

UNIVERSIDADE DE UBERABA

Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-P21
RECOMBINANTE DE *Trypanosoma cruzi*

RAPHAELLA PAULA RIBEIRO

Uberaba, MG

Maior/2016

RAPHAELLA PAULA RIBEIRO

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-P21
RECOMBINANTE DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada à banca de avaliação do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior

Uberaba, MG

Maior/2016

*“É justo que custe muito
o que muito vale.” Santa
Tereza de Jesus*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais Hélio e Railda, minha irmã Nielly, pelo incentivo, pelos conselhos e pela paciência, por terem acreditado em mim até hoje. Ao meu namorado Fernando pelo amor e admiração. Aos amigos de fé que me fizeram permanecer firme em meu propósito.

Ao professor Dr. Álvaro Ferreira Junior que além da função de orientador foi amigo e conselheiro.

Aos alunos de iniciação Malu, José Eduardo, Elza e Maurício, obrigada pela boa vontade e bom trabalho de sempre.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisado Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por incentivar os cursos de pós graduação no Brasil, assim como pelo apoio financeiro e tecnológico para realização desta pesquisa.

À Universidade de Uberaba e ao programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos pela oportunidade de realizar essa pesquisa.

À Universidade Federal de Uberlândia, à equipe do Laboratório de Tripanossomatídeos coordenado pelo Professor Dr. Cláudio Vieira Silva, pela fundamental colaboração para a execução dessa pesquisa. Aos doutorandos Marlus Alves dos Santos, Thaise Lara e mestranda Ana Flávia por toda paciência e ajuda nos experimentos.

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade de Uberaba, fiz amigas nesse local de trabalho.

Com toda certeza, alguns nomes não foram citados, porém isso não diminui minha imensa gratidão àqueles que se doaram para que esse trabalho fosse concluído.

O meu Deus sabe da minha eterna gratidão a Ele. Sei que nada seria possível se não fosse por sua graça, misericórdia e amor. Essa conquista foi presente dEle. Obrigada meu Deus.

Lista de Símbolos e Abreviaturas:

aa – Aminoácidos

Abs – Absorbância

APS – Persulfato de Amônio

BCR – Receptor de Antígeno de célula B

BSA – bovine serum albumin/ soro albumina bovina

DB – Dot-Blot

CCC – Cardiopatia Chagásica Crônica

CDR – Complementarity Determining Region/Região Determinante de Complementariedade

CD8 – cluster of differentiation 8/ agrupamento de diferenciação 8

DAB – 3,3' Diaminobenzidina

DAPI – 4',6-diamono-2-fenilindol

DC – Domínio Constante

DO – Densidade Óptica

DT – Dot-Blot

CL – Domínio constante da cadeia Leve

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent Assay/Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima

E. coli – Escherichia coli

Fc – Fragmento Cristalizável

FITC – Isotiocinato de Fluoresceína

Funasa – Fundação Nacional de Saúde

HCl – Ácido Clorídrico

Hist6 – Etiqueta de 6 histidinas

IA – Índice de Avidéz

IE – Índice Elisa

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IgY – Iminoglobulina Y

IFN- γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

IP – Imunização Primária

kDa – Kilodalton

kDNA – DNA do cinetoplasto

M – Molar

mg – Miligrama

MHC – Major Histocompatibility Complex/ Complexo de Histocompatibilidade Maior

mL – Mililitro

mm – milímetro

Mm – Milimolar

N – Normal

Na₂So₄ – Sulfato de sódio

nm – Nanômetro

°C – Graus Celsius

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – Phosphate Buffered Saline/ Tampão fosfato salino

PBS T – Phosphate Buffered Saline + tween 0,05%/ Tampão fosfato salino+ tween 0,05%

PEG – Polietilenoglicol

pH – Pontencial Hidrogeniônico

PI – Ponto Isoelétrico

P1 – Precipitado 1

P2 – Precipitado 2

PM – Peso Molecular

RIA – Radio Immuno Assay

RPM – Rotação por Minuto

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear

S1 – Sobrenadante 1

S2 – Sobrenadante 2

TA – Temperatura Ambiente

TCR – Receptor de antígeno da célula T

TGF- β – Transforming Growth Factor/ fator Crescimento Transformador

T. cruzi – Trypanosoma Cruzi

TMB – Tetrametilbenzidino

VL – Domínio variável da cadeia Leve

VP – Domínio variável da cadeia Pesada

WB – Western Blot

μg - Micrograma

μL – Microlitro

Lista de Figuras

Figura 1 Ciclo Evolutivo do <i>T. cruzi</i>	16
Figura 2 Estrutura das formas do <i>T. cruzi</i>	17
Figura 3 Desenho Experimental da produção de proteínas recombinantes.....	23
Figura 4 Estruturas de IgY e IgG.....	24
Figura 5 Transferência de imunoglobulina sérica para ovo durante a ovogênese.....	31
Figura 6 Desenho Experimental da metodologia de produção, extração e caracterização do anticorpo anti-P21r	32
Figura 7 <i>Layout</i> da Execução do gel de SDS-PAGE.....	36
Figura 8 <i>Layout</i> da execução dos ensaios de Dot-Blot.	40
Figura 9 Extração de anticorpos IgY da gema do ovo	45
Figura 10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% das frações obtidas durante extração de anticorpos IgY da gema do ovo.....	46
Figura 11 Reconhecimento de anticorpos IgY na P2 através do Dot Blot.....	47
Figura 12 Reconhecimento da Proteína recombinante P21 em ensaio de Dot Blot	48
Figura 13 Reconhecimento da Proteína nativa P21 em ensaio de Dot Blot.....	47
Figura 14 Reconhecimento da Proteína nativa P21 em ensaio de Dot Blot.....	47
Figura 15 Cinética de produção de anticorpos IgY anti-P21r da primeira a sexta semana de imunização.....	50
Figura 16 Reatividade residual de imunocomplexos em <i>pools</i> semanais do grupo imunizado tratados com Uréia 6M.....	51
Figura 17 Índice de avidéz de anticorpos IgY anti-P21r em galinhas imunizadas com adjuvantes completo e incompleto de Freund	52
Figura 18 Titulação de anticorpos IgY anti-P21r de soro e gema de galinhas do grupo imunizado.....	53
Figura 19 Sensibilidade dos anticorpos IgY anti-P21r.....	54
Figura 20 Imunofluorescência para detecção de P21 nativa de <i>T. cruzi</i> em tecidos formolizados utilizando anticorpos IgY policlonais anti-P21r	55

Sumário

1	Revisão de Literatura	13
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.1.1	Importância médica	14
1.1.2	Importância veterinária.....	14
1.1.3	Ciclo de vida.....	14
1.1.4	Formas evolutivas e vias de infecção do hospedeiro.....	15
1.1.5	Virulência	16
1.1.6	Principais células hospedeiras	17
1.2	Proteínas recombinantes	18
1.2.1	Tecnologia de DNA recombinante	18
1.2.2	P21 recombinante	19
1.1	Imunoglobulina Y	19
1.2	Purificação e caracterização de anticorpos IgY	23
1.3	Aplicações	25
2	Objetivos	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	Justificativa.....	28
4	Material e Métodos	30
4.1	Antígeno	31
4.2	Aves.....	32
4.3	Imunização.....	32
4.4	Coleta dos ovos.....	33
4.5	Coleta de sangue.....	33
4.6	Extração de anticorpos IgY da gema do ovo.....	33
4.7	Eletroforese.....	34
4.8	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) indireto.</i>	36
4.8.1	Cinética e avidéz.....	36
4.8.2	Titulação dos anticorpos IgY anti-P21r.....	37
4.8.3	Sensibilidade.....	37
4.9	<i>Dot-Blot</i>	38
4.9.1	Reconhecimento de anticorpos IgY no P2 14%	38
4.9.2	Reconhecimento da proteína antigênica recombinante P21 por IgY anti-P21r contidos no P2 14%.....	39

4.9.3 Reconhecimento da proteína antigênica Nativa P21 por IgY anti-P21r contidos no P2 14%	39
4.9.4 Reconhecimento da proteína antigênica Nativa P21 por IgY contidos no soro de galinhas imunizadas	40
4.9.5 Imunofluorescência.....	40
5 Análise Estatística	42
6 Resultados.....	43
6.1 Anticorpos IgY foram extraídos da gema dos ovos por meio de procedimentos de fácil execução.	43
6.2 O tratamento da gema de ovos com água acidificada e Na ₂ SO ₄ resulta em uma fração enriquecida (P2 14%) em proteínas com peso molecular aparente de 180 kDa.....	43
6.3 Anticorpos IgY estão presentes na fração P2 14%	44
6.4 Após a imunização com P21r as galinhas transferiram, do sangue para a gema dos ovos, anticorpos IgY contra as formas recombinante e nativa da proteína P21.	45
6.5 Altos níveis de anticorpos IgY anti-P21r foram detectados na gema do ovo seis semanas após a imunização primária	47
6.6 Anticorpos IgY anti-P21r, mantiveram reatividade contra P21r após tratamento com uréia 6M.....	48
6.7 Anticorpos IgY anti-P21r sérico e das gemas de ovos alcançaram alta titulação	50
6.8 Anticorpos IgY anti-P21r sérico e das gemas de ovos alcançaram alta sensibilidade	50
6.9 Anticorpos IgY anti-P21r reconheceram a forma nativa da P21 de <i>T. cruzi</i> em cortes histológicos de tecido cardíaco.....	51
7 Discussão.....	53
8 Conclusões.....	57
9 Referências	58
10 ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal	66

Resumo

A doença de Chagas é um problema de saúde pública no Brasil e na América Latina. Estima-se que existam entre oito a dez milhões de humanos infectados na América Latina, com 14.000 mortes por ano. O Brasil apresenta 2,3 milhões de infectados e 6.000 mortes anuais. Uma proteína de 21 kDa (P21), expressa por todas as fases evolutivas de *T. cruzi*, atua como fator de virulência participando nos processos de invasão da célula hospedeira. A P21 recombinante (P21r) foi previamente sintetizada e as funções biológicas de sua forma nativa estão sendo esclarecidas através da P21 recombinante. Anticorpos IgY específicos, extraídos da gema do ovo de galinhas imunizadas, são ferramentas para estudos com protozoários. A produção de anticorpos IgY anti-P21r de *T. cruzi* é inédita e promissora para estudos com este patógeno. O objetivo desse estudo foi investigar a imunogenicidade da proteína P21r de *T. cruzi* por meio da produção e caracterização de anticorpos IgY policlonais específicos. Foram extraídos anticorpos IgY totais, livres de da maioria das proteínas da gema do ovo. Os anticorpos IgY séricos e da gema do ovo reconheceram P21r e P21 nativa. Os anticorpos IgY foram detectados na gema a partir da segunda semana após a imunização primária (I.P.). O pico de detecção foi verificado na sexta semana pós I.P. Os anticorpos IgY anti-P21r apresentaram maturação precoce da avidéz contra a proteína recombinante. O título dos anticorpos IgY séricos foi 1:25.600 e dos anticorpos extraídos da gema foi 1:12.800. Os anticorpos IgY séricos e da gema, na diluição 1:300, detectaram P21r até a concentração de $10^{-6}\mu\text{g/mL}$ e $10^{-5}\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A proteína P21 nativa foi detectada pelos anticorpos IgY anti-P21r, em cortes histológicos de tecido cardíaco de camundongos. Conclui-se que a P21r recombinante de *T. cruzi* é imunogênica e antigênica quando utilizada para produção de anticorpos IgY em modelo *Gallus gallus domesticus*. Os anticorpos IgY anti-P21r são ferramentas biológicas promissoras para detecção da forma nativa da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

Chagas Disease is a public health problem in Brazil and Latin America. It is estimated that there are between eight and ten million humans infected in Latin America and 14,000 deaths per year. Brazil has 2.3 million infected and 6,000 deaths annually. A 21 kDa protein (P21) expressed by all developmental *T. cruzi* stages, acts as virulence factor participating in the invasion processes of the host cell. The recombinant P21 (P21r) was previously synthesized and how biological functions of YOUR natively being clarified through the recombinant P21 . Specific egg yolk IgY antibodies, obtained from immunized chickens, are promising tools for studies with protozoa. The production of IgY antibodies anti-P21r of *T. cruzi* is innovative for studies with this parasites. So, am of this study was to investigate the immunogenicity of *T. cruzi* protein P21r by production and characterization of egg yolk anti-P21r IgY polyclonal antibodies and verify whether these specific IgY are able to detect the native form of P21 protein. Total egg yolk IgY antibodies were extracted without unwanted egg yolk proteins and lipoproteins. Serum and egg yolk IgY antibodies recognized both P21r and native P21 protein. The egg yolk IgY antibodies were detected at second week post primary immunization (p.p.i.). Peak of anti-P21r IgY antibodies was observed at sixth week p.p.i. Anti-P21r IgY antibodies revealed a precocious avidity maturation against *T. cruzi* recombinant protein. Titration for serum anti-P21r IgY revealed a title of 1:25600 and for egg yolk IgY a title of 1:12,800. Anti-P21r serum or egg yolk IgY antibodies, both diluted at 1:300, recognized P21r protein at final concentration of $10^{-6}\mu\text{g/ml}$ and $10^{-5}\mu\text{g/mL}$, respectively. The native form of P21 protein was detected in heart histological sections from experimental infected mice by incubation with anti-P21r IgY antibodies. In conclusion, P21 recombinant protein from *T. cruzi* parasite was immunogenic and antigenic for IgY antibodies production by *Gallus gallus* model. In this context, anti-P21r IgY egg yolk antibodies are promising tools for detection of the native form of the P21 protein and studies with *Trypanosoma cruzi*.

1 Revisão de Literatura

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é um flagelado da família Trypanosomatidae, que parasita mamíferos e tem como hospedeiros invertebrados numerosas espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae (REY, 2008). Os vetores se alimentam durante a noite, momento em que eles simultaneamente liberam *T. cruzi* em suas fezes infectando a pele do hospedeiro vertebrado. Parasitas entram no corpo através de feridas na pele ou através de membranas mucosas. Outras vias menos comuns de transmissão incluem a transmissão congênita, a ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas e transfusão de sangue, tecido ou órgãos contaminados (BERN et al., 2011).

A migração de pessoas infectadas com o *T. cruzi* ou apresentando a doença de Chagas em suas formas clínicas variadas, provindas de países endêmicos para países não endêmicos, ocasionou a globalização da doença de Chagas (COURA et al., 2014).

O *T. cruzi* possui uma mitocôndria grande e única contendo um cinetoplasto localizado na base do flagelo. O DNA do cinetoplasto (kDNA) é organizado em uma rede de círculos ligados entre si. O núcleo do parasito é fibrilar e tem posição central, ficando o cinetoplasto a ele anterior, segundo o seu estágio evolutivo. O único flagelo emerge do corpo basal, adjacente a capa mitocondrial do cinetoplasto, sendo constituído por nove pares de microtúbulos periféricos longitudinais e um central, que é envolvido por uma bainha que é uma extensão tubular da própria membrana celular. O corpo de *T. cruzi* é envolvido pela membrana citoplasmática (8 a 10 nm de espessura), sob a qual situa-se o sistema de microtúbulos (CIMERMAN; CIMERMAN, 2002).

1.1.1 Importância médica

A doença de Chagas, é um dos principais problemas de saúde de pública no Brasil e na América Latina. Estima-se que existam entre oito a dez milhões de humanos infectados na América Latina, com 14.000 mortes por ano (MARTINS-MELO et al., 2014).

Doença de Chagas é uma importante causa de cardiomiopatia na América Latina, entre 10% a 30% de todos os indivíduos infectados irão adquirir cardiopatia chagásica crônica (CCC). O tratamento com benzonidazol apresenta bons resultados apenas quando iniciado na fase aguda ou o mais breve possível após a infecção. O tratamento em casos crônicos da doença não tem efeito positivo (PRATA, 2001).

1.1.2 Importância veterinária

A doença de Chagas afeta clinicamente animais domésticos, como os cães, gatos e suínos (BEZERRA et al., 2014), que apresentam miocardite quando jovens e cardiomiopatia dilatada em idade avançada. Inicialmente esses animais são tidos como reservatórios da doença, juntamente com animais silvestres como tatu e o gambá (MONTEIRO, 2011). As galinhas têm sido consideradas como fonte de alimento para os Triatomíneos (BEZERRA et al., 2014).

1.1.3 Ciclo de vida

T. cruzi possui um ciclo complexo e possui diferentes formas evolutivas. Seus hospedeiros vertebrados incluem o homem e mamíferos pertencentes a sete ordens diferentes como gambás, morcegos, roedores, tamanduás e macacos e o seu inseto vetor é o triatomíneo, popularmente conhecido como “Barbeiro” como *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002). Há multiplicação das formas epimastigotas no intestino posterior do inseto (Figura 1). Na ampola retal (intestino posterior) do triatomíneo, as formas epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes. Ao penetrar no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) onde, sob a forma amastigota, voltam a multiplicar-se. Ocorre então a passagem para o sangue como tripomastigotas, e disseminam-se pelo organismo. O ciclo fecha quando o vertebrado infectado é parasitado por outro triatomíneo e as formas tripomastigotas chegam ao intestino do inseto (REY, 2008).

