, L.M.; SHAW, J.J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 149, p. 280-284, 2007.

WEST, A.; HERR, A.; BJORKMAN, P. The Chicken Yolk Sac IgY Receptor, a Functional Equivalent of the Mammalian MHC-Related Fc Receptor, Is a Phospholipase A2 Receptor Homolog. **Immunity**, United States, V. 20, n. 5, p. 601-610, 2004.

WHO. **World Heald Organization.** Disponível em: Leishmaniasis: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leish-2007.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

WOOLLEY, A.; LANDON, J. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 178, p. 253-265, 1995.

XIAO, Y.; GAO, X.; GANNOT, G.; EMMERT-BUCK, M.R.; SRIVASTAVA, S. WAGNER, P.D.; AMOS, M.D.; BARKER, P.E. Quantitation of HER2 and telomerase biomarkers in solid tumors with IgY antibodies and nanocrystal detection. **International Journal of Cancer**, United States, v. 122, p. 2178-2186, 2008.

ZHANG, W.-W. The use of gene-specific igy antibodies for drug target discovery, **Drug Discovery Today**, England, v. 8, p. 364–371, 2003.

ZHEN, Y-H.; JIN, L-J.; GUO, J.; LI, X-Y.; LU, Y-N.; CHEN, J.; XU, Y-P. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing Escherichia coli. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 130, p. 126–133, 2008.