

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**IMUNOTERAPIA COM IGY AVIÁRIA EM RATOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR
*Trypanosoma evansi***

TESE DE DOUTORADO

Luzia Cristina Lencioni Sampaio

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**IMUNOTERAPIA COM IGY AVIÁRIA EM RATOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Trypanosoma
evansi***

Luzia Cristina Lencioni Sampaio

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sampaio, Luzia Cristina Lencioni
Imunoterapia com IgY aviária em ratos
experimentalmente infectados por Trypanosoma evansi /
Luzia Cristina Lencioni Sampaio.-2014.
113 p.; 30cm

Orientador: Silvia Gonzalez Monteiro
Coorientadores: Daniel Roulim Stainki, Sonia
Terezinha dos Anjos Lopes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2014

1. Trypanosoma evansi 2. imunoterapia 3.
Imunoglobulina aviária 4. IgY 5. cito-genotoxicidade IgY
I. Monteiro, Silvia Gonzalez II. Stainki, Daniel Roulim
III. Lopes, Sonia Terezinha dos Anjos IV. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**IMUNOTERAPIA COM IGY AVIÁRIA EM RATOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Trypanosoma evansi***

Elaborada por
Luzia Cristina Lencioni Sampaio

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Silvia Gonzalez Monteiro, Dr.^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Daniel Roulim Stainki, Dr. (UFSM)
(Coorientador)

Aleksandro Schafer da Silva, Dr. (UDESC)

Carmen Lucia Garcez Ribeiro, Dr.^a (UFPEl)

Luciana Maria Fontanari Krause, Dr.^a (UNIFRA)

Santa Maria, 17 de abril de 2014

Ao meu Pai... que sempre me apoiou, que sempre me incentivou e acreditou em mim... que nunca me abandonou ... e que continua me conduzindo em todos os momentos da minha vida, dedico ...

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida alguma esta é uma das páginas de grande importância neste trabalho. Uma página que não obedece normas e que jamais será resumida em parágrafo único e vinte linhas. Aqui tenho a oportunidade de apresentar sem objetivos previsíveis e sem nenhuma metodologia os resultados desta inesquecível experiência vivida durante minha passagem por esta Universidade: amizade e colegismo verdadeiro, sem os quais nada aqui descrito seria possível. Pessoas realmente importantes, as quais serei eternamente agradecida ...

Inicio agradecendo a minha colega e amiga Maria Elizabeth Berne, professora da UFPel, que não me permitiu desistir de realizar o doutorado, se dispôs a ser minha orientadora e me incentivou a ingressar como aluna especial do Programa de Pós Graduação daquela Universidade. Minha eterna admiração e reconhecimento. Com certeza, aqui está o primeiro passo para que tenha chegado até este momento.

Também não foi o acaso que trouxe para o nosso convívio na Universidade Federal de Pelotas o professor Daniel Roulim Stainki. Durante o curto período em que trabalhamos juntos não podia imaginar o grande amigo que havia conquistado. Admiro sua tranquilidade, disciplina, seriedade, honestidade e senso de justiça. Ao ser transferido para a Universidade Federal de Santa Maria nos deparamos com a alegria de vê-lo retornar para casa e a tristeza de perder o convívio com um colega especial. Não poderia sequer imaginar que seria justamente ele quem abriria as portas para a realização deste sonho. Com muito orgulho o tenho ainda como meu coorientador. Impossível mensurar meu agradecimento Daniel !

Ao ser selecionada no Programa de Pós graduação da Universidade Federal de Santa Maria, ninguém vibrou e torceu tanto por mim como a minha grande amiga, colega e Chefe do nosso Departamento: Carmen Lucia Garcez Ribeiro, nossa Kalu! Amiga de verdade, que durante todo este período esteve ao meu lado, me incentivando, orientando e não mediu esforços para agilizar toda a burocracia relacionada ao meu afastamento da UFPel dando o suporte necessário. Impossível não lembrar de pessoas especiais assim

Aqui chegando conheci minha orientadora, Professora Silvia Gonzalez Monteiro. Não existe palavras que expressem a magnitude da minha admiração,

reconhecimento, gratidão e carinho por alguém que me recebeu de braços abertos e que me permitiu a realização deste sonho. Ao término desta etapa, levo comigo a lembrança de uma orientadora incondicional, crítica, firme, que nos mostrou toda sua capacidade e qualidade de uma verdadeira educadora; mas sobretudo uma grande amiga e conselheira.

E como esquecer dos meus colegas Camila Belmonte, Luciana Dalla Rosa, Lucas Trevisan Gressler, Thirssa Helena Grando, Mariângela Facco de Sá, Dianni Menezes Capeleto, Matheus Dellaméa Baldissera? Espero um dia ter a oportunidade de retribuir todo o carinho, consideração e respeito com que fui tratada por vocês! Contem comigo sempre ... Também a todos os bolsistas e estagiários do LAPAVET meu eterno agradecimento. E aos colegas da UFPel, Fabio Leivas Leite, Everton Fagonde da Silva, Andreia Anciuti, Karina Colonetti, Amilton Seixas Neto, Alceu Gonçalves dos Santos e Tiago Heres ... todos vocês fazem parte desta história!

E como não falar nos filhos, em especial a minha filha Daniele, extremamente responsável e determinada, iniciando sua vida profissional também longe de casa, minha maior incentivadora. Obrigada minha filha pelos momentos em que você se comportou como minha mãe....

Não foi fácil viver longe de casa, longe da família, dos filhos e dos amigos ... mas alguém muito importante para mim, me segurou pela mão, me abraçou, me carregou para cá e para lá, enxugou minhas lágrimas e me convenceu que o tempo e a distância eram muito pequenos perto da grandeza desta conquista. Muito obrigado Getulio !!!!!!! só o amor de verdade sobrevive nas adversidades!

Do fundo do coração, agradeço a minha mãe: nunca esquecerei todo o incentivo, apoio e as palavras de carinho, desde o momento que decidi ir atrás deste sonho e durante estes dois anos longe da família. Obrigado por estar sempre ao meu lado durante toda esta etapa da minha vida

Finalmente, aquele que meu deu toda a força para chegar até aqui:

Muito Obrigada MEU DEUS!