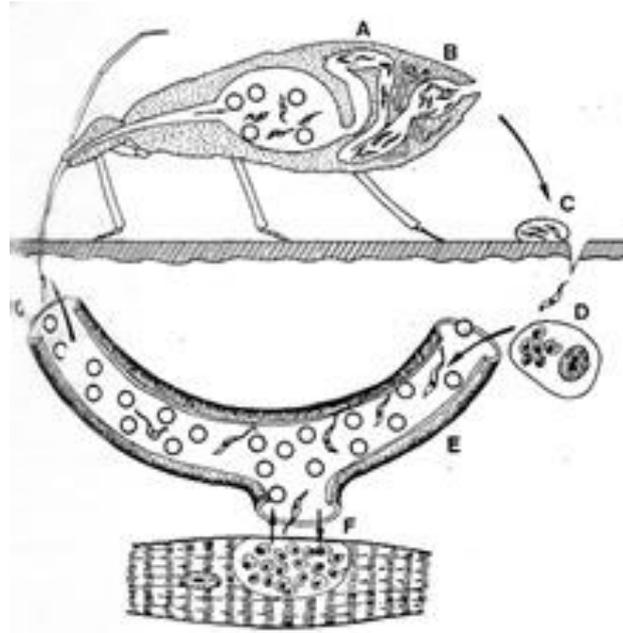


Figura 1 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. O Triatomíneo realiza a ingestão de sangue contendo tripomastigotas. No intestino médio do inseto, as formas evolutivas ingeridas transformam-se em epimastigotas. Já no intestino posterior, evoluem para amastigotas multiplicando-se (A). Na ampola retal do triatomíneo (B), os parasitas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes (C); ao penetrar no hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas invadem macrófagos (D) onde sob a forma de amastigota, voltam a multiplicar-se. As formas amastigotas passam para o sangue como tripomastigotas (E), e disseminam-se pelo organismo, atacando músculos e outros tecidos (F). O ciclo se completa quando o paciente é sugado por outro triatomíneo (G) e as formas tripomastigotas chegam ao intestino do inseto (REY, 2008).

1.1.4 Formas evolutivas e vias de infecção do hospedeiro

Existem três formas evolutivas principais (Figura 2). Tripomastigotas: membrana ondulante, tamanho, fusiformes e alongados, com o cinetoplasto situado posteriormente ao núcleo e numa posição terminal ou subterminal no corpo celular, emergindo flagelo da chamada bolsa flagelar, proximamente ao cinetoplasto. Tem grande mobilidade e ocorrem na corrente sanguínea do vertebrado e nas porções mais distais do tubo digestivo do vetor, não dispondo da capacidade replicativa (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

A forma amastigota é encontrada dentro da célula parasitada; é ovóide e mede 4 μm no maior diâmetro. Esta forma não possui flagelo ou membrana ondulante, seu núcleo é ovóide e

compacto. O cinetoplasto da amastigota tem aspecto de disco convexo-côncavo próximo ao núcleo. Sua multiplicação ocorre por divisão binária simples, o ciclo intracelular dura cerca de 5-6 dias e produz cerca de nove gerações de parasitas. Epimastigotas são formas alongadas, em que o flagelo se origina à frente e proximalmente ao núcleo e emerge na extremidade anterior do parasito, são muito móveis (NEVES, 2005). Ao nível do estômago do vetor ocorrem outras formas esféricas do parasito, capazes de replicação e com pequeno flagelo livre que circula bordeja o corpo celular, os esferomastigotas (NEVES, 2005).

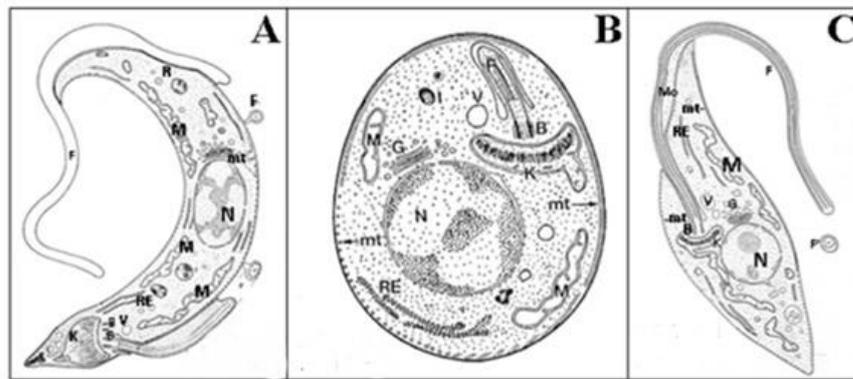


Figura 2: Ultra estrutura das formas tripomastigota, amastigota e epimastigota de *T. cruzi* (desenho esquemático). A: Epimastigota: B - blefaroplasto; F - flagelo; G - aparelho de Golgi; K - cinetoplasto; M - Mitocôndria; Mt - microtúbulos; N - núcleo; RE - retículo endoplasmático; V - vacúolo. **B: Amastigota** As letras tem a mesma significação que na figura A I:Inclusão citoplasmática; **C: Tripomastigota** As letras tem a mesma significação da figura A. F', corte transversal do flagelo; Mo, membrana ondulante (REY,2008).

1.1.5 Virulência

A capacidade de infectar e multiplicar no hospedeiro é reconhecida como a virulência de um patógeno. Normalmente as populações de *T. cruzi* tem característica clonal. *T. cruzi* a virulência depende da linhagem do parasito, assim como das condições que prevalecem entre uma determinada cepa do flagelado e o hospedeiro vertebrado em causa. A fonte de infecção pode ser uma das razões da diversidade do comportamento do parasito (REY, 2008).

A proteína de 21 kDa (P21) de *T. cruzi* participa no fenômeno de invasão da célula hospedeira, na qual provoca modificações no citoesqueleto por meio de ligação a um receptor para quimiocinas, chamado CXCR4, presente na superfície celular, sendo considerada um fator de virulência do *T. cruzi* (RODRIGUES, 2012).

Foi verificado que a P21 é uma proteína expressa em formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares de *T. cruzi*, cuja forma recombinante (P21r) adere a superfície de um tipo de células imortais de linhagem celular humana, as células HeLa de forma dose dependente (SILVA et al., 2009). Devido à ampla diversidade genética existente em entre as espécies de *T. cruzi*, foi feita a sua divisão em cepas. Foi observado que anticorpos policlonais desenvolvidos contra P21 recombinante inibem a invasão celular pela cepa G de *T. cruzi*, mas não pela cepa CL. A proteína P21 participa dos processos de invasão celular e no incremento da fagocitose (RODRIGUES et al., 2012).

1.1.6 Principais células hospedeiras

Na região do tegumento onde se deu a penetração, os tripomastigotas são fagocitados por macrófagos e transformam-se em amastigotas, iniciando-se a fase de multiplicação intracelular. De cada amastigota formam-se por divisão binária, dezenas de elementos filhos que, ao fim de 4 a 6 dias, readquirem a forma tripomastigota e, depois de lisar a célula hospedeira, ganham espaços intersticiais (REY, 2008). Quando ocorre esta ruptura, formas de tripomastigotas caem na corrente sanguínea ou invadem células vizinhas, para novo ciclo; formas amastigotas que não podem se diferenciar mais, sucumbem e degeneram, fato este da maior importância na gênese e dinâmica do processo inflamatório local (CIMERMAN, CIMERMAN, 2002).

Em cultivos *in vitro* macrófagos fagocitam tanto os epimastigotas como os tripomastigotas. Ambas as formas são vistas inicialmente, no interior de vacúolos digestivos (fagossomos), mas tem um destino diferente. Os epimastigotas são digeridos, enquanto os tripomastigotas escapam do vacúolo e se instalam no citoplasma do macrófago, onde se transformam em amastigotas. Todos os tipos de células cultivadas de mamíferos são passíveis de invasão por *T. cruzi*, porém apenas as formas tripomastigotas podem penetrar em elementos que não desenvolvam grande atividade fagocitária (REY,2008).

O mecanismo de interiorização corresponde a um processo de fagocitose induzida, de que participam tanto o parasito como a célula hospedeira, sendo precedida pela aderência de tripomastigotas à membrana do macrófago ou de outras células (RE, 2008). A concentração de Ca^{2+} tem sido também considerada um fator importante na penetração do parasita na célula hospedeira e facilita a chegada dos lisossomas para as proximidades do parasita chegando mesmo a fazer parte da membrana do vacúolo fagocitário. No espaço intracelular as formas

epimastigotas são destruídas dentro do vacúolo fagocitário e os tripomastigotas sobrevivem resistindo às ações das enzimas lisossômicas se desenvolvendo livremente no citoplasma da célula, onde se transformam em amastigotas (NEVES, 2005).

1.2 Proteínas recombinantes

1.2.1 Tecnologia de DNA recombinante

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a produção de proteínas diferentes em grande quantidade. O sistema de expressão adequado depende da proteína a ser produzida. O entendimento dos três processos principais que a célula utiliza para que a informação genética seja expressa, replicação, transcrição e tradução é indispensável para a produção de proteínas recombinantes. Em última análise, a mensagem genética presente no DNA pode ser decifrada e expressa na forma de proteína. Utilizando deste conhecimento, dos controles da expressão gênica e das preferências de códons em *Escherichia coli*, proteínas de interesse biotecnológico podem ser produzidas em grande escala (MIYAMOTO, 2011).

O processo de transformação, isto é, a introdução de um DNA exógeno em uma célula hospedeira, foi inicialmente desenvolvido em células bacterianas, entre elas as Gram negativas (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2003). *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa que foi escolhida para a produção de proteínas recombinantes por ser uma bactéria de estrutura conhecida e com domínio de seu genoma o que permite a inserção de genes exógenos de interesse. Na natureza, os processos de recombinação gênica que envolvem a troca de material entre bactérias são classificados em três tipos: conjugação, transdução e transformação. Na conjugação o material genético é transferido pelo contato célula a célula por meio de *pilus* sexual. A transdução envolve a participação de vírus bacteriófagos, transportadores de DNA bacteriano, na transferência do material genético. A transformação é o mais simples, pois requer apenas DNA livre no meio de cultura (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2003).

Na transformação busca-se a introdução do DNA (plasmídeo) dentro da célula hospedeira. Uma vez no interior da célula o plasmídeo, que possui uma origem de replicação autônoma, isto é, a capacidade de se replicar independentemente da replicação do cromossomo bacteriano, produzirá inúmeras cópias idênticas dentro da célula hospedeira transformada (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2003). O sistema pET foi desenvolvido para a clonagem e a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. O produto desejado pode compor mais de 50% do total das proteínas celulares em poucas horas de indução. O vetor pET-28 a-c (+) carrega

uma sequência assim arranjada: uma etiqueta de aminoácidos histidina (His-tag) na extremidade N-terminal seguida de um sítio de clivagem para trombina. Há uma sequência codificadora para resistência a antibióticos, por exemplo, kanamicina e outra induzível para produção de proteínas que degradam lactose chamada operon *lac*. As bactérias transformadas são selecionadas por meio da adição do antibiótico para o qual são resistentes. A indução de produção da proteína recombinante é feita por meio da adição de um indutor do operon *lac*. A extração das proteínas recombinantes envolve uma etapa de purificação em coluna de resina de níquel com afinidade para as etiquetas de histidina. Após a purificação a etiqueta de histidina é removida por meio de tratamento com trombina. Os resultados de ensaios de invasão e fagocitose podem demonstrar se a proteína recombinante possui propriedades biológicas semelhantes a forma nativa (MIYAMOTO, 2011).

1.2.2 P21 recombinante

A sequência genômica de *T. cruzi* que codifica a molécula de P21 (GenBank XM_812182) foi clonada em fusão com etiqueta de histidinas (His-tag) utilizando o vetor pET-28a (Novagen) para a produção de P21 recombinante (SILVA et al., 2009). A P21 é uma proteína ubíqua entre as formas evolutivas de *T. cruzi*, com peso molecular de 21 kDa e que é secretada para o meio extracelular. Observações sugerem que em condições de estresse o parasito aumenta a produção de P21. A forma recombinante da P21 (peso molecular de 18 kDa), em semelhança à forma nativa, incrementa a invasão por tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* em células HeLa de maneira dose dependente. Além disso, P21 recombinante aumenta a fagocitose de partículas realizada por macrófagos inflamatórios (SILVA et al., 2009).

1.1 Imunoglobulina Y

Klempner, há mais de um século, fez a primeira descrição da presença de anticorpos na gema do ovo de galinha. Durante a folículo-gênese esses anticorpos são transferidos do sangue da galinha para a gema do ovo, com o propósito de imunizar, de forma passiva, o descendente. Essa descoberta permaneceu esquecida até a década de 80, quando a comunidade científica iniciou a busca por métodos e processos alternativos para a produção de anticorpos, os quais atendessem os princípios de bem-estar animal, em que os animais são livres de dor, doenças, desconforto, podem expressar seu comportamento natural e não passam por fome ou sede (ANIMAL WELFARE INSTITUTE, 2003).

Nesse contexto, a possibilidade de extrair anticorpos da gema do ovo elimina a sangria para a obtenção de anticorpos (SCHADE, 2005).

A eficiência de uma resposta imunológica depende de vários aspectos, entre eles, a imunogenicidade e antigenicidade do antígeno, do repertório para o reconhecimento de antígenos e da estimulação de memória no animal imunizado (ABBAS, 2008). As células da imunidade adaptativa são os linfócitos T e B, as quais estão presentes em galinhas e mamíferos, reconhecem os antígenos por meio de seus receptores TCR (inglês, *T cell receptor*) e BCR (inglês, *B cell receptor*), respectivamente (TIZARD, 2009).

O timo é o órgão linfóide primário no qual ocorre a maturação dos linfócitos timo-dependentes (linfócitos T) (ÓLAH; VALVERDE, 2008). As atividades de linfócitos T de galinha são semelhantes às dos mamíferos (DAVISON et al., 2008). Há duas populações de linfócitos T: (i) citotóxicos e (ii) auxiliares. Para o reconhecimento do antígeno, os TCRs se ligam a sequências peptídicas lineares, produzidas a partir do processamento antigênico de proteínas imunogênicas, ligadas às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (inglês, *Major Hystocompatibility Complex*, o MHC) de classe 1 ou de classe 2.

Os linfócitos T citotóxicos executam suas funções efetoras na eliminação de patógenos intracelulares (por exemplo, os vírus e células tumorais) por meio do reconhecimento simultâneo do MHC de classe 1, via receptor CD8 (inglês, *cluster of differentiation 8*), e do epitopo apresentado, via TCR. Em função desse arranjo molecular para reconhecimento do complexo MHC classe 1/epitopo, esse linfócito também é conhecido com T CD8. Além do CD8 associado ao TCR, também há uma molécula transdutora de sinais denominada CD3 a qual está presente em todas as populações de linfócitos T.

Os linfócitos T auxiliares (inglês, *T helper*) coordenam a resposta imune adaptativa por meio da secreção de citocinas, as quais estão agrupadas em perfis de acordo com o efeito biológico produzido. Em semelhança ao linfócito T CD8, o linfócito T auxiliar detecta simultaneamente o MHC, porém o de classe 2, via receptor CD4 e o epitopo, via TCR. Nesse contexto, o linfócito T auxiliar também é conhecido como T CD4. O perfil Th1 (inglês, *T helper 1*) é associado com a polarização da resposta imunológica para reações pró-inflamatórias. A expressão aumentada das citocinas Interferon-gama (IFN- γ) e Interleucina-2 (IL-2) caracteriza o perfil Th1. O perfil Th2 é antagônico a Th1. As citocinas IL-4 e IL-5 resultam em uma polarização anti-inflamatória da resposta imunológica, a qual tenta equilibrar os efeitos pró-inflamatórias de Th1. O perfil T regulatório (Treg) está associado à tolerância imunológica observada, por exemplo, na mucosa do trato digestório. Esse último perfil é caracterizado pela

produção de TGF- β (inglês, *Transforming Growth Factor – Beta*) e IL-10 (ABBAS, 2008; TIZARD, 2009).

Nas aves a bursa de Fabricius é o órgão linfoide responsável pela maturação dos linfócitos B (Bursa-dependentes), enquanto que nos mamíferos a maturação dos linfócitos B acontece na medula óssea vermelha (inglês *bone-marrow*) e, em alguns casos, nas placas de Peyer (TIZARD, 2009; DAVISON et al., 2008). Os linfócitos B são os precursores dos plasmócitos, os quais são os produtores de anticorpos. Cada linfócito B possui de 200.000 a 500.000 BCRs na superfície da membrana citoplasmática. Virtualmente, o repertório de BCR, gerado em uma galinha, permite o reconhecimento de qualquer antígeno na natureza seja ele proteína, carboidrato, lipídeo ou ácido nucléico. Nas galinhas são descritas três classes de imunoglobulinas (Ig): IgM, IgA e IgY, de acordo com a cadeia pesada que forma estas moléculas (TIZARD, 2009).

O anticorpo IgY é o de maior concentração sérica (6mg/mL a 13mg/mL), seu peso molecular é de aproximadamente 180 kDa e seu ponto isoelétrico está entre o [pH] 5,7 e 7,6 (PANTOJA, 2000). Os anticorpos IgY são transferidos para a gema do ovo durante a ovogênese, por meio de receptores específicos localizados na membrana vitelínica, como forma de imunização passiva para o descendente (KOWALCZYK et al., 1985; WEST; HERR; BJORKMAN, 2004; SCHADE, 2005; GHARAIBEH, 2008). A transferência de anticorpos IgY do sangue para a gema segue ciclos circadiano, infradiano e ultradiano (HE et al., 2014).

O anticorpo IgY é passado para a gema através de receptores específicos em grandes quantidades (Figura 4), a proporção de IgY na gema é comparável a presente na linfa (de 6 a 13mg/ml). O rendimento de anticorpos IgY específicos é calculado entre 1% e 10% do total de anticorpos IgY encontrados na gema (PAULY et al., 2009). O rendimento utilizando soro de coelho é quatro vezes menor (HATTA et al., 1993; XU et al., 2011) A passagem transovariana leva aproximadamente 5 dias. Se o tempo de passagem para dentro da gema é levado em consideração, o curso de titulação depois da imunização pode ser detectado diretamente na gema. Os anticorpos de alta especificidade podem ser isolados em grandes quantidades a partir da gema de ovo sem resquícios indesejados de moléculas de IgM ou IgA, já que estes estão presentes apenas na clara do ovo (CALANDER, 2002).