“Que não falte bons sentimentos. Que nos falte egoísmo. Que nos sobre paciência. Que não nos falte esperança. Que cada caminho escolhido nos reserve boas surpresas. Que cada um de nós saiba ouvir cada conselho dado por uma pessoa mais velha. Que não nos falte vontade de sorrir. Que nenhum de nós se esqueça da força que possui. Que não nos falte fé e amor”.

(Caio Fernando Abreu)

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

IMUNOTERAPIA COM IGY AVIÁRIA EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Trypanosoma evansi*

AUTORA: LUZIA CRISTINA LENCIONI SAMPAIO

ORIENTADORA: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de abril de 2014

Trypanosoma evansi é um protozoário flagelado que acomete bovinos, ovinos, caprinos, asininos, felinos e suínos. A enfermidade tem especial importância em equinos, sendo conhecida como “mal das cadeiras”, devido aos déficits de locomoção característicos em animais infectados. A doença tem distribuição mundial, com vários relatos de infecções naturais em diversas regiões no Brasil. Várias drogas terapêuticas têm sido recomendadas para a profilaxia e controle do protozoário, porém ao longo dos anos estes medicamentos tem perdido a eficácia e o protozoário parece desenvolver resistência. A produção e uso de anticorpos aviários tem despertado grande interesse na comunidade científica devido à diversidade de aplicações diagnósticas e terapêuticas. Devido à distância filogenética, mecanismos de diversificação imune e capacidade de transferência das imunoglobulinas séricas para a gema do ovo, atualmente reconhece-se uma série de vantagens ao utilizar anticorpos aviários ao invés de anticorpos de mamíferos. Neste estudo foi produzido uma imunoglobulina específica contra o *T. evansi* a partir de imunização de galinhas usando um isolado do protozoário. Após a extração e purificação a partir da gema do ovo, foram avaliadas a citotoxicidade e genotoxicidade destes anticorpos em cultura de leucócitos humanos. A eficácia terapêutica foi testada em *Rattus norvegicus*. O ensaio também avaliou o uso do anticorpo aviário associado ao dipropionato de imidocarb e diacetato de diminazene. Os testes de toxicidade mostraram que a imunoglobulina não produz lesões celulares e genéticas. Testes *in vivo* mostraram aumento da longevidade e período pré-patente, principalmente em ratos tratados com a imunoglobulina aviária associada ao tratamento farmacológico. O protocolo de imunização e extração usados nesta pesquisa permitiu a obtenção de anticorpos específicos contra o protozoário e inócuo para o hospedeiro. Além disso, ao ser administrado com fins terapêuticos, reforça o sistema imunológico e prolonga a sobrevivência de pacientes infectados.

Palavras – chave: imunoglobulina aviária, IgY, tripanosomose

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Postgraduate Program in Veterinary Medicine

Universidade Federal de Santa Maria

IgY IMMUNOTHERAPY IN RATS EXPERIMENTALLY INFECTED

WITH *Trypanosoma evansi*

AUTHORESS: LUZIA CRISTINA LENCIONI SAMPAIO

ADVISOR: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO

Place and date: Santa Maria, April 17, 2014.

Trypanosoma evansi is a protozoan flagellate that affect cattle, sheep, goats, donkeys, cats and pigs. The disease is particularly important in horses, known as "*Mal das Cadeiras*", due to deficits characteristic of locomotion in animals infected. The disease has a worldwide distribution, with several reports of natural infections in different regions in Brazil. Several pharmaceutical drugs have been recommended for the prophylaxis and control of the parasite, but over the years, these drugs have lost their effectiveness and protozoan looks developing resistance. The production and use of avian antibodies has aroused great interest in the scientific community because of the diversity of diagnostic and therapeutic applications. Due to the phylogenetic distance, immune diversification mechanisms and transferability of serum immunoglobulin to the egg yolk, currently recognizes a number of advantages to using avian antibodies rather than antibodies of mammals. This study produced a specific immunoglobulin against *Trypanosoma evansi* from immunization of chickens using an isolate of the parasite. After extraction and purification from egg yolk, cytotoxicity and genotoxicity of these antibodies in cultures of human leukocytes were evaluated. The therapeutic efficacy was tested in *Rattus norvegicus*. The trial also assessed the use of avian antibody associated with imidocarb dipropionate and diacetate of diminazene. The toxicity tests showed that immunoglobulin does not produce gene and cell injury. *In vivo* tests showed increased in longevity and pre-patent period, mainly in rats treated with avian immunoglobulin associated with pharmacological treatment. The immunization and the extraction protocol used in this study allowed obtaining specific antibodies against protozoan and innocuous to the host. Moreover, when administered for therapeutic purposes, strengthens the immune system and prolongs the survival of infected patients.

Keywords: avian immunoglobulin, IgY, trypanosomosis.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Karyotypic changes (%) in mononuclear cells of human peripheral blood exposed to different concentrations of IgY.....	52
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ARTIGO 2

Tabela 1 - Pre-patent period, longevity and mortality of different treatments throughout the experimental period	88
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1- Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos experimentalmente infectados 18
- Figura 2- Sinais neurológicos encefálicos. Incoordenação motora, afastamento membros anteriores, cruzamento dos membros pélvicos, andar em círculos e déficits de propriocepção 22
- Figura 3- Estrutura das imunoglobulinas de mamífero (IgG) e de galinhas (IgY)..... 32

ARTIGO 1

- Figura 1 - IgY MTT after 72 hours of incubation 50
- Figura 2- Lymphocyte in metaphase by the karyotype technique, without chromosomal alteration 51
- Figura 3 - TBARS assay after 72 h of incubation. Results are expressed as nmol of MDA/10⁶ cells 53

ARTIGO 2

- Figura 1 - Total protein concentration obtained by photometry at 280 nm. Five doses of antigen were given at 14 day intervals with the production of total protein assessed for 70 days. The values were obtained using 1:50 dilution of samples purified by the PEG-6000 85
- Figura 2 - **(A)** Electrophoresis in polyacrylamide gel (10%) under reducing conditions, stained with Coomassie Blue R250 reagent (Bio-Rad) from samples of three immunized hens. **(B)** immunoblot showing the recognition of IgY after addition of secondary antibody conjugated with peroxidase. In the center, the scale of molecular weight expressed in kDa 85

Figura 3 -	Immunodiffusion in agarose gel. (A) Central wells filled with antigen; cavities 1, 3 and 5 with the negative control; wells 2, 4 and 6 filled with extracted samples (IgY). (B) Characterization of the antigen antibody reaction through the formation of precipitation lines	86
Figura 4 -	Kinetics of the immune response in hens immunized with <i>T. evansi</i> and detected by ELISA. The optical density values obtained were expressed at dilution of 1:100 of samples purified by PEG-6000, from the egg yolk of immunized hens	86
Figura 5 -	Avidity index (AI) of IgY antibodies produced during immunization of the hens with <i>T. evansi</i> antigens. AI<40% were considerate of low avidity; AI between 41 and 70% represented a medium avidity; and AI> 70% was considered as high avidity	87
Figura 6 -	Kinetics of specific IgY production of anti- <i>T. evansi</i> detected by the Coomassie Blue method. The values were obtained by photometry at 595 nm	87

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Artigo intitulado “In vitro cytotoxicity and genotoxicity of chicken egg yolk antibodies (IgY) against <i>Trypanosoma evansi</i> in human lymphocytes” publicado na revista International Journal of Pharmacy and Pharmaceuthical Sciences em abril de 2014	108
Anexo 2 -	Comprovante de submissão do artigo intitulado “Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating <i>Trypanosoma evansi</i> infection” enviado para Revista Veterinary Parasitology	112
Anexo 3 -	Parecer Comitê Ética da Universidade Federal de Santa Maria ...	113

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Trypanosoma evansi	17
2.1.1 Transmissão e ciclo biológico	18
2.1.2 Distribuição da doença	20
2.1.3 Patogenia e Sinais Clínicos	21
2.1.4 Diagnóstico	23
2.1.5 Tratamento	25
2.2 Imunoglobulina Y	29
2.2.1 Características estruturais, imunológicas e bioquímicas	30
2.2.2 Transferência passiva de imunidade em galinhas	32
2.2.3 Composição da gema do ovo	33
2.2.4 Vantagens do uso de anticorpos aviários	34
2.2.5 Importância da tecnologia IgY	35
2.2.6 Produção e purificação de IgY	40
3 ARTIGOS	42
3.1 Artigo 1 – In vitro cytotoxicity and genotoxicity of chicken egg yolk antibodies (IgY) against <i>Trypanosoma evansi</i> in human lymphocytes ...	43
Resumo	44
Introdução	45
Material e Métodos	47
Resultados e Discussão	49
Conclusão	53
Referências	54
3.2 Artigo 2 – Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating <i>Trypanosoma evansi</i> infection	59
Resumo	61
Introdução	62
Material e Métodos	63
Resultados	69
Discussão	72
Conclusão	75
Referências	76
4 DISCUSSÃO	89
5 CONCLUSÃO	93
6 REFERÊNCIAS	94
7 ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

A “Tecnologia IgY” baseia-se na imunização de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e extração de anticorpos IgY-específicos a partir da gema do ovo. O procedimento é aceito internacionalmente como método alternativo a favor do bem estar animal por se tratar de procedimento não invasivo. Inúmeras vantagens são enumeradas na literatura em relação a produção e utilização de anticorpos aviários em detrimento aos anticorpos de mamíferos. Nas últimas décadas, a busca por novos métodos diagnósticos e recursos terapêuticos nas pesquisas biomédicas aumentou consideravelmente os estudos nesta área. Pesquisas envolvendo métodos de imunização, extração, purificação, caracterização e aplicabilidade contra as mais diversas enfermidades tem sido alvo de pesquisas.

Trypanosoma evansi (*T. evansi*) é um protozoário emergente, que infecta a maioria das espécies domésticas, algumas espécies silvestres e o homem. A enfermidade produzida por este parasito adquire grande importância na espécie equina, causando sintomatologia grave e levando os animais a óbito. No Brasil, várias regiões já registraram casos de tripanossomose equina nos últimos anos. A situação é preocupante, uma vez que a enfermidade causa sérios prejuízos econômicos, principalmente quando afeta animais de alto valor zootécnico. A queda da produtividade e óbito são consequências da forma aguda da doença. No entanto, a manifestação crônica adquire maior importância, pois além da queda de *performance* ou produtividade do animal, a condição de portador da enfermidade e recidivas do quadro clínico são situações agravantes. Embora existam vários protocolos quimioterápicos relatados na literatura, tanto para profilaxia como para o tratamento da enfermidade diagnosticada, constata-se que até o presente momento ainda não se conseguiu um tratamento realmente eficaz para o controle desse protozoário.

Nesse contexto, nossos estudos tiveram como objetivos a produção e caracterização de anticorpos IgY anti- *T.evansi* a partir de inoculações periódicas com formas tripomastigotas do parasito em galinhas poedeiras, avaliação *in vitro* da cito e genotoxicidade e avaliação *in vivo* da eficácia profilática e terapêutica dos anticorpos produzidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma evansi*

Trypanosoma evansi (*T. evansi*) é o agente etiológico da enfermidade conhecida como Mal das Cadeiras, Tripanossomose equina, Surra, Murina, Derrengadeira, Peste Boba, ou Quebra-bunda, que acomete equinos de todas as raças e tem distribuição mundial. Na África é denominada Abori, Salaf, Debad, Tahaga e Diufar (DARLING, 1910; HOARE, 1972; LEVINE, 1973). Bovinos, ovinos, caprinos, asininos, felinos e suínos também são hospedeiros susceptíveis. Caninos, capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), quatis (*Nasua nasua*) e morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) são reservatórios e ocasionalmente podem manifestar sintomatologia clínica; sendo que os morcegos ainda são vetores da doença (NUNES, 1993; SILVA et al., 2002). Em equinos, camelos e caninos a doença é frequentemente fatal. Em 2005, foi relatado o primeiro caso de infecção humana em um fazendeiro na Índia (JOSHI et al., 2005).

A classificação taxonômica inclui este parasito ao Filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Cinetoplastida, família Trypanosomatidae. Foi descrito pela primeira vez em 1880 por Griffith Evans, um médico veterinário do exército do Reino Unido, ao examinar ao microscópio lâminas com sangue de equinos e camelos na região de Punjab (Índia). Após identificar a presença do protozoário nestes animais, Evans inoculou o sangue de animais doentes em animais sadios e após seis dias observou os protozoários no sangue dos equinos inoculados (HOARE, 1972; FALLIS, 1986). A primeira observação da doença no Brasil ocorreu entre os anos de 1827 e 1830 na Ilha de Marajó, atingindo equinos da região. A partir deste local a enfermidade disseminou-se pelo restante do País e América do Sul, atingindo a Guiana, Bolívia, Venezuela e Colômbia (HOARE, 1972).