A estrutura do anticorpo IgY é composta de duas cadeias leves (inglês *light chain*) idênticas (~35 kDa) e duas cadeias pesadas (~55 kDa, inglês *heavy chain*) Úpsilon (letra grega Y) também idênticas. As cadeias leves são formadas por um domínio variável na extremidade amino-terminal e um domínio constante na extremidade carboxi-terminal. No domínio variável estão localizadas três regiões hipervariáveis denominadas “Regiões Determinantes de

Complementaridade” (inglês *Complementarity Determining Region*, CDR). De maneira semelhante a cadeia pesada Y também apresenta um domínio variável amino-terminal com três CDRs. Diferente da cadeia leve há quatro domínios constantes na cadeia pesada, numerados de um a quatro no sentido amino-terminal para carboxi-terminal (Figura 3).

Considerado um ancestral dos anticorpos IgG e IgE dos mamíferos, o anticorpo IgY está envolvido com a opsonização de patógenos, ativação do complemento aviário e reações alérgicas nas galinhas (SCHADE et al., 1996; PAULY et al., 2011). Há uma hipótese de que durante a evolução dos genes que codificam os anticorpos, pode ter ocorrido a duplicação do gene da IgY dando origem ao IgG e ao IgE (TAYLOR et al., 2008). Os anticorpos IgA e IgM de galinhas se assemelham aos IgA e IgM de mamíferos, no peso molecular (PM), na estrutura e a mobilidade eletroforética (CALANDER, 2002). Uma característica importante dos anticorpos IgG é a região de dobradiça, rica em resíduos do aminoácido prolina, localizada entre os domínios constantes um (DC1) e DC2 da cadeia pesada (TIZARD, 2009). A região de dobradiça nos anticorpos IgY é menos desenvolvida o que acarreta uma menor mobilidade da estrutura do anticorpo (SHIMIZU et al., 1992).

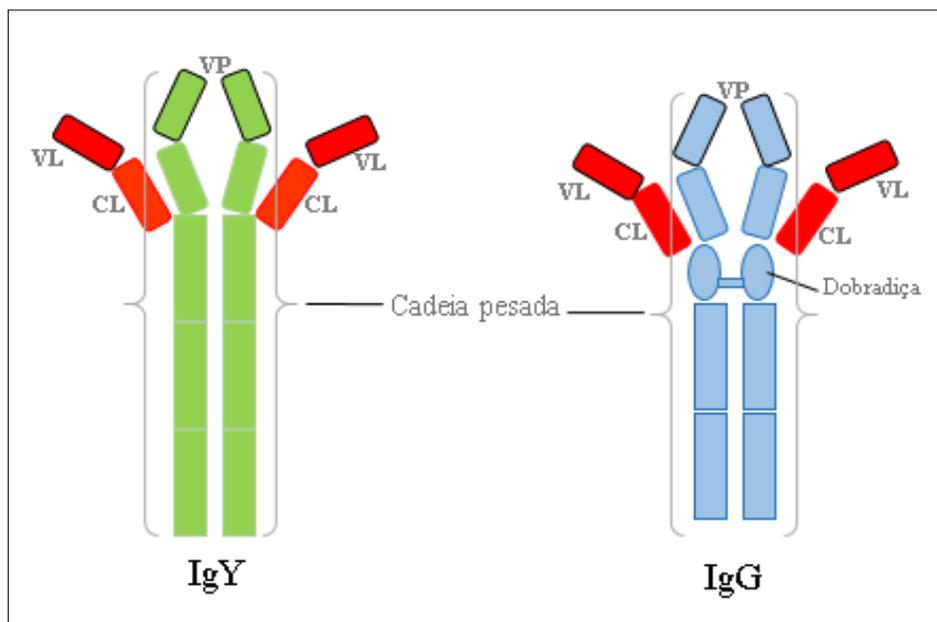


Figura 3: Estruturas de IgY e IgG. IgY e IgG possuem duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. O anticorpo IgY possui em sua cadeia pesada um domínio variável (VP) e quatro domínios constantes, em sua cadeia leve um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL). O anticorpo IgG possui em sua cadeia pesada um domínio variável (VP) e três domínios constantes, em sua cadeia leve um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL), a flexibilidade da molécula é proporcionada pela região da dobradiça.

A geração da diversidade no repertório de anticorpos, nos mamíferos, acontece por meio de rearranjo gênico, no qual os genes que codificam a os domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada são aleatoriamente rearranjados. Ocorre também a hipermutação somática que consiste na inserção randômica de nucleotídeos no segmento gênico que já passou pelo rearranjo (TIZARD, 2009). Nas galinhas, o número de genes que codificam anticorpos é reduzido, por outro lado há um número significativo de sequências não codificadoras (pseudogenes) as quais são utilizadas para complementar o rearranjo dos genes dos anticorpos IgY, por meio da permutação de blocos de nucleotídeos (DAVISON et al., 2008).

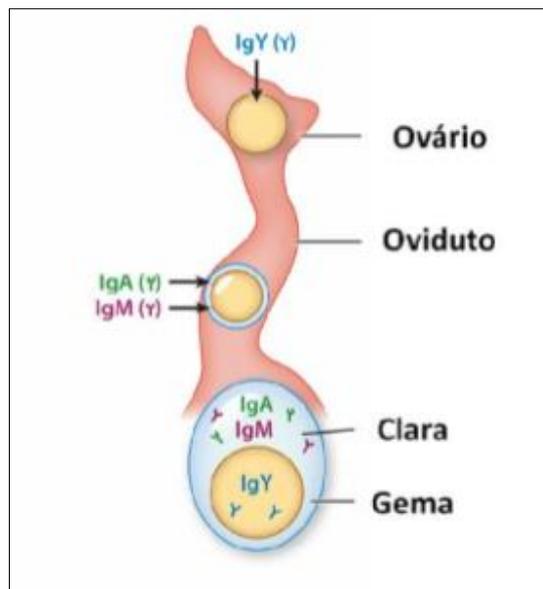


Figura 4: Transferência de imunoglobulinas séricas para o ovo durante a ovogênese (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). Imunoglobulinas A e M ficam armazenadas na clara do ovo, e imunoglobulinas Y na gema do ovo.

1.2 Purificação e caracterização de anticorpos IgY

Os métodos para purificação dos anticorpos IgY da gema do ovo, removem contaminantes, devem conservar as funções dos anticorpos extraídos, ser um protocolo de baixo custo e não exige equipamentos sofisticados para sua condução (FERREIRA JUNIOR et al., 2012). A escolha de um método é influenciada pela escala de purificação, impacto sobre o meio ambiente e minimizar as quantidades de resíduos (SCHADE et al., 2005). Em geral, os métodos podem ser divididos em três grupos principais: (i) precipitação por meio de ajuste do ponto isoeletrico, por exemplo, pela adição de ácido clorídrico (HCl); (ii) precipitação por meio remoção da camada de solvatação (*salting out*), por exemplo, pela adição de sulfato de sódio

(Na₂SO₄) e (iii) cromatografia por exclusão de peso molecular, troca iônica ou afinidade (SCHADE, 2005). Após a purificação, os anticorpos IgY são caracterizados quanto sua especificidade, sensibilidade, avides e titulação. Diferentes testes podem ser empregados para a caracterização de um anticorpo específico, entre eles o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *Western Blot*, *Dot-blot* e imuno-histoquímica (HALDER et al., 2002).

O teste ELISA é um ensaio enzimático, com um resultado colorimétrico e pode ser realizado nas seguintes etapas: (i) sensibilização da microplaca de poliestireno, por meio de incubação do antígeno de interesse, diluído em tampão carbonato pH 9,6, em contato com o poliestireno (normalmente, após sensibilização com o antígeno, é realizada uma incubação com agentes bloqueadores, por exemplo, albumina sérica bovina, para eliminar os sítios remanescente para ligação de proteínas); (ii) formação dos imunocomplexos, por meio da incubação dos anticorpos IgY (anticorpo primário) com o antígeno imobilizado no poliestireno; (iii) detecção dos imunocomplexos, por meio de incubação de anticorpo anti-IgY (anticorpo secundário, uma IgG de mamífero), marcado com uma enzima (comumente a peroxidase); (iv) revelação, por meio da adição do substrato da enzima (peróxido de hidrogênio [H₂O₂]) e um cromógeno (por exemplo, 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidino [TMB], leitura 450 nm; sal diamônio 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) [ABTS], leitura 405 nm ou *o*-fenilenediamino [OPD], leitura 450 nm) (v) parada da revelação, por meio da adição de um ácido forte (ácido sulfúrico [H₂SO₄] 2N) para desnaturação da enzima e (vi) leitura dos resultados em espectrofotômetro em comprimento de onda compatível com o resultado colorimétrico após a parada.

Em comum, as técnicas de *Western blot* (WB) e *Dot-blot* (DB) são desenvolvidas sobre membranas de nitrocelulose, utilizam anticorpos secundários anti-IgY marcados com peroxidase e são reveladas na presença de H₂O₂ e 3,3' Diaminobenzidino (DAB, produz um precipitado insolúvel de cor marrom). Na execução do WB, os antígenos em solução aquosa são separados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). As proteínas de maior peso molecular (PM) têm uma migração mais lenta do que as de menor PM no PAGE. Em seguida, os antígenos são eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose, incubados com anticorpos primários (IgY específico) e depois com anticorpos secundários anti-IgY/peroxidase. A adição de DAB revela a presença dos imunocomplexos por meio da formação de um precipitado marrom insolúvel. O teste DB não utiliza antígenos separados em PAGE. A solução de antígenos é dispensada diretamente sobre a membrana de nitrocelulose, em seguida são seguidos os mesmos passos do WB. No DB é possível uma avaliação geral da especificidade dos anticorpos IgY, sem que se possa discriminar os alvos antigênicos.

Na imuno-histoquímica, cortes histológicos de tecidos preservados em formalina ou congelados são testados contra anticorpos IgY específicos. Os sítios antigênicos acessíveis são reconhecidos pelos anticorpos primários e os imunocomplexos são formados. Os imunocomplexos podem ser detectados com anticorpos secundários marcados com enzimas (por exemplo, peroxidase) e revelação com DAB ou fluoróforos (por exemplo, fluoresceína). A leitura dos resultados é realizada em microscopia óptica ou epifluorescência, respectivamente.

1.3 Aplicações

Entre as aplicações dos anticorpos IgY está o uso em imunoenaios para mensurar a concentração de proteínas ou peptídeos através de teste ELISA e WB (SCHADE, 2005). Os anticorpos IgY são utilizados em imuno-histoquímica para a detecção de antígenos de origem viral, bacteriana, origem vegetal ou animal, e também para avaliar a incidência de parasitas intestinais em animais domésticos e a contaminação dos alimentos com toxinas ou drogas (SCHADE, 2005).

O anticorpo IgY pode ser utilizado tanto em medicina veterinária quanto na medicina humana. Na América do Sul, por exemplo, há um grande interesse no desenvolvimento de pó-de-ovo contendo anticorpos como aditivo e substitutos do leite. Tais formulações são necessários para proteger as crianças de infecções intestinais fatais, especialmente em países pobres (SCHADE, 2005).

Os anticorpos IgY estão sendo cada vez mais utilizados na terapia ou profilaxia de doenças do trato gastrointestinal. Considerado um alimento funcional, em sua forma liofilizada, o anticorpo IgY tem efeito protetor frente a infecções virais do trato gastrointestinal (HORIE et al., 2004). Os anticorpos IgY administrados por via oral podem reduzir a colonização de *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística no pâncreas e até diminuir o tempo de infecção crônica. A utilização profilática de IgY ameniza a necessidade de tratamento com antibiótico, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de resistência de organismos a antibióticos (CALANDER, 2002). Foram produzidos anticorpos anti-Tg HSP70, uma proteína considerada um fator de virulência do *Toxoplasma gondii*, que é expresso durante a conversão de fases do parasito. O anti-Tg HSP70 foi usado para detectar a proteína, o anticorpo específico e os níveis de imunocomplexos (BARENCO et al., 2014). O anticorpo IgY foi empregado na identificação de novos biomarcadores para diagnóstico de doença de Chagas. Identificando proteínas nativas do parasito em pacientes chagásicos (WEN, 2016).

Anticorpos IgY monoclonais e policlonais foram utilizados na padronização de três diferentes formatos de ELISA de captura de antígeno para a detecção direta de leptospiros em sangue humano durante a fase aguda da doença (VASCONCELOS et al., 2009).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Determinar a imunogenicidade da proteína P21 recombinante (P21r) de *T. cruzi* em ensaios de produção, purificação e caracterização de anticorpos IgY utilizando o modelo *Gallus gallus domesticus* (galinha doméstica).

2.2 Objetivos Específicos

1. Imunizar galinhas domésticas com a P21r de *T. cruzi*;
2. Purificar anticorpos IgY anti-P21r da gema do ovo de galinhas imunizadas;
3. Caracterizar os anticorpos IgY anti-P21r quanto a: (i) cinética de soroconversão, (ii) especificidade, (iii) sensibilidade, (iv) maturação de avidéz e (v) titulação.
4. Aplicar os anticorpos IgY anti-P21r em ensaio de imuno-histoquímica para detecção de infecção experimental por *T. cruzi*.

3 Justificativa

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo considerada um problema de saúde pública em todo o mundo. São estimadas cerca de 16 milhões a 18 milhões de pessoas infectados pelo *T. cruzi* e 80 milhões sob risco de infecção. Estima-se oito a dez milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* na América Latina (MARTINS-MELO et al., 2014; WHO, 2015). Estima-se que 20.000 mortes ocorrem anualmente nos países endêmicos incluindo Canadá, Espanha, Japão e Austrália devido a complicações de Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) (CARVALHO, 2009). No Brasil, na Região Sudeste está concentrada o maior número de óbitos por Doença de Chagas, com o registro 11.577 mortes no período de 1996-1999 e tendência de aumento no número de internações (FUNASA, 2010).

A Doença de Chagas em sua fase crônica demanda tratamento e acompanhamento por tempo prolongado e indeterminado (FUNASA, 2010). O custo do tratamento para a doença de Chagas continua a ser substancial. No Brasil, Região Sudeste, os gastos com Doença de Chagas subiram de R\$ 568.000,00 no ano de 1996 para mais de R\$ 1.000.000,00 no ano de 2000. Nesse mesmo período, os gastos da FUNASA para controlar a Doença de Chagas foram de quase R\$ 60 milhões e para o controle da Dengue e da Febre Amarela foram mais de R\$ 450 milhões (FUNASA, 2010).

Os Estados Unidos da América é considerado uma área não endêmica, entretanto publicações recentes têm sugerido que a doença de Chagas está emergindo como uma preocupação de saúde pública (CANTEY, 2012). Embora a transmissão vetorial da doença de Chagas seja possível, existem outras formas de transmissão, tais como a ingestão de formas infectantes de *T. cruzi* em alimentos contaminados (DOMINGUES et al., 2015). Além disso, cães domésticos, animais silvestres e humanos vindos de áreas endêmicas, são hospedeiros de *T. cruzi* (ESCH; PETERSEN, 2013).

A invasão da célula hospedeira por *T. cruzi* é um evento crucial e complexo, necessário para o estabelecimento da infecção, que envolve um ligante expresso pelo patógeno e um receptor presente na célula hospedeira (BATHIA; GARG, 2008). Inicialmente é necessária a adesão das tripomastigotas às células hospedeiras por meio de diferentes moléculas de adesão, tais como glicoproteínas e proteases (DE SOUZA, 2002). Nesse contexto, foi isolada, caracterizada e sequenciada uma proteína com 21 kDa (P21) de *T. cruzi* que é expressa por todas as formas evolutivas do parasita e participa na invasão da célula hospedeira por meio de

interação com o receptor para quimiocinas CXCR4 (SILVA et al., 2009). P21 também exerce função inibitória sobre a resposta imune do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2012).

Os anticorpos séricos predominantes nas galinhas são da classe IgY, os quais são transmitidos passivamente para a gema do ovo com a finalidade de proteger o pintinho contra infecções, até que a sua própria resposta imune seja desenvolvida (TIZARD, 2009; KOVACS-NOLAN, 2012). Uma galinha pode produzir mais de 22,5g a 40g de IgY por ano, dos quais 2 a 10% são anticorpos específicos (HATTA et al., 1993; XU et al., 2011). O título elevado e duradouro de anticorpos IgY na gema do ovo de galinhas imunizadas aumenta o tempo de utilização das galinhas (LARSSON, 1998). Os anticorpos IgY aviários são análogos aos anticorpos IgG mamíferos (DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008). Os anticorpos IgY apresentam maturação de avidéz precoce em comparação com os mamíferos (WOOLLEY, 1995).

Os anticorpos IgY (i) não interagem com receptores para fragmento Fc; (ii) fixam as proteínas do sistema complemento de mamíferos e (iii) não sofrem interferência do fator reumatoide. Nesse contexto, os anticorpos IgY evitam a ocorrência de resultados falso-positivos durante a execução de imunoenaios (CARLANDER, 2000). A purificação dos anticorpos IgY além de remover contaminantes e conservar as funções dos anticorpos extraídos, demonstra ser um protocolo de baixo custo e que não exige equipamento sofisticados para sua condução (FERREIRA JUNIOR, et al., 2012).

O desenvolvimento de anticorpos IgY anti-P21 recombinante de *T. cruzi* é inédito e promissor para a utilização destes biológicos em estudos do parasito e no tratamento da Doença de Chagas.

4 Material e Métodos

A produção e caracterização de anticorpos IgY anti-P21 recombinante de *T. cruzi* incluiu eventos de imunização de galinhas, coleta e armazenamento de gema, extração dos anticorpos IgY, caracterização por meio de diferentes metodologias e detecção da proteína P21 na forma nativa. Os procedimentos executados estão sumarizados na Figura 5.

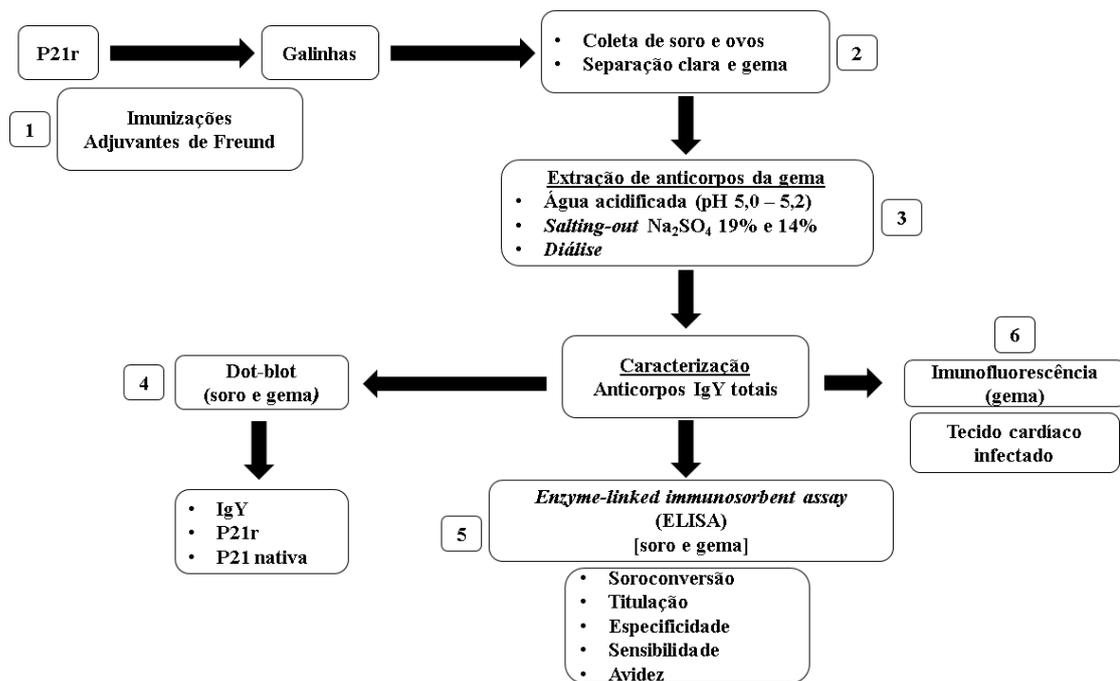


Figura 5: Desenho experimental da metodologia de produção, extração e caracterização do anticorpo anti-P21r. As galinhas foram imunizadas com a P21r, seus ovos foram coletados, identificados e armazenados a 4°C. Depois da gema ser isolada, os anticorpos nela contidos foram extraídos por deslipidização com água acidificada e precipitação com sulfato de sódio seguida de diálise. Os anticorpos foram caracterizados por testes de ELISA para avaliar soroconversão, titulação, especificidade, sensibilidade e avidéz e Dot-blot e imunofluorescência para reconhecimento da P21 nativa e P21r.

4.1 Antígeno

A síntese e purificação da proteína P21 recombinante foi executada no Laboratório de Tripanossomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia, conforme descrito por SILVA et al., (2009). A sequência da proteína P21 de *T. cruzi* está depositada no GenBank sob número de depósito EU0044210.1 (SILVA et al., 2009). O desenho esquemático da clonagem da proteína recombinante está descrito na Figura 6. Bactérias *Escherichia coli* foram transformadas com o DNA da proteína P21 de *T. cruzi*. A forma recombinante da P21 recebeu uma etiqueta com seis resíduos do aminoácido histidina (His6) seguido de sítio de clivagem para trombina. A P21r foi recuperada por cromatografia em coluna de níquel.

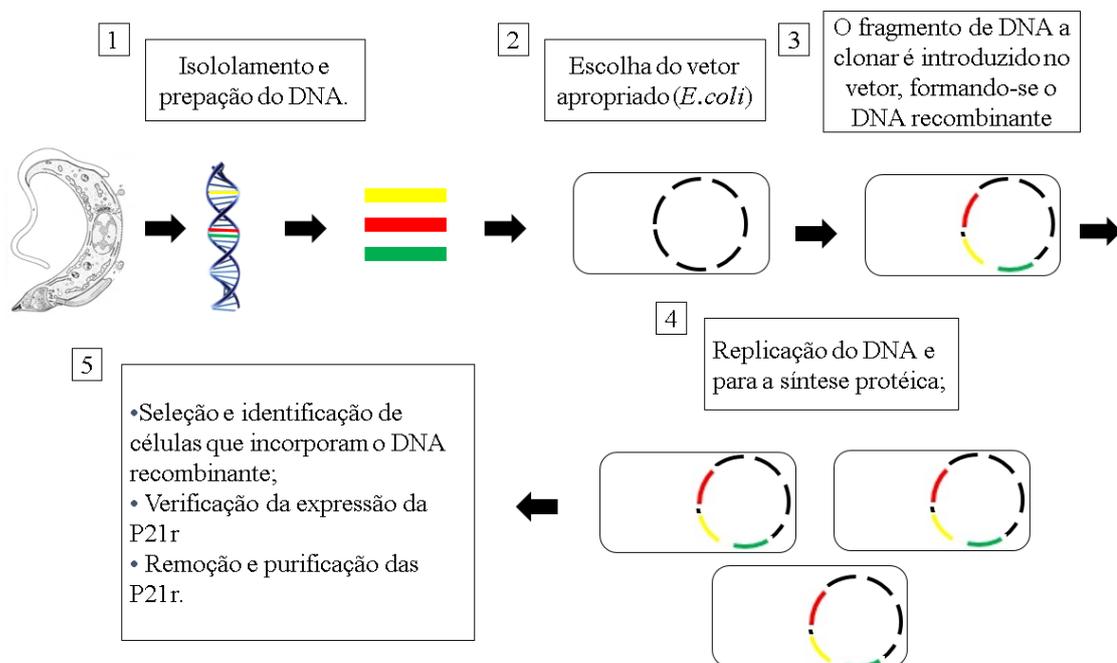


Figura 6: A clonagem da P21 recombinante (P21r). Após o isolamento do gene responsável pela produção da proteína P21, o vetor apropriado foi escolhido, a bactéria *E. coli*. O fragmento de DNA foi introduzido no vetor, formando-se o DNA recombinante. Ocorreu então a replicação do DNA recombinante e a síntese da P21 recombinante.

As bactérias *E. coli* BL21 foram transformadas utilizando como vetor para o DNA de *T. cruzi* o plasmídeo pET 28^a(+) segundo descrição de SILVA et al., (2009).

4.2 Aves

Foram utilizadas seis galinhas poedeiras da linhagem Hy-Sex brancas, com idade de 25 semanas. As galinhas foram separadas aleatoriamente em dois grupos, o grupo controle e o grupo imunizado com P21r. As aves foram alojadas individualmente em gaiolas de metal medindo 80x 60x 45cm (Comprimento x Largura x Altura). A alimentação, ração comercial para galinhas poedeiras, e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade de Uberaba – Protocolo 003/2014.

4.3 Imunização

As galinhas foram imunizadas com P21r emulsionada com adjuvantes de Freund (Tabela 1). Realizaram-se três imunizações, com intervalo de 14 dias entre cada uma delas. Na imunização primária foi utilizado o adjuvante completo de Freund e nas duas imunizações secundárias o adjuvante incompleto de Freund. O adjuvante completo de Freund foi utilizado apenas na primeira imunização porque sua fórmula inclui além da solução oleosa, micobactérias mortas ou fragmentos de sua parede celular, o que causa uma reação inflamatória severa, podendo ocasionar destruição de tecidos. O adjuvante incompleto de Freund possui apenas a emulsão oleosa, portanto sua resposta inflamatória é menos intensa se comparada ao adjuvante completo de Freund. O volume total de inoculo emulsionado foi de 500 uL, sendo 250 uL da solução de antígeno e 250 uL de adjuvante de Freund. O grupo controle recebeu PBS (pH 7,2 0,01M) ao invés de solução de antígenos, sendo que o volume administrado e o intervalo entre as imunizações foi o mesmo descrito para P21r. A inoculação foi realizada no músculo peitoral, lateral à quilha e distribuída em quatro pontos diferentes da musculatura.

O desenho experimental descrevendo os protocolos de imunização primária e dos *boosters* (segunda e terceira imunização) está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Esquema de imunizações em galinhas Hy-Sex com P21 recombinante (P21r) de *T. cruzi* utilizando protocolo de adjuvantes de Freund.

Animais	Imunizações		Observações
	Primária	Secundária (2x)	
Galinhas Hy-Sex	100 µg de P21r em 250 µL de PBS (pH 7,2) + 250 µL de ACF	100 µg de P21r em 250 µL de PBS (pH 7,2) + 250 µL de AIF	Intervalo de 14 dias entre as imunizações. Via intramuscular (I.M.)

ACF: adjuvante completo de Freund AIF: adjuvante incompleto de Freund.

4.4 Coleta dos ovos

Os ovos foram coletados diariamente, identificados com data da coleta e número da galinha e armazenados a 4°C.

4.5 Coleta de sangue

As amostras de sangue foram colhidas seguindo o seguinte esquema: uma amostra anterior à imunização primária e em seguida, com intervalos de sete dias, até a oitava semana pós-imunização primária. Em cada coleta foram puncionados 500µl de sangue por ave para acompanhamento da soroconversão. A coleta do sangue foi feita por meio de punção da veia ulnar utilizando agulha (12,7 x 0,3 mm), realizando antisepsia prévia com álcool 70%. A amostra de sangue foi centrifugada para obtenção do soro na velocidade de 3000 RPM por 15 minutos, temperatura ambiente. O soro foi acondicionado em microtubos plásticos, devidamente identificados e armazenado a -20°C.

4.6 Extração de anticorpos IgY da gema do ovo

A extração dos anticorpos da gema foi feita de acordo com AKITA; NAKAI (1992). Após a higienização da casca do ovo com álcool 70, foi feita a separação da clara e gema. A separação foi feita por meio de abertura no polo mais afilado da casca do ovo (2 cm de diâmetro) e, em seguida, vertendo a clara e reservando a gema. A gema foi depositada sobre papel filtro e lavada com PBS (pH 7,2, 0,01M). Em seguida, a membrana vitelínica foi rompida e o conteúdo vertido em tubos cônicos de 15mL, devidamente identificados e congelados a -20°C.

As gemas foram mantidas congeladas até o início do processo de purificação quando todos os ovos até a oitava semana foram coletados.

As gemas foram descongeladas a 4°C e homogeneizadas em água destilada, na proporção 1:10, sob agitação constante e em temperatura ambiente. O pH da mistura foi ajustado para a faixa de 5,0 a 5,2, pelo gotejamento de uma solução de ácido Clorídrico 1 N. A mistura acidificada foi armazenada *overnight* a -20°C. Em seguida, a mistura foi descongelada a 4°C, o pH foi ajustado para 7,2 pela adição de PBS 10x concentrado, e centrifugada a 12000 RPM, 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante (S1), chamado de fração solúvel em água, foi reservado e o precipitado (P1) foi armazenado para SDS-PAGE eletroforese.

Posteriormente, o sulfato de sódio foi adicionado ao S1, em duas concentrações diferentes, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Primeiro na concentração final de 19% (p/v), a mistura foi agitada durante uma hora à temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugada a 12000 RPM, 25 minutos a 4°C. O precipitado obtido (P2) foi ressuspenso em PBS 1X (pH 7,2; 0,01 M) e o sobrenadante 2 (S2) foi armazenado para testes posteriores. Ocorreu a segunda adição de sulfato de sódio, dessa vez em concentração de 14%, mantida a agitação lenta e constante por uma hora em temperatura ambiente, em seguida ocorreu o processo de centrifugação a 12.000 RPM, 25 minutos a 4°C. O precipitado obtido (P2 14%) foi reservado e o sobrenadante (S3) foi armazenado para testes posteriores. O P2 14% foi solubilizado em PBS (pH 7,2; 0,01M) e dialisado contra PBS (pH 7,2; 0.01M) durante 72 horas, a 4°C, com duas trocas diárias de tampão.

4.7 Eletroforese

Para avaliar a qualidade da purificação utilizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil sulfato de sódio (SDS). Alíquotas contendo 5µL das frações obtidas durante a purificação (gema; S1; P1; S2; P2 19%; P2 14% e P2 14% tratado com 2-mercaptoetanol) (Figura 7).

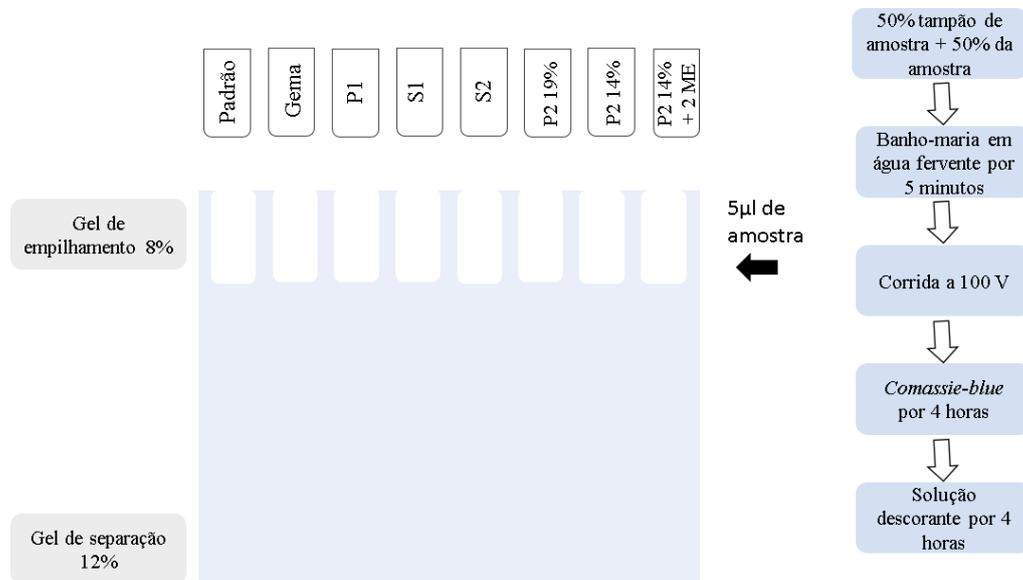


Figura 7: Layout da execução do gel de SDS PAGE. Etapas para execução de SDS-PAGE, após preparo do gel de separação na concentração de 12% e gel de empilhamento de 8%. As amostras de gema pura, P1, S1, S2, P2 19%, P2 14% e P2 14% + 2ME foram adicionadas ao tampão de amostra na proporção de 1:1. Após corrida a 100V o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue por quatro horas e em seguida descorado por 4 horas com solução descorante.

Alíquotas contendo 5µl de amostras, foram vertidas em gel de empilhamento 8% (tampão Tris-HCl 0,125M [pH 6,8]; Dodecil-sulfato de sódio [SDS] 0,1%, ETDA 2mM; acrilamida/bisacrilamida [29:1] 5%; Tetrametiletilenediamino [TEMED] 0,125%; persulfato de amônio [APS] 0,125%) e de separação a 12% (tampão Tris-HCl 0,375M [pH 8,8]; Dodecil-sulfato de sódio [SDS] 0,1%, ETDA 2mM; acrilamida/bisacrilamida [29:1]; Tetrametiletilenediamino [TEMED] 0,125%; persulfato de amônio [APS] 0,125%). Para a mensuração do peso molecular foi utilizado o marcador de peso molecular (10-250 Kda, *All Blue*, Bio- Rad, Estados Unidos). Foi aplicada corrente de 100V/gel. De acordo com o *layout* da eletroforese (Figura 7), no primeiro poço foram dispensados 5µl do padrão de peso molecular, no segundo poço 5µl de gema dissolvida em água destilada 1:10, na sequência P1, S1, S2, P2 19%, P2 14% e P2 14% tratado com 2-Mercaptoetanol, todas as amostras foram homogeneizadas em tampão 2X concentrado de amostra na proporção de 1:1, (Loading buffer) 100mM pH 6,8; SDS 2,0%; Azul de bromofenol 0,1%; Glicerol 10%; ditioneitol 100 mM. As bandas proteicas foram visualizadas por meio da coloração com *Comassie blue* R-250 a 0,1% (Bio-rad) por duas horas, sob agitação lenta, em temperatura ambiente, seguida de descoloração

em solução descorante (etanol 30%, ácido acético 10% e água destilada 60%) sob agitação lenta, oito horas em temperatura ambiente.

4.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) indireto.

4.8.1 Cinética e avides

O teste ELISA indireto foi executado conforme descrito por FERREIRA JUNIOR et al., (2012). Para se obter a maior relação sinal/ruído todos os reagentes foram titulados em bloco. As placas de poliestireno (Enterprise, Masterblock) foram sensibilizadas com uma solução de P21r na concentração final de 1 µg/mL diluída em tampão carbonato 0,06M (pH 9,6), “overnight” a 4°C. Entre cada etapa, a placa foi lavada 5X com uma solução de Tween 20 na concentração de 0,05% diluído em tampão PBS (pH 7,2, 0,01M) [PBS-T 0,05%].

Os sítios remanescentes para ligação de proteínas foram bloqueados por meio de incubação com uma solução de albumina sérica bovina (phosphate buffered saline with BSA, pH 7,4, Sigma-Aldrich) 1% diluída em PBS-T 0,05% (PBS-T-BSA 1%) durante uma hora a 37°C. Os anticorpos IgY, diluídos na proporção 1:300 em PBS-T-BSA 1%, foram incubados por uma hora a 37°C. Os anticorpos de coelho anti-IgY, marcados com peroxidase (Sigma-Aldrich), foram diluídos na proporção 1:30.000 em PBS-T-BSA 1% e incubados por uma hora a 37°C. A revelação foi realizada por meio da adição de 50 µL de peróxido de hidrogênio e TMB (Substrate Reagent Set BD OptEIA™, 555214), abrigado da luz e à temperatura ambiente. A reação foi interrompida após 15 minutos pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2N (Synthec). A densidade óptica (DO) foi lida no comprimento de onda de 630 nm (Mindray, MR-96^a). Amostras de IgY irrelevantes foram utilizadas como controles negativos.

A avaliação da DO das amostras foi realizada por meio do cálculo do índice ELISA (IE), utilizando a seguinte fórmula: DO amostra/cut-off, onde o cut-off representa a média da DO de três controles negativos acrescida de dois desvios padrão. Valores de IE iguais ou superiores a 1,0 foram considerados positivos (FERREIRA JUNIOR et al., 2012).