Este protozoário possui um corpo alongado (Figura 1), com comprimento variando entre 14-33 µm e largura entre 1,5-2,2 µm, extremidades afiladas, um flagelo terminal, um núcleo central e uma membrana ondulante que permeia toda a extensão do parasito (BRUN et al., 1998; SILVA et al., 2002).



Figura 1 - Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos experimentalmente infectados, observados sob microscopia óptica, sob imersão (1.000 x). (Fonte: arquivo pessoal).

O cinetoplasto pode ou não estar presente, dependendo da origem da cepa. Cepas sul-americanas são preferencialmente acinetoplásticas. Análises de cepas brasileiras de *T. evansi* em cavalos e cães (AQUINO et al., 1999; NUNES; 1993), quatis, capivaras, ratos silvestres, cães e equinos (MASIGA & GIBSON, 1990; VENTURA et al., 2002), resultaram ser desprovidas de cinetoplasto. As cepas que os possuem apresentam-no incompleto, sem os maxicírculos (BORST et al., 1987).

2.1.1 Transmissão e Ciclo Biológico

A transmissão das tripanossomíases ocorre através da inoculação dos parasitos pela saliva dos vetores (seção Salivaria), ou pela contaminação da mucosa ou da pele lesionada por tripanosomas presentes no material fecal do vetor (seção Stercoraria) (CONNOR e VAN DEN BOSSCHE, 2004). *T. evansi* pertence à secção

Salivaria, sendo a transmissão essencialmente mecânica. As formas tripomastigotas são transferidas diretamente de um hospedeiro para outro através de insetos hematófagos (moscas das famílias Tabanidae e Muscidae) ou artificialmente por agulhas contaminadas com sangue infectado (SILVA et al., 2002).

Na América do Sul, *T. evansi* pode também ser transmitido por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), onde os parasitos podem se multiplicar e sobreviver por longos períodos. Nestes vetores, o parasito não desenvolve nenhuma fase do ciclo (SILVA et al., 2002). Dessa maneira, morcegos hematófagos atuam tanto como vetores como reservatórios (HOARE, 1972). DUNN (1932), JOHNSON (1936) e OLIVEIRA (1943) relataram a transmissão de *T. evansi* utilizando este vetor no Panamá e no Brasil, além de registrarem que *T. evansi* e morcegos hematófagos tem a mesma distribuição geográfica.

Pesquisas realizadas no Laboratório de Imunomodulação do Departamento de Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz demonstraram que as sanguessugas são capazes de transmitir o *T. evansi*. Os parasitos foram encontrados dispersos em todo o corpo das sanguessugas: aparelho bucal, estômago, intestino e glândulas. No intestino eles formam grumos arredondados, o que os pesquisadores supõem ser um mecanismo de defesa. Nas glândulas, os tripanosomas foram encontrados no interior de células epiteliais. O estudo sugere que a transmissão ocorra através da ingestão do parasito. Capivaras são mamíferos semi-aquáticos que se alimentam de algas e do capim à margem dos rios. É possível que engulam sanguessugas junto com esses vegetais, o que também pode acontecer com os cavalos. O estudo conclui que a abundância destes vetores associada à presença de animais selvagens ou domésticos, que servem como reservatório do parasito, como capivaras, quatis e cães, seja responsável pela alta prevalência da doença na região do Pantanal no Brasil (CARREIRA, 2005).

Carnívoros, principalmente caninos, são naturalmente infectados pelo protozoário, mas podem se infectar ainda através da ingestão de carne de animais recentemente mortos com a doença ou carcaça de animais infectados (RAMIREZ et al., 1979; BARRIGA, 1997; HERRERA et al., 2004). A transmissão via oral foi comprovada experimentalmente em camundongos e caninos (RAINA et al., 1985; BAZZOLI et al., 2002), sendo importante fonte de contaminação em cães, quatis e capivaras após brigas entre animais infectados e não infectados.

A transmissão venérea ainda não foi constatada, porém já foi detectada a presença do protozoário na mucosa vaginal de coelhas experimentalmente infectadas (UCHE & JONES, 1992). Há relatos de casos de infecção natural via transplacentária em ruminantes (OGWU & NURU, 1981; MURALEEDHARAN & SRINIVAS, 1985). Esta via também foi comprovada em camundongos experimentalmente infectados (SARMAH, 1998).

Tripanosomas são parasitos digenéticos, ou seja, o ciclo biológico envolve apenas dois hospedeiros: um animal vertebrado que é o hospedeiro final, e diversos invertebrados hematófagos representando os hospedeiros intermediários ou vetores. Alguns autores usam o termo “inoculadores mecânicos” em vez de “vetores” para se referir à transmissão mecânica de tripanosomas.

No caso do *T. evansi* a transmissão é mecânica e as formas sanguíneas dos tripanosomas são transferidas diretamente de um mamífero para outro por insetos hematófagos ou artificialmente por agulhas contaminadas com sangue infectado. Não ocorre desenvolvimento do *T. evansi* no inseto. Quando transmitido por tabanídeo a transmissão é facilitada, pois a picada é dolorosa e leva o hospedeiro a se coçar. A habilidade para transmitir os tripanosomas mecanicamente é de curta duração (geralmente mensuradas em minutos), dependendo do tempo de sobrevivência dos parasitos no aparelho bucal do inseto (BRUN et al., 1998; SILVA et al., 2002).

2.1.2 Distribuição da doença

A doença tem distribuição cosmopolita, atingindo principalmente regiões tropicais e subtropicais, com relatos na África do Norte, América Central, América do Sul, China, Filipinas, Índia, Indonésia, Malásia, Oriente Médio e Rússia (HORNIBY, 1953; BAJYANA SONGA et al., 1987; LUCKINS, 1988; MONZÓN & COLMAN, 1988; BAZOLLI et al., 2002).

Acredita-se que o *T. evansi* tenha origem no continente africano e foi introduzido nas Américas através dos primeiros colonizadores europeus. Os primeiros casos de tripanossomíase equina na América do Sul surgiram no final no século XIX, após a importação de cavalos da Espanha (HOARE, 1972; SANTOS et al., 1992).

Nestes continentes o *T. evansi* é responsável por infecções agudas em várias espécies animais, desde o sul da Argentina até o norte do Panamá (WELLS, 1984).

Surtos ou casos isolados de tripanossomíases têm sido relatados em diversas regiões brasileiras (FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 1995; HERRERA et al., 2005). Já foram descritos casos de infecção natural em animais domésticos e silvestres no Rio Grande do Sul (COLPO et al., 2005; CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007; ZANETTE et al.; 2008), Mato Grosso do Sul (MOREIRA & MACHADO, 1985; BRANDÃO et al., 2002), Santa Catarina (DA SILVA et al., 2007), Paraná (KUBIAK & MOLFI, 1954), Minas Gerais (NUNES et al., 2011) e no Pantanal, onde a doença é endêmica, com recorrentes casos (SILVA et al., 2002).

2.1.3 Patogenia e Sinais Clínicos

Os principais fatores que influem na patogenicidade dos Tripanosomas referem-se ao tipo de cepa, espécie animal susceptível, fatores concomitantes à infecção (estado nutricional, estado imunológico, estresse, outras doenças) e epizootiologia (HOARE, 1972). Os tripanosomas patogênicos de importância pecuária estão localizados na seção salivária e incluem o *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma evansi*. (SILVA et al.; 2002).

Em seguida à infecção inicia-se a multiplicação do protozoário no local da picada e a sua migração para a corrente sanguínea e sistema linfático. A reprodução do *T. evansi* ocorre por fissão binária, sendo que esta divisão se processa em uma sequência definitiva envolvendo sucessivamente o corpo basal, flagelo, cinetoplasto e núcleo, culminando na clivagem do citoplasma (SILVA et al., 2002). O processo ocorre no sangue do hospedeiro (BRUN et al., 1998), sendo que a medida que aumenta a parasitemia a resposta inflamatória é ativada e surgem picos de febre. A infecção tende a cronicização, com períodos aparasitêmicos e afebris. Estes protozoários possuem em sua superfície glicoproteínas com alta capacidade mutante, capazes de driblar o sistema de defesa do hospedeiro (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004; PAYS et al., 2004).

A doença pode se manifestar de forma aguda ou crônica. Infecções agudas podem causar a morte rápida em equinos e cães não tratados. Os sintomas incluem

emagrecimento, palidez de mucosas, febre intermitente, tosse, edema nas partes baixas do corpo, aumento dos linfonodos superficiais, fraqueza muscular, atrofia da musculatura dos membros pélvicos, incoordenação motora, paresia de trem posterior, dificuldade para levantar, hiperexcitabilidade, andar em círculo, déficit proprioceptivo (Figura 2), cegueira e quedas constantes (LEVINE, 1973; AQUINO et al.; 1999; HERRERA et al.; 2005; RODRIGUES et al., 2009). As infecções crônicas podem durar anos (BRUN et al., 1998) e nesta fase ocorre o agravamento dos sinais clínicos e caquexia (BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005).



Figura 2 - Sinais neurológicos encefálicos. Incoordenação motora, afastamento membros anteriores, cruzamento dos membros pélvicos, andar em círculos e déficits de propriocepção (Rodrigues et al., 2009).

Os sinais neurológicos têm sido descritos na fase terminal da doença, principalmente em equinos e bovinos (TUNTASUVAN et al., 1997; RODRIGUES et al., 2009; DA SILVA et al., 2007). Sintomas reprodutivos tais como aborto, infertilidade, esterilidade, atrofia ou degeneração de testículos, epidídimo e túbulos seminíferos,

assim como alterações na concentração, morfologia e volume espermático foram relatados por Sekoni et al (2004), Bezerra et al.(2006); Batista et al. (2007, 2008).

A infecção por *T. evansi* em bovinos cursa com anorexia, emagrecimento, apatia, hipertermia (41°C), mucosas pálidas ou ictéricas e hemorragias cutâneas após a morte (DA SILVA et al., 2007). A análise hematológica de animais infectados com *T. evansi* mostra acentuada anemia, caracterizada por decréscimo no hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem total de eritrócitos (SILVA et al.; 2002). Em caninos foi demonstrada a anemia microcítica e hipocrômica e em equinos a anemia microcítica e normocrômica. Em ambas as espécies foram observadas anormalidades eritrocitárias tais como: microesferócitos, acantócitos, dacriócitos, micrócitos, vacuolização eritrocitária, policromasia, poiquilocitose. A eritrofagocitose e a adesão do tripanosoma ao eritrócito também são achados descritos nestas espécies (ANOSA & KANEKO, 1983; CONRADO et al. 2005).

Logo após a infecção ocorre uma anemia hemolítica devido ao processo de eritrofagocitose. Uma segunda fase anêmica ocorre em torno de 4 a 6 semanas após. Jain (1993) e Connor & Van Den Bossche (2004) referem-se a liberação de hemolisinas e enzimas pelos tripanosomas capazes de induzir lesões na membrana e aumentar a fragilidade destas, como principal mecanismo de origem da anemia. Além disto, a adesão do complexo antígeno-anticorpo e componentes do sistema complemento aos eritrócitos também contribui para anemia, pois promove a eritrofagocitose. Atualmente sugere-se que a anemia também seja consequente ao estresse oxidativo. Desta forma, o aumento de radicais livres de oxigênio promove a peroxidação lipídica e consequente dano a membrana eritrocitária (WOLKMER et al., 2009).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da infecção por *T. evansi* é obtido através do somatório dos dados epidemiológicos, sinais clínicos e exames laboratoriais. Os sintomas da doença não são patognomônicos e apresentam-se comuns a várias outras enfermidades. Portanto, a análise laboratorial é imprescindível no estabelecimento do diagnóstico (SILVA et al., 2002). Os métodos diagnósticos mais frequentemente

usados são os esfregaços corados pelo *Giemsa* (GSS), método de concentração de Strout (SCM), método do microhematócrito (HCT), método "Buffy Coat" (BCM) e inoculação em camundongos (MONZÓN, 1993).