Para avaliar a atividade residual dos anticorpos IgY, metade dos poços na microplaca foram tratados com uma solução de uréia 6M, a uréia desgasta a ligação do paratopo e epitopo, permanecem ligados apenas os anticorpos mais específicos (Sigma-Aldrich) e metade tratadas com PBS (pH 7,2, 0,01M), por cinco minutos à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas cinco vezes com PBS-T 0,05%. A avides dos anticorpos IgY foi avaliada por meio do cálculo

do índice de avidéz (IA), para cada amostra de IgY anti-P21r, da seguinte forma: determinação da razão entre a absorbância (Abs) obtida nos anticorpos tratados com ureia e dos mesmos anticorpos não tratados com ureia, sendo o resultado expresso na forma de porcentagem (FERREIRA JUNIOR et al., 2012).

4.8.2 Titulação dos anticorpos IgY anti-P21r

A titulação dos anticorpos IgY anti-P21r foi realizada por meio de teste ELISA indireto. Foi utilizado um *pool* de gemas correspondentes à sexta semana pós-imunização primária pois apresentaram a maior DO na cinética de soroconversão. As microplacas de poliestireno (ENTERPRISE, Masterblock) foram sensibilizadas com P21r na concentração final de 1 µg/mL em tampão carbonato (pH 9,6; 0,06M), “*overnight*”, 4°C.

Os sítios remanescentes para ligação de proteínas foram bloqueados com PBS-T-BSA 1%. Os anticorpos IgY anti-P21r foram submetidos, a diluição seriada na razão dois, em PBS-T-M 1% a partir da proporção 1:100 até 1:25.600. Os procedimentos de lavagens com PBS-T 0,05%, revelação, parada e leitura foram realizados conforme descrição para o teste ELISA indireto. Foram consideradas positivas as diluições de anticorpos IgY anti-P21r que apresentaram $IE \geq 1,0$. O título para o *pool* de anticorpos IgY anti-P21r foi determinado por meio da obtenção da recíproca para a maior diluição positiva dos anticorpos IgY anti- P21r.

4.8.3 Sensibilidade

Para determinar a capacidade de detecção dos anticorpos IgY anti-P21r, microplacas de poliestireno (ENTREPRISE, Masterblock) foram sensibilizadas com diluições decimais seriadas de P21r, começando em 1mg/mL até 10^{-6} mg/mL “*overnight*”. Entre cada etapa do imunoenensaio (sensibilização, bloqueio, anticorpo primário, anticorpo secundário), a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T 0,05%. Para bloqueio dos sítios inespecíficos foi utilizado PBS T. BSA 1% por 60 minutos a 37°C. O anticorpo primário anti-P21r na proporção de 1:300 diluído em PBS-T-BSA 1% a placa incubou por 60 minutos a 37°C. Os anticorpos anti-IgY de coelho marcados com peroxidase (Sigma-Aldrich) foram incubados na diluição 1:30.000 em PBS-BSA 1%/1 hora a 37°C. As etapas de revelação, parada e leitura foram realizadas conforme a descrição apresentada no item teste ELISA indireto.

4.9 Dot-Blot

O ensaio de *Dot-Blot* foi realizado conforme (OMIDIAN, 2014) com adaptações. Foram realizados quatro procedimentos de Dot-Blot, conforme o layout na figura 8. Membranas de nitrocelulose, cut-off de 0,45 μm (BioRad), preparadas em cortes com quatro lados iguais de 2 cm foram utilizadas.

Dot-Blot 1	Dot-Blot 2	Dot-Blot 3	Dot-Blot 4
<p><u>Detecção de IgY em P2 14%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Antígeno: P2 14% • Revelação: IgG (coelho) anti-IgY conjugado com Peroxidase +DAB 	<p><u>Detecção de P21r por IgY do P2 14%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Antígeno: P21r • Anticorpo primário: IgY anti-P21r (gema) • Revelação: IgG (coelho) anti-IgY conjugado com Peroxidase+DAB 	<p><u>Detecção de P21 Nativa por IgY do P2 14%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Antígeno: P21nativa • Anticorpo primário: IgY anti-P21r (gema) • Revelação: IgG (coelho) anti-IgY conjugado com Peroxidase+DAB 	<p><u>Detecção de P21 Nativa por IgY do soro</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Antígeno: P21nativa • Anticorpo primário: IgY anti-P21r (soro) • Revelação: IgG (coelho) anti-IgY conjugado com Peroxidase+DAB

Figura 8: Layout da execução dos ensaios de Dot-Blot. Dot-Blot 1 ocorre a detecção de anticorpos IgY no P2 14%. Dot-Blot 2 é feita a detecção de P21r de *T. cruzi* por anticorpos IgY anti-P21r presentes no P2 14%. Dot-Blot 3 e Dot-Blot 4 detecção da P21 Nativa de *T. cruzi*, por IgY anti-P21r presentes no P2 14% e no soro de galinhas imunizadas, respectivamente.

4.9.1 Reconhecimento de anticorpos IgY no P2 14%

Foi realizado Dot-Blot para comprovar a presença do anticorpo IgY no P2 14%. Foram utilizados dois recortes de membrana, no primeiro foi depositado 5 μL de P2 14% e no segundo, o controle negativo, 5 μL de Gamaglobulina bovina. Os cortes foram colocados em estufa a 37°C, para a completa secagem das amostras.

Os sítios remanescentes para ligação de proteínas foram bloqueados com leite desnatado Molico (M) a 5% em PBS (pH 7,2; 0,01M), por duas horas, TA. Em seguida as membranas foram submetidas a seis lavadas, por cinco minutos, com PBS (pH 7,2; 0,01M) e foram incubadas com anticorpos IgG de coelhos anti-IgY marcados com peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição 1:10.000 em PBS-M 1% por duas horas, TA.

A revelação foi realizada por meio da adição de substrato: 2,5mg de 3'-5'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) - em 15ml de PBS pH 7,2; 0,01M (frasco escuro ao

abrigo da luz) e no momento do uso foi adicionado 225µl de peróxido de hidrogênio 30% (Sigma-Aldrich). A reação foi interrompida por meio de sucessivas lavadas das membranas em água destilada.

4.9.2 Reconhecimento da proteína antigênica recombinante P21 por IgY anti-P21r contidos no P2 14%

Foi realizado *Dot-Blot* para comprovação de que os anticorpos presentes no P2 14% reconheceriam a proteína antigênica recombinante P21 de *T. cruzi*. Foram utilizados dois recortes de membrana, em cada um deles depositados 5µL de P21r. Os recortes foram colocados em estufa a 37°C, para a completa secagem das amostras.

Os sítios remanescentes para ligação de proteínas foram bloqueados com leite desnatado a 5% em PBS (pH 7,2; 0,01M), por duas horas, TA. Em seguida as membranas foram submetidas a seis lavadas, por cinco minutos, com PBS (pH 7,2; 0,01M). Após seis ciclos de lavadas com PBS, a membrana utilizada como controle negativo, recebeu P2 14% de gemas de galinhas do grupo controle. A membrana utilizada para teste recebeu P2 14% de gemas de galinhas do grupo imunizado, todos anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:100 em PBS-M 1% “*overnight*”, TA. A incubação de anticorpos secundários bem como o processo de revelação e parada da reação foram efetuados conforme descrito no primeiro *Dot-Blot*.

4.9.3 Reconhecimento da proteína antigênica Nativa P21 por IgY anti-P21r contidos no P2 14%

Foi realizado *Dot-Blot* para comprovação de que os anticorpos presentes no P2 14% reconheceriam a proteína antigênica nativa P21 de *T. cruzi*. Foram utilizados dois cortes de membrana, em cada um deles depositados 5µL de P21 Nativa de *T. cruzi*. Os cortes foram colocados em estufa a 37°C, para a completa secagem das amostras.

Os sítios remanescentes para ligação de proteínas foram bloqueados com leite desnatado a 5% em PBS (pH 7,2; 0,01M), por duas horas, TA. Em seguida as membranas foram submetidas a seis lavadas, por cinco minutos, com PBS (pH 7,2; 0,01M). A membrana utilizada como controle negativo, recebeu P2 14% de gemas de galinhas do grupo controle. A membrana utilizada para teste recebeu P2 14% de gemas de galinhas do grupo imunizado, todos anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:100 em PBS-M 1% “*overnight*”, TA. A incubação

de anticorpos secundários bem como o processo de revelação e parada da reação foram efetuados conforme descrito no primeiro Dot-Blot.

4.9.4 Reconhecimento da proteína antigênica Nativa P21 por IgY contidos no soro de galinhas imunizadas

Foi realizado Dot-Blot para comprovação de que os anticorpos presentes no soro das aves imunizadas reconheceriam a proteína antigênica nativa P21 de *T. cruzi*. Foram utilizados dois cortes de membrana, em cada um deles depositados 5µL de P21 nativa de *T. cruzi*. Os cortes foram colocados em estufa a 37°C, para a completa secagem das amostras.

Os sítios remanescentes para ligação de proteínas foram bloqueados com leite desnatado a 5% em PBS (pH 7,2; 0,01M), por duas horas, TA. Em seguida as membranas foram submetidas a seis lavadas, por cinco minutos, com PBS (pH 7,2; 0,01M). A membrana utilizada como controle negativo, recebeu soro de galinhas do grupo controle. A membrana utilizada para teste recebeu pool de soro das três galinhas do grupo imunizado, na sexta semana após a primeira imunização, todos anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:100 em PBS-M 1% “*overnight*”, TA. A incubação de anticorpos secundários bem como o processo de revelação e parada da reação foram efetuados conforme descrito no primeiro *Dot-Blot*.

4.9.5 Imunofluorescência

Para detecção da forma nativa da proteína P21 de *T. cruzi* utilizou-se a técnica de imunofluorescência em cortes histológicos de tecido cardíaco de modelo experimental murino da infecção crônica por *T. cruzi*, segundo descrição de FERREIRA JUNIOR et al., (2012). Cortes histológicos de 3 µm de espessura de tecido cardíaco formolizado de camundongos BALB/C, cronicamente infectados, foram desparafinizados e hidratados. O resgate dos sítios antigênicos foi feito por meio de incubação em tampão Citrato (pH 6,0). Os sítios para ligações inespecíficas foram bloqueados por meio de incubação com BSA 2,5% por 60 minutos a 37°C. Os anticorpos IgY anti-P21r foram diluídos na proporção 1:50 com PBS-BSA-1% e incubados com os cortes histológicos em câmara úmida, “*overnight*” a 4°C. A detecção dos imunocomplexos foi realizada por incubação com IgG de coelho anti-IgY marcado com Isotiocinato de Fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich). O DNA nuclear das células presentes no

corte histológico (cardiomiócitos e *T. cruzi*) foi corado por meio de incubação com 4',6 – diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) diluído em PBS na proporção 1:500, em câmara úmida, por 1 hora e a 4°C, sob proteção de luz. O DAPI, quando excitado por uma fonte de luz ultravioleta, emite fluorescência visível de cor azul e o FITC emite fluorescência de cor verde. A leitura e a aquisição de imagens de contraste de fase e fluorescência foram realizadas em microscopia óptica de luz invertida (EVOS XL *Cell Imaging System*, THERMO FISHER) em aumento de 40x.

5 Análise Estatística

Este trabalho descreveu a produção e a caracterização de anticorpos IgY policlonais anti-P21 recombinante de *T. cruzi*. Não foram realizadas comparações entre grupos. Os resultados dos testes ELISA foram apresentados como a média aritmética da duplicata realizada para cada amostra. Quando necessária, foi empregada a estatística descritiva.

6 Resultados

6.1 Anticorpos IgY foram extraídos da gema dos ovos por meio de procedimentos de fácil execução.

Na execução da extração foram produzidas as seguintes frações: sobrenadante 1 (S1); precipitação 1 (P1); sobrenadante 2 (S2); precipitado 2 19% (P2 19%); e precipitado 2 14% (P2 14%) (Figura 9). P2 é a fração enriquecida em anticorpos IgY, a qual foi reconhecida como um *pellet* de cor branca obtido por meio de centrifugação após o *salting-out*. As frações ricas em lipídeos e proteínas remanescentes foram removidas em S1, P1 e S2.

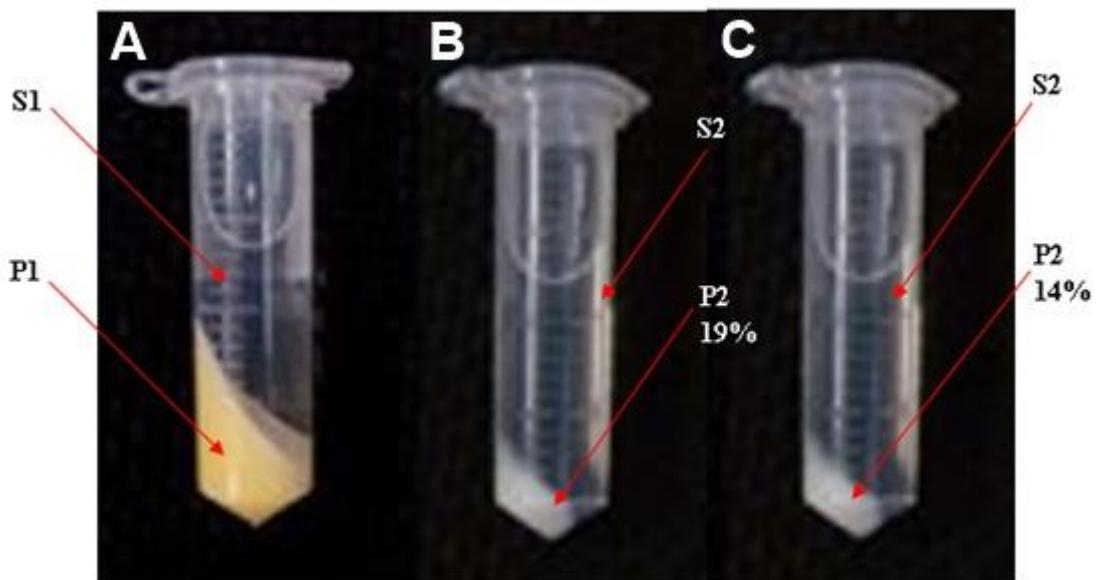


Figura 9: Extração de anticorpos IgY da gema de ovos: (A) água acidificada (pH 5,0-5,2); (B) *salting-out* com Na_2SO_4 19% e (C) *salting-out* com Na_2SO_4 14%. S1 – sobrenadante 1; P1 – precipitado 1; S2 – sobrenadante 2 e P2 – precipitado 2.

6.2 O tratamento da gema de ovos com água acidificada e Na_2SO_4 resulta em uma fração enriquecida (P2 14%) em proteínas com peso molecular aparente de 180 kDa

No SDS-PAGE 12%, a gema pura apresentou bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares, os quais variaram de 220 kDa a 10 kDa. As frações obtidas por meio do tratamento com água acidificada (S1 e P1) demonstraram uma distribuição das proteínas da gema pura. S1 (fração solúvel em água) apresentou bandas de proteínas com peso aparente de 180 kDa e outras

de menor peso molecular. P1 apresentou mais bandas proteicas de peso molecular aparente entre 100 kDa e 220 kDa.

Após o tratamento com Na_2SO_4 obtive-se as frações P2 19%, S2 e P2 14%. Verificou-se que nas frações P2 Na_2SO_4 19% e P2 Na_2SO_4 14% ocorreu um enriquecimento na banda proteica de peso molecular aparente de 180 kDa, como observado na Figura 10.

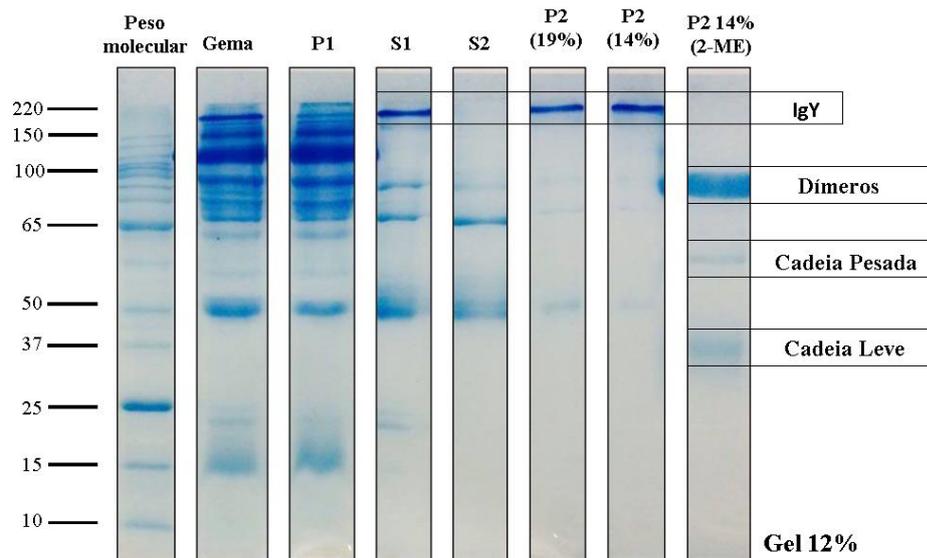


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% das frações obtidas durante extração de anticorpos IgY da gema do ovo. As bandas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue 250R. As linhas S1 e P1 são as frações obtidas após a precipitação com água acidificada (pH 5,0 a 5,2). As linhas S2, P2 19% e P2 14% correspondem às frações recuperadas do *salting-out* com Na_2SO_4 19% e 14%. A linha P2 14% (2-ME) é o resultado do tratamento da fração P2 14% com 2-mercaptoetanol.

6.3 Anticorpos IgY estão presentes na fração P2 14%

Após a revelação com DAB, verificou-se a deposição de um precipitado insolúvel e de cor marrom na área do P214%. Esse depósito não foi observado na reação controle, a qual utilizou gamaglobulina bovina testado contra o mesmo anticorpo secundário conforme observado na figura 11.