Nas infecções agudas é possível a visualização do *T. evansi* através de esfregaços sanguíneos. Em bovinos a amostra pode ser coletada a partir de aspiração do linfonodo pré-escapular. A técnica baseia-se em colocar uma gota do sangue numa lâmina a uma distância de aproximadamente 2-3 cm de uma das extremidades, empurrando a gota com outra lâmina num ângulo de 45° até o lado oposto. São recomendáveis esfregaços de camada fina, pois facilitam a leitura ao apresentarem as células mais dispersas. O material é analisado entre lâmina e lamínula, após fixação em álcool metílico e corado com *Giemsa*. A leitura é realizada sob microscopia ótica

As técnicas do microhematócrito e Buffy Coat (WOO, 1970) são indicadas quando a parasitemia é baixa e é necessário o uso de técnicas de concentração. Após preencher aproximadamente 2/3 do volume do tubo capilar com o sangue a ser testado, este deve ser selado com chama ou com plastilina em uma das extremidades e centrifugado para realização da leitura. Os protozoários podem ser observados na junção entre a camada de células brancas e o plasma. Para o Buffy Coat monta-se uma lâmina, quebrando o tubo capilar na parte onde se divide a parte líquida com a parte celular, colocando assim uma ou duas gotas deste material numa lâmina para confecção do esfregaço.

A inoculação em camundongos com amostras de sangue suspeito permite a visualização do protozoário. A parasitemia deve ser acompanhada a cada 48h através de esfregaço sanguíneo dos roedores e o período pré-patente geralmente é curto (5 dias), variando conforme a patogenicidade da cepa. A inoculação em camundongo se faz geralmente por via intraperitoneal, mas também pode ser feita por via intramuscular. O inóculo de sangue infectado é de aproximadamente 0,20 ml.

Segundo Lanham & Godfrey (1970) a *mini-anion exchange centrifugation technique* (mAECT) é um método diagnóstico bastante sensível. Consiste na realização de uma cromatografia de troca iônica em DEAE (dietilaminoetil)-Celulose, onde os protozoários são isolados do material sanguíneo, e depois de centrifugados são visualizados em microscópio óptico.

Vários métodos sorológicos são descritos na literatura para diagnóstico da infecção por *T. evansi*. A limitação destes métodos reside no fato de que após o

tratamento os anticorpos podem persistir por mais de um ano, o que dificulta saber se é de uma nova infecção ou são anticorpos residuais de uma infecção passada e já curada. Silva et al. (2002) descreve as principais técnicas sorológicas indicadas, dando destaque a imunofluorescência indireta (RIFI), Teste de aglutinação direta (MONZÓN, 1993), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) e o Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT).

A identificação e caracterização do protozoário são fundamentais para estabelecer o diagnóstico diferencial entre as espécies de tripanosomas. Durante décadas o diagnóstico baseou-se em diferenças morfológicas, as quais permitiam distinguir parasitos de diferentes subgêneros, mas mostravam falhas na distinção entre variantes biológicos. Atualmente, métodos de detecção específica de DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) oferecem alto nível de especificidade. Ventura et al. (2002) desenvolveram um diagnóstico por PCR do tipo espécie-específico para o *T. evansi*.

2.1.5 Tratamento

Vários protocolos terapêuticos têm sido estudados com o objetivo de prevenir ou tratar a infecção por *T. evansi*. Neste sentido, uma ampla variedade de drogas químicas e extratos de plantas medicinais têm sido recomendados, embora até o momento não se tenha obtido um tratamento plenamente eficaz e com mínima toxicidade ao hospedeiro.

A terapia química ainda é o método de eleição no controle da doença em animais domésticos, sendo recomendado na literatura drogas como suramina, quinapiramina, melarsomina, homidium, isometamidium, aceturato de diminazene e dipropionato de imidocarb. Os grandes problemas encontrados no tratamento são a alta toxicidade destas drogas para o hospedeiro e o surgimento de cepas resistentes, visto que grande parte destes compostos vem sendo utilizados no campo há mais de 40 anos (SILVA et al., 2002). Os três primeiros grupos químicos são primariamente indicados como drogas terapêuticas para infecções por *T. evansi*, enquanto, homidium, isometamidium e diminazene são primariamente usados para o tratamento e profilaxia da tripanossomíase em bovinos, ovinos e caprinos (SILVA et al., 2004).

A diferença entre terapia curativa e preventiva está na dependência da droga escolhida e, em alguns casos da dose prescrita. Neste sentido, normalmente os tratamentos profiláticos recomendam doses inferiores ao limiar mínimo terapêutico, podendo induzir à resistência parasitária. Drogas capazes de se armazenarem nos tecidos e serem liberadas gradualmente para a corrente circulatória conseguem manter uma concentração de princípio ativo por um maior tempo circulante (PEREGRINE, 1994). Segundo Boyt (1986) recomenda-se drogas curativas quando a prevalência da parasitose é baixa ou quando poucos casos atingem um rebanho. Segundo o mesmo autor, a terapia preventiva é indicada em áreas de alto risco e quando a prevalência da enfermidade é alta durante o ano.

A suramina pertence ao grupo das naftilamidas e foi a primeira droga tripanocida usada em animais domésticos, sendo comercializada desde 1920. Para infecções por *T. evansi* foi usada por muitos anos como droga de escolha para tratamento em equinos e camelos por apresentar menor toxicidade que as demais. Também foi utilizada com fins profiláticos, uma vez que possui forte ligação com as proteínas plasmáticas, permanecendo na circulação sistêmica por mais de três meses. Atualmente esta droga não é mais comercializada (SILVA et al., 2004).

Quinapiramina pertence ao grupo das pirimidinas, sendo usado com fins curativos ou profiláticos. Comercialmente são apresentadas nas formas de sulfato e cloreto. Foi amplamente utilizada na África entre 1950 e 1970, sendo proibido seu uso em 1974 devido à toxicidade destes compostos. Em 1984 a droga retornou ao mercado para uso em camelos e cavalos, não sendo indicado para bovinos devido à resistência cruzada com outras drogas tripanocidas (HAROUN et al., 2003). Em áreas endêmicas, o cloreto de quinapiramina é indicado como terapia preventiva, sendo recomendada a administração a cada dois ou três meses (SILVA et al, 2004).