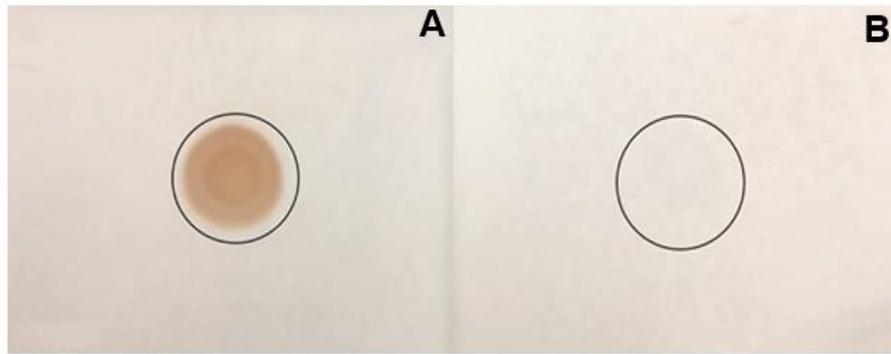


Figura 11: Reconhecimento de anticorpos IgY no P2 14% através do Dot Blot. A: O precipitado 2 de cor marrom delimitado pelo círculo, anticorpos IgY detectados pelo conjugado com peroxidase. **B:** Gamaglobulina bovina foi utilizada como controle negativo.

6.4 Após a imunização com P21r as galinhas transferiram, do sangue para a gema dos ovos, anticorpos IgY contra as formas recombinante e nativa da proteína P21.

Os anticorpos IgY presentes na gema purificada de galinhas imunizadas reconheceram a proteína P21 recombinante de *T. cruzi*. Os imunocomplexos formados foram detectados por meio de incubação com anticorpos IgG anti-IgY peroxidase e revelados com DAB como observado na figura 12.

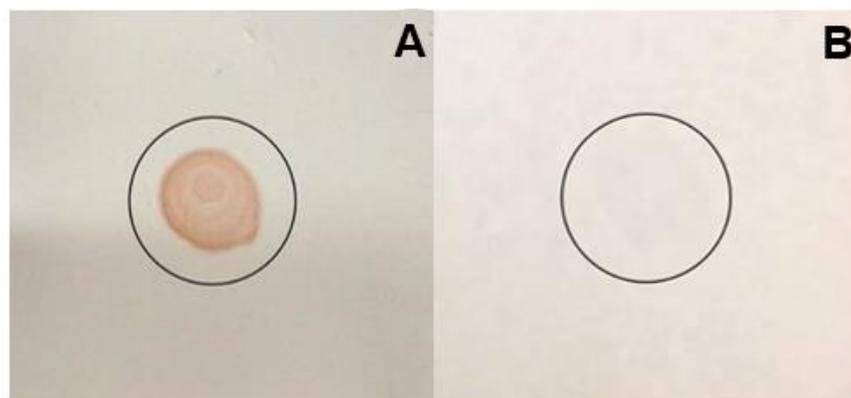


Figura 12: Reconhecimento da proteína antigênica recombinante P21 em ensaio de dot blot. A: Antígeno de P21r reconhecido por anticorpo primário IgY anti-P21r presentes em gemas purificadas de galinhas imunizadas em ensaio de dot blot. **B:** Controle negativo, o antígeno de P21r não é reconhecido pelo IgY de gemas purificadas do grupo controle.

Os anticorpos IgY presentes na gema purificada de galinhas imunizadas reconheceram a proteína P21 Nativa de *T. cruzi*. Os imunocomplexos formados foram detectados por meio de incubação com anticorpos IgG anti-IgY marcados com peroxidase e revelados com DAB como observado na figura 13.

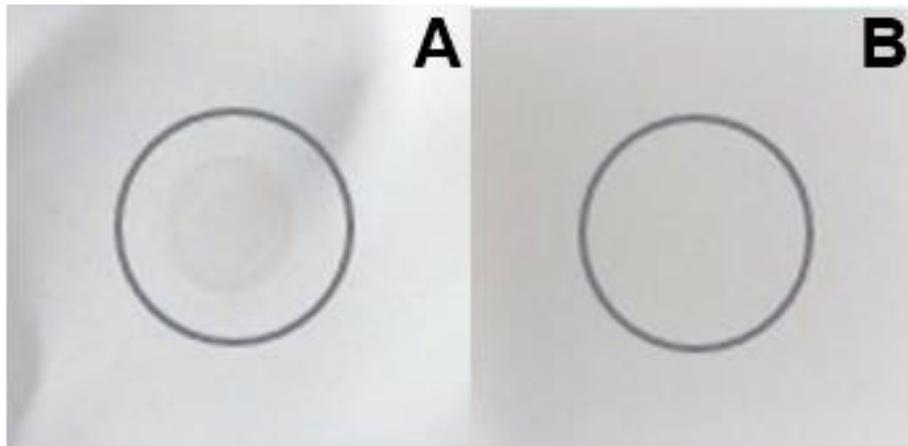


Figura 13: Reconhecimento da proteína antigênica Nativa P21 em ensaio de dot blot. A: Antígeno de P21 nativa reconhecido por anticorpo primário IgY anti-P21r de gema purificada em ensaio de dot blot. **B:** Controle negativo, o antígeno de P21 nativa não é reconhecido pelo IgY do soro de galinhas do grupo controle.

Os anticorpos IgY presentes no soro de galinhas imunizadas reconheceram a proteína P21 Nativa de *T. cruzi*. Os imunocomplexos formados foram detectados por meio de incubação com anticorpos IgG anti-IgY marcados com peroxidase e revelados com DAB (Figura 14 A).

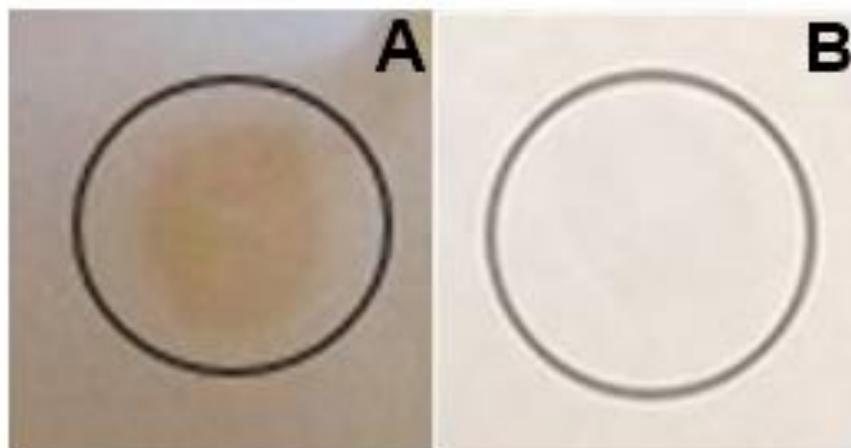


Figura 14: Reconhecimento da proteína antigênica Nativa P21 em ensaio de Dot blot. A: Antígeno de P21 nativa reconhecido por anticorpo primário anti-P21r de soro de galinha do

grupo imunizado em ensaio de dot blot. B: Controle negativo, o antígeno de P21 nativa não é reconhecido pelo IgY do soro de galinhas do grupo controle.

6.5 Altos níveis de anticorpos IgY anti-P21r foram detectados na gema do ovo seis semanas após a imunização primária

Utilizando o ensaio ELISA indireto, foram detectados anticorpos IgY anti-P21r nas amostras de P2 14%, durante o período de imunização das galinhas (Figura 15). Os valores de índice ELISA superiores a 1,0 foram considerados positivos, para a detecção dos anticorpos IgY anti-P21r. Amostras positivas para anticorpos IgY anti-P21r foram detectadas a partir da segunda semana pós-imunização (P.I.) primária. Os valores mais altos de índice ELISA foram detectados na sexta semana P.I.

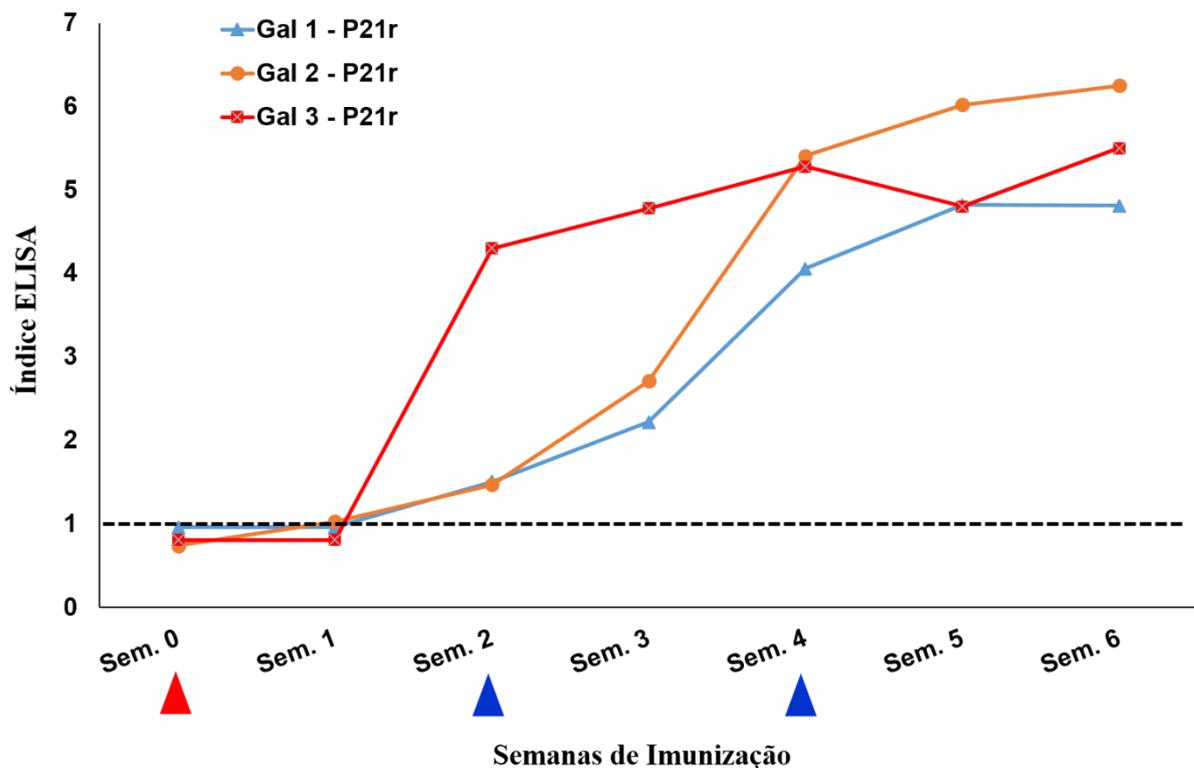


Figura 15: Cinética de produção de anticorpos IgY anti-P21r da primeira a sexta semana de imunização. O maior nível de detecção foi observado na sexta semana após a imunização primária. O valor de índice ELISA igual a 1,0 foi considerado o ponto de corte do teste (linha pontilhada). Seta vermelha representa a imunização primária com adjuvante completo de

Freund e as azuis correspondem às imunizações realizadas com adjuvante incompleto de Freund.

6.6 Anticorpos IgY anti-P21r, mantiveram reatividade contra P21r após tratamento com uréia 6M

A atividade residual dos anticorpos IgY anti-P21r, após tratamento dos imunocomplexos com ureia 6M, foi determinada por meio de ensaio ELISA indireto (Figura 16). Para uma amostra ser considerada positiva, ou seja, possuir reatividade contra o antígeno de P21r, precisa apresentar resultado superior a 1 em seu Índice Elisa (IE). O Índice Elisa é calculado a partir da média de três controles negativos, somando três desvios padrões. Quanto maior a força da interação P21r/IgY, menor a perda de reatividade do anticorpo pós-tratamento com ureia. Os *pools* de P2 14% testados conservaram reatividade residual (índice ELISA > 1,0).

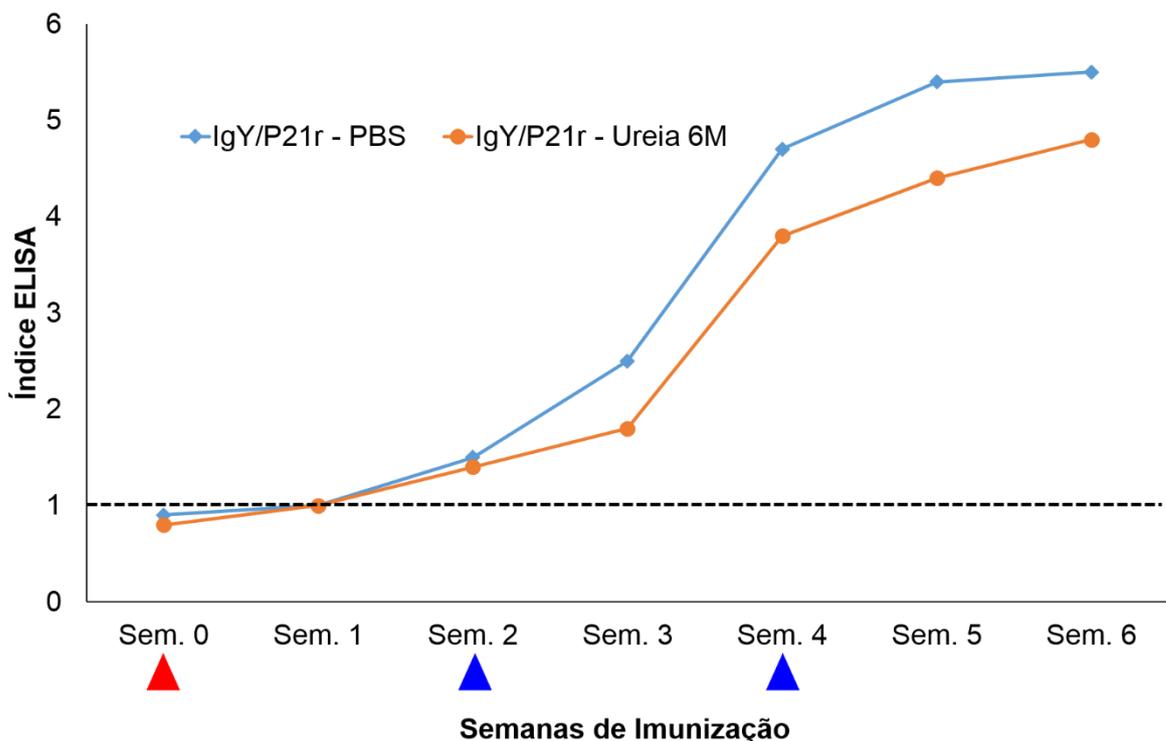


Figura 16: Reatividade residual de imunocomplexos em pools semanais do grupo imunizado tratados com ureia 6M. Os valores as amostras tratadas e não tratadas com ureia 6M, não tiveram diferenças significativas. Em nenhuma das semanas o IE atingiu valores menores que 1,0. A linha pontilhada marca o índice elisa superior a 1,0, resultado considerado

positivo. O triângulo vermelho sinaliza a imunização com adjuvante completo de Freund e os triângulos azuis imunizações com adjuvante incompleto de Freund.

A maturação e avidéz dos anticorpos IgY policlonais anti-P21r, foi definida por meio da avaliação da porcentagem da reatividade residual depois do tratamento dos imunocomplexos com ureia 6M. Foi feita a comparação dos valores obtidos com o tratamento de ureia 6M e dos anticorpos que não foram tratados com a Uréia 6M, o IE sofreu queda, mas em nenhum ponto se tornou negativo com valores $< 1,0$. Foi calculado o índice de avidéz (IA) e constatou-se que todas apresentaram valores superiores a 50% como expresso na figura 17. O índice de avidéz menor que 50% é considerado baixo, de 50% a 70% é considerado intermediário e acima de 70% é considerado alto.

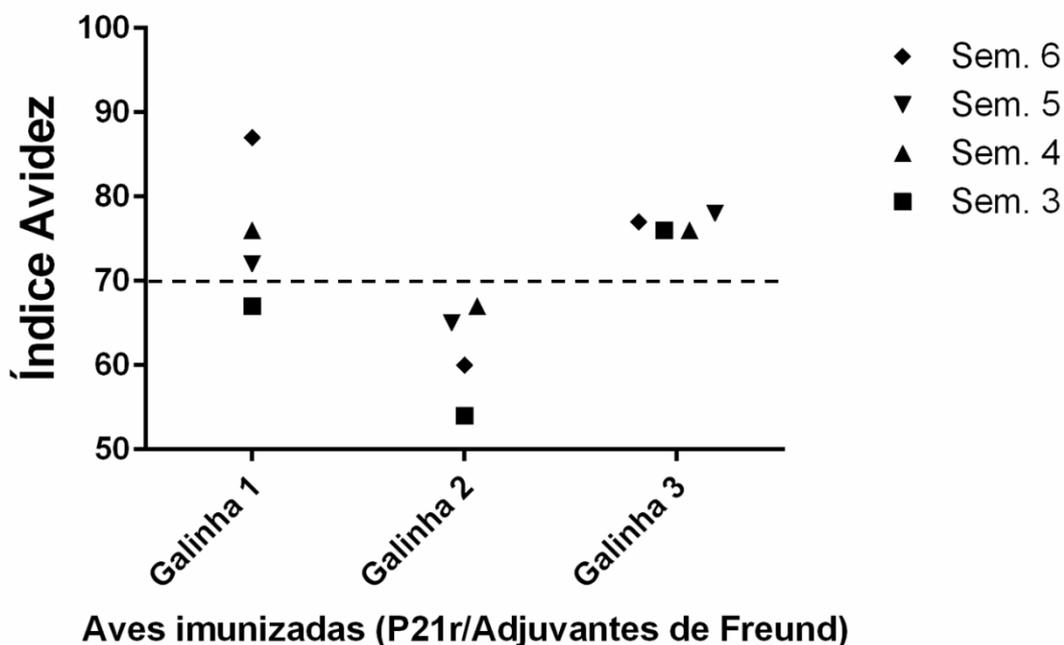


Figura 17: Índice de avidéz de anticorpos IgY anti-P21r em galinhas imunizadas com adjuvantes completo e incompleto de Freund. A maturação e avidéz dos anticorpos IgY policlonais anti-P21r, foi definida por meio da avaliação da porcentagem da reatividade residual depois do tratamento dos imunocomplexos com ureia 6M. Todas aves apresentaram valores superiores a 50%. Anticorpos localizados acima da linha tracejada que indica 70% são considerados de alta avidéz.