Homidium é o princípio ativo pertencente ao grupo das fenantridinas cuja atividade tripanocida foi primeiramente reconhecida por Browning et al. em 1938. O brometo de homidium é um análogo do brometo de dimidium, tendo sido amplamente utilizado a partir de 1952 no tratamento da tripanossomíase bovina no leste e oeste da África. É uma droga efetiva na cura de tripanossomíases e com menor toxicidade em relação ao dimidium (FORD et al., 1953). A administração da dose de 1 mg/kg com fins profiláticos mostrou-se eficaz por um período de 4-6 semanas (LEACH, 1955; MAWAMBU, 1971). Dolan et al. (1990) testaram o brometo de homidium após tratamento com o aceturato de diminazeno, e concluíram que os tripanosomas

presentes foram sensíveis a concentração da droga, ou seus metabólitos ativos por até 17 semanas pós administração.

A inexistência de apresentações comerciais do produto, custo, resistência por parte dos protozoários ao princípio ativo e relatos de toxicidade, são fatores limitantes ao uso da droga no Brasil.

O isometamidium é um derivado da fenandridina resultante da combinação do homidium com a p-aminobenzamida diazotizada do dimenazene. Tem ação profilática e curativa. A dose recomendada para fins profiláticos é de 0,5-1,0 mg/kg. A atividade profilática em bovinos dura entre 2 a 22 semanas. Pelegrine et al (1988) afirma haver uma relação direta entre a dose administrada e o tempo de profilaxia, não havendo diferenças entre animais infectados e não infectados.

A melarsomina foi desenvolvida há pouco mais de 20 anos (RAYNAUD et al., 1989), e é o único composto que apresenta eficácia comprovada em diversas espécies (PAYNE et al., 1994), sendo indicado em infecções agudas, subagudas e crônicas. Pertence ao grupo dos tioarsenitos, tendo como apresentação comercial o Cymelarsan®, também conhecido como Mel Cy ou RM 110. A dose recomendada para infecções por *T. evansi* em camelos é de 0,2-1,25 mg/kg e em búfalos é de 0,25-3,0 mg/kg. Para equinos a dose é de 0,25 mg/kg via intramuscular profunda. O produto não é usado com fins profiláticos (BRUN et al., 1998).

Diminazene pertence ao grupo das diamidinas aromáticas, sendo comercializado na forma de aceturato, em soluções a 4% ou 7%, associadas ou não a vitamina B12. As preparações comerciais estão associadas com antipirinas, um estabilizador que prolonga a atividade do composto em solução. São indicados a administração na dose de 3,5 mg/kg, via intramuscular profunda, no tratamento das babesioses e tripanossomíases de bovinos, ovinos, equinos e caprinos. Recomenda-se o volume máximo de 10 ml no local da aplicação, sendo que quando necessárias doses superiores estas devem ser subdivididas em dois ou mais pontos de aplicação. Segundo os fabricantes, o tratamento com subdoses predispõe ao desenvolvimento de resistência parasitária e ineficácia do tratamento. Normalmente uma única dose é suficiente, podendo ser administrada uma segunda dose 48 a 72 horas após, quando a infecção não for controlada.

Verma et al. (1976) ao administrarem a dose de 10 mg/kg por via intramuscular em bovinos experimentalmente infectados por *T. evansi* constataram a ação tripanocida do diminazene após 12 horas da aplicação. Silva et al. (2004) indicam a

dose de 7 mg/kg via intramuscular profunda ou 0,5 mg/kg via endovenosa lenta no tratamento das infecções por *T. evansi* em equinos. Da Silva et al. (2008) ao administrarem as doses únicas de 3,5 e 7 mg/kg via intramuscular em ratos, constataram que a droga não controlou a infecção, havendo recidiva após 25 e 37 dias respectivamente. No entanto, ao administrar as mesmas doses durante 5 dias consecutivos obtiveram a cura da infecção durante o período do experimento (120 dias).

Tonin et al (2011) ao associarem o aceturato de diminazene com selênio em ratos experimentalmente infectados obtiveram aumento da longevidade, incremento na taxa de leucócitos e linfócitos e redução da peroxidação lipídica. Por outro lado, a associação com vitamina E não mostrou os mesmos efeitos protetores e tripanocidas. O período de carência para abate é de 30 dias após a última aplicação em bovinos, ovinos, caprinos e equinos. No caso de utilização do leite para consumo humano ou industrialização o período de carência é de 72 horas. Segundo Peregrine & Mamman (1993), é a droga mais utilizada no Brasil contra tripanossomíases de animais domésticos, tendo boa eficácia terapêutica e menor índice de resistência quando comparado a outras drogas tripanocidas. Estudos de Tuntasuvan et al. (2003) e Colpo et al. (2005) demonstraram que a administração de dose única de aceturato de diminazene nem sempre leva a cura total da infecção pelo *T. evansi*, resultando em recidivas da enfermidade. Isto pode ocorrer devido à administração de subdoses e, também, a incapacidade do medicamento em atravessar a barreira hematoencefálica (JENINGS et al., 1977).

O dipropionato de imidocarb pertence ao grupo das carbanilidas, cujo nome químico é 3,3'-bis (2-imidazolina-2-yl) dipropionato de carbanilida. Apresenta-se na forma de um pó esbranquiçado, odor de ácido propiônico, altamente solúvel em água e álcool metílico. Quando administrado por via subcutânea ou intramuscular atinge níveis terapêuticos plasmáticos rapidamente. Atua impedindo a absorção pelo protozoário de hipoxantina e ácido oróico, necessários à síntese das purinas e pirimidinas. Bloqueia desta forma a síntese de ácido nucléico do parasito (RONCATI, 2007).