6.7 Anticorpos IgY anti-P21r sérico e das gemas de ovos alcançaram alta titulação

A titulação dos anticorpos IgY anti-P21r foi realizada por meio de teste ELISA indireto. Os anticorpos da sexta semana de imunização apresentaram maior densidade óptica na leitura da cinética de produção de anticorpos, por isso foi a semana escolhida para determinar a titulação dos anticorpos IgY anti-P21r. As microplacas de poliestireno sensibilizadas com 1mg/mL de antígenos de P21r, foram incubadas com o anticorpo diluídos, de maneira seriada na razão dois, a partir da proporção 1:100 até 1:25.600. Os anticorpos da gema alcançaram o título de 1:12.800 e os anticorpos séricos atingiram o título de 1:25.600 (Figura18).

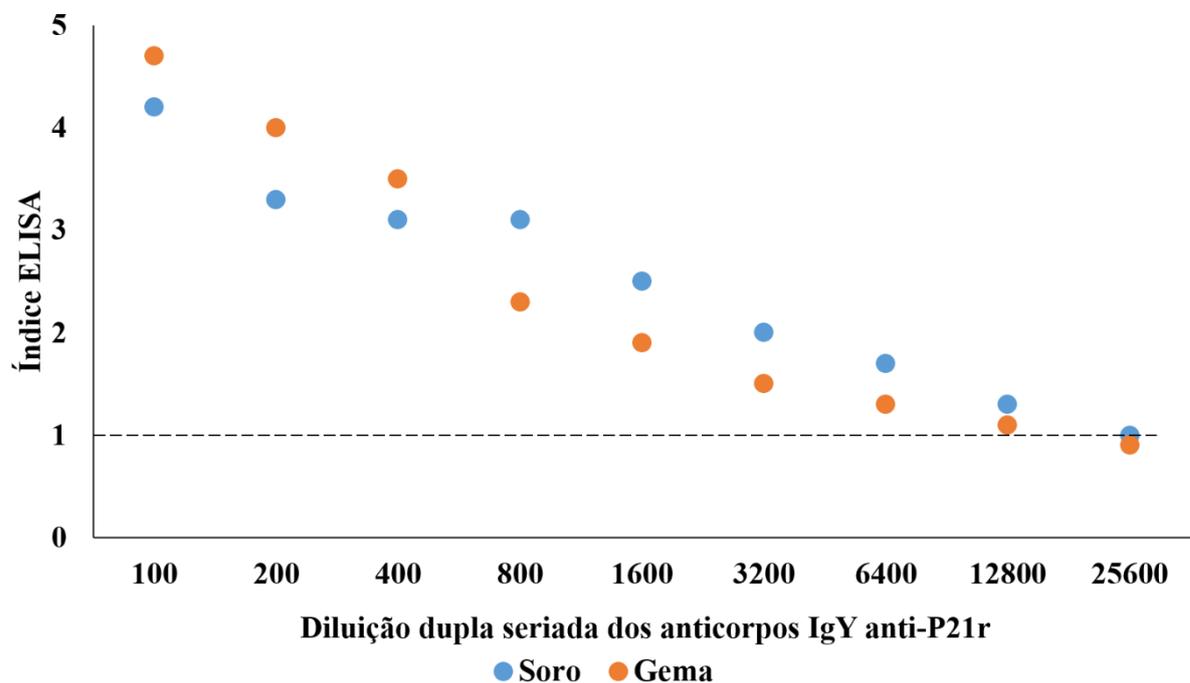


Figura 18: Titulação de anticorpos IgY anti-P21r de soro e gema de galinhas do grupo imunizado. Linha pontilhada: ponto de corte, IE = 1,0. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos e os valores de IE < 1,0 forma considerados negativos.

6.8 Anticorpos IgY anti-P21r sérico e das gemas de ovos alcançaram alta sensibilidade

Para o teste de sensibilidade o *pool* de anticorpos IgY anti-P21r da sexta semana após a primeira imunização foi testado. As microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com concentrações decrescentes (diluição decimal seriada) de P21r de *T. cruzi*, iniciando na concentração de 1µg/mL até 10⁻⁷µg/mL. Foi determinada a sensibilidade dos anticorpos anti-P21r contidos na gema e no soro das galinhas imunizadas. Os anticorpos IgY anti-P21r do soro das aves reconheceram a proteína recombinante até a concentração de 10⁻⁷ µg/mL. Os

anticorpos IgY anti-P21r extraídos da gema do ovo reconheceram até a concentração de $10^{-3} \mu\text{g/mL}$, resultado demonstrado pela figura 19.

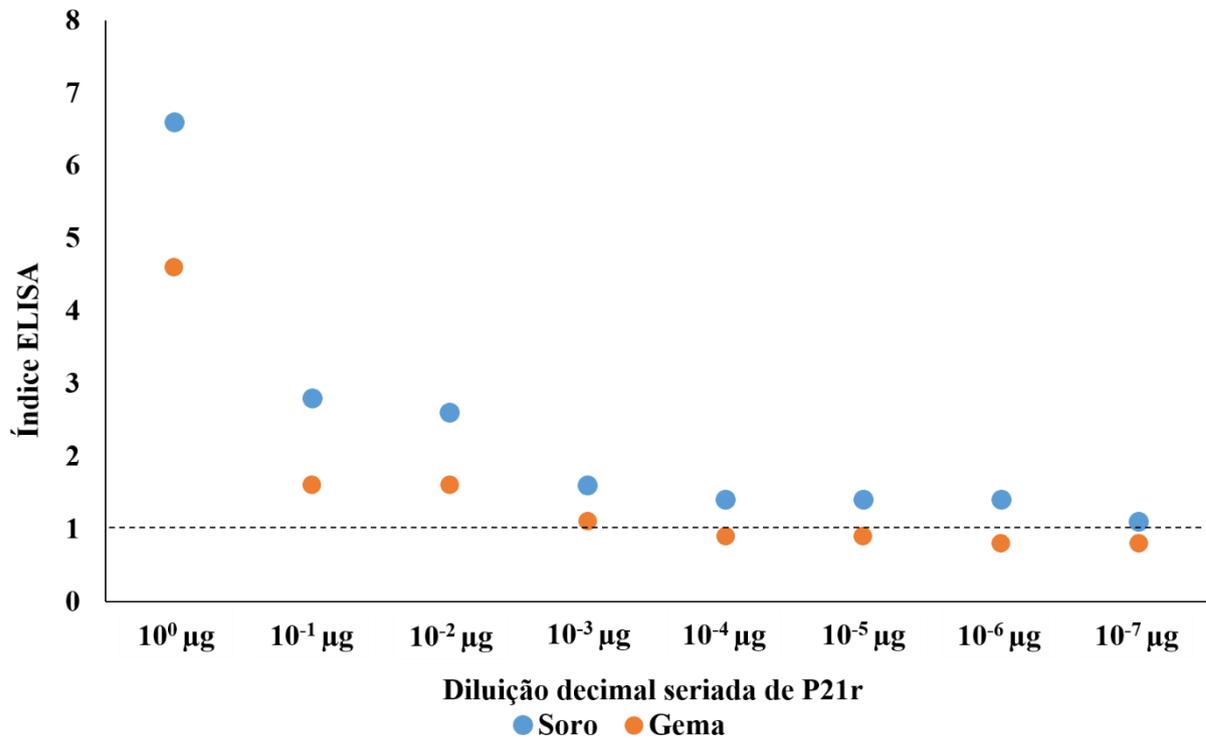


Figura 19: Sensibilidade dos anticorpos IgY anti-P21r contra a proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi*. Linha pontilhada: ponto de corte, IE = 1,0. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos e os valores de IE < 1,0 foram considerados negativos.

6.9 Anticorpos IgY anti-P21r reconheceram a forma nativa da P21 de *T. cruzi* em cortes histológicos de tecido cardíaco

Os cortes histológicos formolizados utilizados para imuno-histoquímica foram de tecido cardíaco de camundongos BALB/C infectados cronicamente com tripomastigotas metacíclicas de cepa Y de *T. cruzi*. Os anticorpos IgY anti-P21r, na diluição de 1:50 reconheceram a proteína P21 nativa presente nos ninhos de amastigotas do corte histológico. O resultado pode ser observado com aumento de 40X na marcação verde do FITC, marcando a proteína P21 e os núcleos das células foram corados com DAPI na cor azul (Figura 20), imagens produzidas por fluorescência.

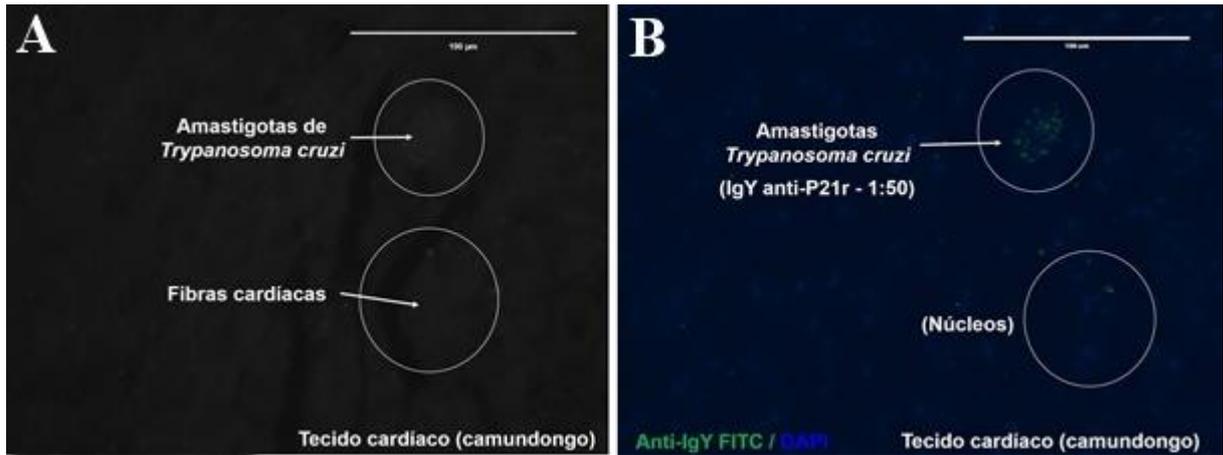


Figura 20: Imunofluorescência para detecção de P21 nativa de *T. cruzi* em tecidos formolizados utilizando anticorpos IgY policlonais anti-P21r. Fotomicrografia de tecido cardíaco murino experimentalmente infectado com *T. cruzi* A: Microscopia Óptica B: Sobreposição de imagens: contraste de fase e fluorescência.

7 Discussão

A produção de anticorpos IgY policlonais anti-P21r foi feita pela primeira vez no presente estudo, possibilitando alta produção de anticorpos anti-P21r com a redução de procedimentos dolorosos para os animais imunizados. Anticorpos IgY policlonais são produzidos especificamente contra vírus, bactérias, protozoários e proteínas recombinantes (SHIN et al., 2009; FERREIRA JUNIOR et al., 2012; JONSSON et al., 2015; NAFEA et al. 2015). A produção de anticorpos IgG monoclonais específicos para P21r já é realizada (SANTOS et al., 2014).

Neste estudo obtivemos imunização satisfatória usando o adjuvante de *Freund* sem que as inflamações causadas pelas inoculações afetassem o comportamento natural das aves. A produção de anticorpos IgY específicos contra proteínas recombinantes, expressas em *Escherichia coli*, é realizada usando adjuvantes de Freund (BORHANI et al., 2015). Em mamíferos a resposta inflamatória causada pelos adjuvantes de *Freund* gera inflamação severa, causando destruição de fibra muscular, porém as aves são mais resistentes a esse tipo de imunização (LEENAARS et al., 1999; HALDER et al., 2002). O adjuvante de Freund induz boa resposta humoral em galinhas imunizadas com antígenos de protozoários (FERREIRA JUNIOR et al., 2012).

Neste estudo o método de solubilização em água acidificada foi considerado simples e de fácil execução para a remoção dos lipídeos da gema do ovo, o qual preservou a reatividade e a avidéz dos anticorpos IgY anti-P21r. A extração de anticorpos IgY através da diluição da gema em água acidificada é um método utilizado internacionalmente (AKITA; NAKAI, 1993; KO, 2007). Um limitador para a extração de anticorpos IgY é a separação da fração solúvel em água dos lipídeos existentes na gema (STALBERG; LARSSON, 2001), porém a adição de água acidificada foi eficiente na remoção da fração lipídica das gemas utilizadas.

No presente estudo a utilização de sulfato de sódio produziu anticorpos com reatividade preservada e elevado grau de pureza, além disso, a não toxicidade do sal possibilita a utilização dos anticorpos purificados futuramente em ensaios *invitro* sem causar mortalidade celular. A extração de anticorpos IgY realizando *salting-out* é reconhecida e utilizada por ser considerado um método de baixo custo e fácil execução (SCHADE et al., 2005). Anticorpos extraídos por *salting out* com sulfato de amônio podem alcançar pureza mais elevada e maior volume de anticorpos se comparados ao método de cromatografia por *High performance liquid chromatography* (HPLC) (KO, AHN, 2007). O sulfato de amônio possui solubilidade superior a do sulfato de sódio por isso é mais utilizado, porém o sulfato de sódio possui característica de

preservar a estrutura da proteína durante a precipitação (HOWE, 1921), não encontramos dificuldade na solubilização do sulfato de sódio. Tobias et al. (2012) compararam *salting out* utilizando sulfato de sódio e sulfato de amônio na extração de IgY de gemas e não encontraram diferenças significativas entre as duas preparações.

FERREIRA JUNIOR et al., (2012) verificaram que as frações enriquecidas em anticorpos IgY, obtidas por precipitação com sulfato de sódio a 19% ou por cromatografia de exclusão de peso molecular, foram semelhantes no SDS-PAGE. Verificou-se que os anticorpos IgY anti-P21r, extraídos da gema por meio de água acidificada e precipitação com sulfato de sódio, foram recuperados livres da maioria dos componentes da gema, conforme demonstrado pelo SDS-PAGE com coloração por *Coomassie Blue* e, aparentemente, o *salting-out* com sulfato de sódio a 14% não produziu grande diferença em relação ao 19%.

No presente trabalho, as galinhas foram imunizadas com 100µg de P21r, por ser um alvo antigênico único apresentado ao sistema imunológico das aves. A quantidade de antígeno foi suficiente para produzir anticorpos de títulos aceitáveis sem haver necessidade de mais reforços, o uso de mais de dois reforços não recomendável devido ao desconforto excessivo causado as aves (HALDER et al., 2002). Desta maneira este experimento preservou o bem-estar animal das galinhas. A quantidade de proteína recombinante utilizada em cada imunização é variada entre os pesquisadores, existem relatos de imunizações contendo 6µg (OMIDIAN, 2014), 100µg (BARENCO et al., 2014), 200µg (XIN et al., 2014, LEE et al., 2015), 300µg de proteína recombinante. De acordo com SCHWARZKOPF et al. (2001), as galinhas podem ser imunizadas com proteínas recombinantes, utilizando como inóculo uma concentração proteica que pode variar de 1µg a 1mg.

A produção de anticorpos IgY específicos para proteínas recombinantes gerou altos níveis de anticorpos com elevada avidéz e em período curto após a primeira imunização (BARENCO et al., 2014, BORHANI, 2015). O pico de produção de anticorpos geralmente fica entre a sexta e a sétima semana após a primeira imunização (BARENCO et al., 2014). A quantidade de anticorpos IgY específicos estimada através de índice ELISA pode ser detectada a partir do 21º dia pós-imunização primária (FERREIRA JUNIOR et al., 2012). No presente estudo, anticorpos específicos foram observados na gema sete dias após a primeira imunização com a emulsão de P21r e adjuvante completo de Freund.

Nosso trabalho demonstrou a rapidez na soroconversão das aves, sete dias após a primeira imunização as galinhas já apresentaram reatividade. Em mamíferos, a maturação da avidéz de anticorpos é lentamente induzida, já nas aves ocorre com maior rapidez (CALANDER, 2002). Anticorpos policlonais específicos para *Toxoplasma gondii* foram

considerados de alta avidéz desde suas primeiras amostras reativas, 21 dias após a primeira imunização (FERREIRA JUNIOR et al., 2012). Anticorpos IgY policlonais produzidos especificamente para proteínas recombinantes das próprias imunoglobulinas, obtiveram altos níveis de especificidade e avidéz, reconhecendo a proteína nativa e sua forma recombinante (DINIZ, 2012).

O uso de anticorpos IgY associado ao ELISA permitiu a detecção de menos que 1 ng/ml do antígeno no soro de ratos. Ao compararem a sensibilidade do método, os autores concluíram que a IgY de galinhas além de ligar-se especificamente ao antígeno, foi mais sensível que a IgG de coelhos (WANG et al., 2012). Nesse estudo os anticorpos presentes no soro das galinhas imunizadas detectaram até 0,1ng/ml do antígeno em teste de sensibilidade em ensaio indireto de ELISA. Xu et al. (2012) comprovaram que o título de anticorpos IgY podem aumentar ligeiramente durante as primeiras semanas após a primeira imunização, atingindo o seu pico após a administração dos *boosters* de reforço durante a sétima até a nona semana atingindo título de 80.000.

Galinhas imunizadas contra ricina ou toxina nativa de *Clostridium botulinum* (PAULY, 2008), podem obter altos títulos de anticorpos após a quinta ou terceira imunização, o título é mensurado através de testes de ELISA convencionais, o maior título obtido, de 1: 100.000 e 1: 1.000.000, foi estável durante várias semanas seguintes. Obtido através de 11 imunizações de 10 a 20µg de toxina nativa de *Clostridium botulinum* imobilizada (PAULY, 2008). Estudos demonstram que anticorpos específicos para proteína recombinante do cápside exterior (σ C) de Reovírus Aviário purificados 14 semanas após a primeira imunização, produziram títulos de anticorpos no soro e gema de ovo de 1:302.000 e 1:355.000, respectivamente, determinados por método de Elisa indireto (JUNG et al.,2014). Aves imunizadas com extrato total de *Eimeria tenella* alcançaram seu maior título cinco dias após a sexta imunização que chegou a 1:13107,2 (XU et al., 2013). O título de anticorpos é variável, galinhas imunizadas com 200µg de proteína recombinante e adjuvante de Freund podem produzir títulos de 1:32 a 1:64 após a imunização final. (LEE et al., 2015). Enquanto galinhas imunizadas da mesma forma chegam ao pico de 1: 22.000 após a última imunização (XIN et al., 2014). No presente estudo, o título obtido foi considerado aceitável administrando a quantidade ideal de *boosters*. Segundo Schade et al. (2005), se a resposta de anticorpos é ainda insuficiente para fins laboratoriais após a administração de dois *boosters*, a experiência deve, em geral, ser encerrada.

O ensaio de Dot-Blot é utilizado em testes de reconhecimento de proteínas recombinantes de vírus, bactérias (*Borrelia burgdorferi*) e protozoários possuindo especificidade e sensibilidade superior a ensaios de *Western blotting* (FAWCETT, 1998; LI et al., 2014;

OMIDIAN et al., 2014; XIN, 2014). O ensaio de Dot-Blot é utilizado em testes de reconhecimento de proteínas nativas e recombinantes de protozoários (*Cryptosporidium parvum*) (OMIDIAN et al., 2014). O uso de Dot-Blot nesse estudo demonstrou o reconhecimento dos anticorpos IgY para proteína 21 de *T. cruzi* recombinante e nativa semelhante a JUNG et al., (2014), quando anticorpos IgY produzidos especificamente para protozoários foram capazes de reconhecer a forma nativa e recombinante dos antígenos. O DotBlot deste estudo demonstra que os anticorpos produzidos são de alta sensibilidade e que podem ser utilizados em testes para reconhecimento de formas evolutivas de *T. cruzi* pois reconhecem não só sua forma recombinante, mas a forma nativa produzida pelo parasita. O Dot-Blot realizado através da sensibilização com P21 Nativa obteve coloração mais fraca se comparada aos ensaios de P21r, deve ser levado em conta a origem da P21 nativa. O antígeno de P21 nativa foi obtido através de sobrenadante de cultura de tripomastigotas de *T. cruzi*, não passou por nenhum processo de purificação ou de concentração, a P21 nativa se encontrava em meio de muitos outros antígenos complexos e mesmo nessa condição o anticorpo anti-P21r foi capaz de reconhecê-lo.

Nesse estudo anticorpos IgY anti-P21r detectaram a forma nativa da proteína P21 em ninhos de amastigotas localizados no tecido cardíaco de camundongos infectados. Anticorpos IgY são utilizados técnicas de imuno-histoquímica para detecção de antígenos totais de vírus (BENTES et al., 2015) e de protozoários (FERREIRA JUNIOR et al. 2012), assim como de proteínas recombinantes de *Toxoplasma gondii* (BARENCO et al., 2014). Proteínas constitutivas de *T. cruzi* são detectadas por anticorpos de mamíferos em técnicas de imunofluorescência (BATISTA et al., 2015). Anticorpos monoclonais de camundongos reconhecem P21r de *T. cruzi* em ensaios de imunofluorescência, entretanto o uso de anticorpos IgY anti-P21r é inédito.

Os anticorpos foram produzidos de forma em que o bem-estar das aves foi preservado através da quantidade ideal de *boosters* administrados. A purificação foi simples e eficaz gerando anticorpos com reatividade, sensibilidade, titulação e avidéz preservadas. Os ensaios de Dot-Blot comprovaram a reatividade dos anticorpos também para a forma nativa de P21 de *T. cruzi*, resultado reforçado no teste de imunofluorescência, em que os anticorpos tiveram reatividade para ninhos de amastigotas em tecidos cardíacos de camundongo experimentalmente infectados.

8 Conclusões

Os anticorpos anti-P21r recombinante reconhecem a forma recombinante e nativa da P21 de *Trypanosoma cruzi*.

Anticorpos IgY anti-P21r recombinante podem ser purificados usando um método de fácil execução e elevado grau de pureza, a partir da água ácida e precipitação com sulfato de sódio.

Galinhas imunizadas com adjuvante de Freund produzem anticorpos específicos logo depois da primeira imunização e suas concentrações são crescentes no decorrer das administrações dos *boosters*.

Os anticorpos IgY anti-P21r recombinante reconhecem a forma recombinante e nativa da P21 de *Trypanosoma cruzi*.

Os anticorpos IgY anti-P21r possuem alto índice de sensibilidade, título e avidéz.

Os anticorpos IgY anti-P21r reconhecem a P21 nativa presente em cortes de coração de camundongos infectados cronicamente.

9 Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Celular and Molecular Immunology**. 6th Edition. Saunders Elsevier. Philadelphia, 96p, 2008.

AKITA, E.M. Chicken egg yolk immunoglobulin Y and fragments: purification, allergenicity and their neutralization of *Escherichia coli* heat labile toxin. 1992. 196f. Thesis (doctorate degree of Philosophy) – The University British Columbia, Columbia, 1992.

ALTER, G.; SEKALY, R. P. Beyond adjuvants: Antagonizing inflammation to enhance vaccine immunity. **Vaccine**, v. 33 Suppl 2, p. B55-9, Jun 8 2015.

ANIMAL WELFARE INSTITUTE, AWI Policy., SE, Washington, 2003.

BARENCO, P. V. et al. Toxoplasma gondii 70 kDa heat shock protein: systemic detection is associated with the death of the parasites by the immune response and its increased expression in the brain is associated with parasite replication. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96527, 2014.

BHATIA, V.; GARG, N. J. Previously unrecognized vaccine candidates control Trypanosoma cruzi infection and immunopathology in mice. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 8, p. 1158-64, Aug 2008.

BATISTA, C. M. et al. Trypanosoma cruzi Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reserosomes. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130165, 2015.

BENTES, G. A. et al. Using immunoglobulin Y as an alternative antibody for the detection of hepatitis A virus in frozen liver sections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 577-9, Jun 2015.

BERN, C. et al. Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 655-81, Oct 2011.

BEZERRA, C. M. et al. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of Trypanosoma cruzi in the Caatinga area colonised by Triatoma brasiliensis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 887-98, Nov 2014.

BORHANI, K. et al. Production of specific IgY *Helicobacter pylori* recombinant OipA protein and assessment of its inhibitory effects towards attachment of *H. pylori* to AGS cell line. **Clin Exp Vaccine Res**, v. 4, n. 2, p. 177-83, Jul 2015.

CANTEY, P. T. et al. The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. **Transfusion**, v. 52, n. 9, p. 1922-30, Sep 2012.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. **BioDrugs**, v. 16, n. 6, p. 433-7, 2002.

CALANDER, D. Avian IgY Antibody in vitro and in vivo. Acta universitatis upsaliensis uppsala, 2002. CARVALHO, A.C.C. **Cell therapy in Chagas Disease**. Interd. Perspc. Infect. Dis. 1-6. 2009.

CARVALHO, A.C.C. **Cell therapy in Chagas Disease**. Interd. Perspc. Infect. Dis. 1-6. 2009.

Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, n. 6, p. 33-43, Feb 6 2015.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. 2º ed. São Paulo. Editora Atheneu. 390. 2002.

CIPOLLA, A. et al. *Campylobacter fetus* diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. **ALTEX**, v. 18, n. 3, p. 165-70, 2001.

COURA, J. R.; VINAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856-62, Nov 2014.

DAVALOS-PANTOJA, L. et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 11, n. 6, p. 657-73, 2000.

DAVISON, F.; MAGOR, K.E.; KASPERS, B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A **Avian Immunology**, Elsevier, San Diego, USA, 481P. 2008.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002.

DINIZ, J. A. Produção e Caracterização de IgY contra rlipl32 de *Leptospira interrogans*. 2012. 67f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

DOMINGUES, C. S. et al. Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0122566, 2015.

DOS SANTOS, M. A. et al. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Sci Rep**, v. 4, p. 4259, 2014.

ERHARD, M. H. et al. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. **Poult Sci**, v. 79, n. 9, p. 1264-70, Sep 2000.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 1, p. 58-85, Jan 2013.

FAWCETT, P. T. et al. Comparison of immunodot and western blot assays for diagnosing Lyme borreliosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 5, n. 4, p. 503-6, Jul 1998.

FERREIRA JUNIOR, A. et al. Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40391, 2012.

FERREIRA JUNIOR, A. Anticorpos IgY policlonais: Ferramentas auxiliares para o estudo in vitro de *Toxoplasma gondii*. 2012. 114f. Dissertação (Doutorado em Imunologia e Parasitologia) – Universidade de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Impactos na Saúde e no Sistema Único de Saúde Decorrentes de Agravos Relacionados a um Saneamento Ambiental Inadequado. 2010.

GHARAIBEH, S.; MAHMOUD, K.; AL-NATOUR, M. Field evaluation of maternal antibody transfer to a group of pathogens in meat-type chickens. **Poult Sci**, v. 87, n. 8, p. 1550-5, Aug 2008.

HALDER, M. et al. ECVAM's activities on biologicals. **Altern Lab Anim**, v. 30 Suppl 2, p. 125-8, Dec 2002.

HATTA, H.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". **Agric Biol Chem**, v. 54, n. 10, p. 2531-5, Oct 1990.

HE, J. X. et al. Chronobiological studies of chicken IgY: monitoring of infradian, circadian and ultradian rhythms of IgY in blood and yolk of chickens. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 160, n. 3-4, p. 266-72, Aug 15 2014.

HORIE, K. et al. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 12, p. 4073-9, Dec 2004.

HOWE, P.E. The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. **J. Biol. Chem.** v. 47, p.93-107, 1921.

JONSSON, A. K. et al. A trial with IgY chicken antibodies to eradicate faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. **Infect Ecol Epidemiol**, v. 5, p. 28224, 2015.

JUNG, K. M. et al. Use of IgY antibody to recombinant avian reovirus sigmaC protein in the virus diagnostics. **Acta Virol**, v. 58, n. 2, p. 108-13, 2014.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L. et al. Cloning and expression of calglandulin, a new EF-hand protein from the venom glands of *Bothrops insularis* snake in *E. coli*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1648, n. 1-2, p. 90-8, May 30 2003.

KAUFMAN, J. et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. **Nature**, v. 401, n. 6756, p. 923-5, Oct 28 1999.

KLEMPERER, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie** v. 31, p. 356-382, 1893.

KO, K. Y.; AHN, D. U. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. **Poult Sci**, v. 86, n. 2, p. 400-7, Feb 2007.

KOBAYASHI, C. et al. Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in scid mice. **Vaccine**, v. 23, n. 2, p. 232-5, Nov 25 2004.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 3, p. 163-82, 2012.

KOWALCZYK, K.; DAISS, J.; HALPERN, J.; ROTH, T.F. Quantification of maternal- fetal IgG transport in the chicken. **Immunology**, v.54, n.4, p.755-762, 1985.

LARSSON, A.; et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **Journal of Immunological Methods**. v.156, n.1, p.79-83. 1992.

LEE DO, H. et al. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. **Arch Virol**, v. 160, n. 9, p. 2197-207, Sep 2015.

LEENAARS, P. P. et al. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 35. **Altern Lab Anim**, v. 27, n. 1, p. 79-102, Jan-Feb 1999.

LI, X. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. **J Anim Sci Biotechnol**, v. 6, n. 1, p. 40, 2015.

LI, Z. X. et al. Egg yolk IgY against RHDV capsid protein VP60 promotes rabbit defense against RHDV infection. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 157, n. 1-2, p. 97-104, Jan 15 2014.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Trop**, v. 130, p. 167-74, Feb 2014.

_____. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. **Bull World Health Organ**, v. 94, n. 2, p. 103-10, Feb 1 2016.

MIYAMOTO, C.A. Produção de proteínas recombinantes em Escherichia Coli. **Revista Conexão (AEMS)**. v. 8, p. 90-106. 2011.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. Editora Roca Ltda. São Paulo, 2011.

NAFEA, N. M. et al. Development of hen antihepatitis B antigen IgY-based conjugate for ELISA assay. **Adv Biomed Res**, v. 4, p. 100, 2015.

NEVES, D.P.; DE MELO A.L.; LINARDI P.M. **Parasitologia Humana**. 11 Ed. São Paulo, 2005.

NEVES, D.P.; et al. **Parasitologia Humana**. Atheneu. 11e. 85-108p. 2004.

ÓLAH, VELVERDE, L. Structure of the avian lymphoid system. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1 Edition. Elsevier, 481p., 2008.

OMIDIAN, Z. et al. Application of recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 for isolation and prevention. **Parasitol Res**, v. 113, n. 1, p. 229-37, Jan 2014.

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

PFREPPER, K. I. et al. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 8, p. 977-82, Aug 2005.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect**. n1; p. 92-100. 2001.

REY, L. **Parasitologia: Tripanossomiase por *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas): O parasito**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

RODRIGUES, A. A. et al. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51384, 2012.

SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Altern Lab Anim**, v. 33, n. 2, p. 129-54, Apr 2005.

SECO-HIDALGO, V.; DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Transcriptional and phenotypical heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* cell populations. **Open Biol**, v. 5, n. 12, p. 150190, Dec 2015.

SCHADE, R. et al. **Chicken egg yolk antibodies, production and application IgY-technology**. 1th Edition Aetex. p.13, 1996.

SHIH, Y. C.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. W. Some characteristics of protein precipitation by salts. **Biotechnol Bioeng**, v. 40, n. 10, p. 1155-64, Dec 5 1992.

SCHWARZKOPF, C.; STAAK, C.; BEHN, I.; ERHARD, M. Immunisation. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chickens egg yolk antibodies, production and applications – IgY-Technology**. Springer-Verlag, Berlin, 255p., 2001.

SHIMIZU, M. et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 56, n. 2, p. 270-4, Feb 1992.

SHIN, S. J. et al. Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. **J Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 600-9, Oct 2009.

SILVA C.V.; et al. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**.v.11, n.5, p. 563-70, Apr 2009.

SILVA, R.A.M.S.; et al. Hematology of natural bovine trypanosomiasis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology**. n.85, p.87-93. Aug 1999.

STALBERG, J.; LARSSON, A. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. **Ups J Med Sci**, v. 106, n. 2, p. 99-110, 2001.

TAN, S. H. et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **J Immunol Methods**, v. 380, n. 1-2, p. 73-6, Jun 29 2012.

TAYLOR, A. I. et al. Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure. **J Biol Chem**, v. 283, n. 24, p. 16384-90, Jun 13 2008.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. Roca. 6v, 497p. 2002.

TOBIAS, F. L. et al. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk. **Braz J Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 544-51, Apr 2012.

TOIVANEN, P. et al. Bursal and postbursal cells in chicken: age-dependence of germinal center formation in spleen. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 47, n. 5, p. 749-61, 1974.

TONG, C. et al. A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. **Poult Sci**, v. 94, n. 1, p. 104-10, Jan 2015.

TRESSLER, R. L.; ROTH, T. F. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. **J Biol Chem**, v. 262, n. 32, p. 15406-12, Nov 15 1987.

URQUHART, G.M.; et al. **Parasitologia veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam. 1996.

VASCONCELLOS, F. A. et al. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira* spp. in human blood serum. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 4, p. 259-64, Apr 2010.

WANG, Z. Q. et al. Detection of *Trichinella spiralis* circulating antigens in serum of experimentally infected mice by an IgY-mAb sandwich ELISA. **Foodborne Pathog Dis**, v. 9, n. 8, p. 727-33, Aug 2012.

WEN, J. J. et al. Serum proteomic signature of human chagasic patients for the identification of novel potential protein biomarkers of disease. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 435-52, Aug 2012.

WEST, AP.P Jr; HERR, A.B.; BJORKMAN, P.J. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. **Immunity**, v.20, n.5, p. 601-610,2004.

WOOLLEY, J. A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. **J Immunol Methods**, v. 178, n. 2, p. 253-65, Jan 27 1995.

WU, C. et al. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. **J Immunol Methods**, v. 277, n. 1-2, p. 157-69, Jun 1 2003.

XU, Y. et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnol Adv**, v. 29, n. 6, p. 860-8, Nov-Dec 2011.

10 ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Processo Nº: 003/2014

TÍTULO DO PROJETO		
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS IGY ANTI P21 RECOMBINANTE DE TRYPANOSOMA CRUZI		
PESQUISADOR RESPONSÁVEL		
Alvaro Ferreira Júnior		
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA		
Universidade de Uberaba		
1) DESCRIÇÃO SUCINTA DOS OBJETIVOS E RESUMO DO PROJETO		
1.1 OBJETIVOS:		
Produzir e purificar anticorpos policlonais IgY contra proteína recombinante (p21) de Trypanosoma cruzi		
Caracterizar a especificidade, a sensibilidade, a maturação e a cinética de produção dos anticorpos IgY específicos.		
Avaliar a reatividade dos anticorpos IgY anti p-21 contra alvos antigênicos de protozoários patogênicos de interesse em medicina humana e veterinária.		
1.2 HISTÓRICO		
Serão utilizadas 6 galinhas White de 25 semanas com 1,6Kg que serão imanizadas com 50 µg de p21 em 3 momentos (1 com adjuvante completo de Freund e mais dois intervalados em duas semanas com adjuvante incompleto de Freund). Amostras de sangue serão colhidas semanalmente até a 9 semana e os ovos diariamente.		
2) COMENTÁRIOS DO RELATOR		
2.1 GRAU DE INVASIVIDADE (GI) E PONTOS PERTINENTES		
Todos os questionamentos foram respondidos.		
3) CONCLUSÃO		
Aprovado (X)	Não aprovado ()	Pendente ()

Data: 24/02/2014



Prof. Dra. Joely F. Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA/UNIUBE