Estudos sobre a farmacocinética do dipropionato de imidocarb em cavalos demonstraram que esta droga tem um pico de concentração sanguínea após a primeira hora de aplicação, pico de concentração urinária após 36 horas e fecal em até 10 dias após a administração. Esta eliminação fecal longa indica eliminação biliar

da droga e consequente armazenamento hepático (BELLOLI et al., 2002). Zobba et al. (2008) compararam a administração de oxitetraciclina associada a uma dose de dipropionato de imidocarb com a administração de duas doses de dipropionato de imidocarb com intervalo de 24 horas no tratamento da piroplasmose equina. Concluíram que todos os animais tratados com duas doses de imidocarb se recuperaram, enquanto no grupo tratado com oxitetraciclina + dipropionato de imidocarb houve recidiva em alguns animais do experimento, obtendo-se a melhora clínica somente após sucessivas administrações de dipropionato de imidocarb. Em alguns casos, surgiram efeitos tóxicos colinérgicos após a segunda dose de imidocarb, os quais foram resolvidos após a administração de sulfato de atropina. A DL50 e efeitos tóxicos em diferentes dosagens foram determinados por Adams (1981). Ao testar o princípio ativo nas doses de 0 - 2 - 4 - 8 - 16 e 32 mg/kg, em duas doses com intervalo de 24 horas, concluiu-se que a DL50 é de $15.99 \pm 1,49$, sendo a principal causa mortis a falência hepato-renal. A dose de 4 mg/kg, produz discretos sinais e pouca alteração nas dosagens enzimáticas hepáticas e renais. A partir de 8 mg/kg ocorrem reações sistêmicas evidentes e elevações significantes nos níveis enzimáticos, assim como lesões histopatológicas renais após 21 dias de tratamento, sugerindo que nesta dose ou superior há riscos em equinos.

Nogueira et al. (2005) ao administrarem as doses de 1, 2 e 2,4 mg/kg a equinos imunossuprimidos com babesiose crônica, concluíram que as doses testadas foram eficientes na prevenção da reagudização da infecção. Da Silva et al. (2008) ao tratarem ratos experimentalmente infectados com *T. evansi* nas doses de 2 e 4 mg/kg não conseguiram controlar a infecção.

2.2 Imunoglobulina Y (IgY)

A produção e uso de anticorpos aviários tem despertado grande interesse na comunidade científica devido a diversidade de aplicações diagnósticas e terapêuticas nas pesquisas biomédicas. Devido a distância filogenética, mecanismos de diversificação imune e capacidade de transferência das imunoglobulinas séricas para a gema do ovo, atualmente reconhece-se uma série de vantagens ao utilizar anticorpos aviários ao invés de anticorpos de mamíferos.

A denominação IgY refere-se as imunoglobulinas da gema do ovo (Y = yolk). É uma imunoglobulina sérica de baixo peso molecular predominante em anfíbios, répteis e aves. A transferência de imunidade da galinha para o embrião através de anticorpos presentes na gema foi demonstrada pela primeira vez em 1893 por Klemperer.

2.2.1 Características estruturais, imunológicas e bioquímicas

A anticorpogênese é o principal mecanismo de defesa natural dos vertebrados, e é o processo pelo qual ocorre a formação de anticorpos específicos sempre que o indivíduo se depara com agentes estranhos. Assim também ocorre com as galinhas, cujo sistema imunológico é ativado na presença dos mais diversos antígenos.

Entre os três isotipos aviários conhecidos (IgY, IgM e IgA), IgY é a imunoglobulina mais abundante no soro. Os órgãos na galinha responsáveis pela produção de anticorpos diferem daqueles dos mamíferos. Os órgãos linfoides primários das aves são o timo e a Bursa de Fabricius, enquanto os órgãos secundários incluem baço, glândulas Harderianas, medula óssea e tecidos linfoides conjuntival, bronquial e intestinal associados.

Nas aves as principais células envolvidas no processo são as células B. No entanto, o desenvolvimento das células B nas aves ocorre de maneira diferente quando comparado aos mamíferos. Células B precursoras originadas das células tronco, iniciam o desenvolvimento no saco vitelino, continuam na medula óssea e finalmente migram desta para a Bursa de Fabricius. Neste local, células B imaturas sofrem um processo de amadurecimento. Células B maduras migram para os órgãos linfoides secundários, onde ocorre a produção de anticorpos. Dependendo do antígeno e do método diagnóstico utilizado, os anticorpos podem ser detectados no soro até 8 dias após o estímulo antigênico (BERNARDO, 2009).

A Bursa de Fabricius é um órgão exclusivo das aves, tem localização próxima à cloaca e alcança seu tamanho máximo entre 8 e 10 semanas. A remoção cirúrgica deste órgão repercute em queda significativa da concentração de anticorpos circulantes e desaparecimento das células B e células plasmáticas. Quando a bursectomia é realizada no estágio embrionário ocorre a formação de poucas células

precursoras incapazes de produzir anticorpos (CIRIACO et al., 2003; BERNARDO, 2009).

Define-se anticorpos como glicoproteínas altamente conservadas, com estrutura geral composta por 4 cadeias peptídicas (2 leves e pesadas), pertencentes a superfamília das imunoglobulinas. Cada anticorpo é formado por 2 pares de cadeia pesada e 2 pares de cadeia leve, sendo que cada cadeia é codificada pelo seu próprio locus gênico específico. Enquanto os mamíferos possuem dois diferentes loci para a cadeia leve, as galinhas apresentam um único locus para esta cadeia (tipo lambda). Em relação a cadeia pesada, nas aves há apenas um locus e três genes (μ , α e ν) para a região constante. A codificação das cadeias pesadas por estes genes origina as três classes de imunoglobulinas: IgM, IgA e IgY.

A imunoglobulina M tem estrutura e propriedades semelhantes à dos mamíferos, sendo encontrada preferencialmente no soro. Também pode ser detectada na bile, conteúdo intestinal, líquido seminal e clara do ovo. É formada por cinco monômeros, originando uma estrutura polimérica com cerca de 900 kDa.

A imunoglobulina A é produzida nos tecidos linfoides da vesícula biliar e trato intestinal, sendo encontrada na bile, fluídos intestinais, secreções respiratórias e clara do ovo. É encontrada nas formas dimérica (340 kDa) e monomérica (170 kDa).

A imunoglobulina Y é o anticorpo predominante do soro das galinhas, combinando as funções da IgG e IgE dos mamíferos. A concentração sérica média corresponde a 4,5 a 5 mg/ml. Estruturalmente é composta por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas (Figura 3), com peso molecular em torno de 180 kDa. A cadeia leve tem peso em torno de 18 kDa, o fragmento Fab pesa em torno de 45 kDa (SUN et al., 2001). A cadeia pesada tem peso molecular entre 65-105 kDa e apresenta um domínio constante a mais do que a IgG dos mamíferos. Além disso, a região da dobradiça não é desenvolvida, sendo atribuído aos resíduos de prolina e glicina a flexibilidade limitada do fragmento Fab da IgY (NARAT, 2003; BIZANOV & JONAUSKIEN, 2003).

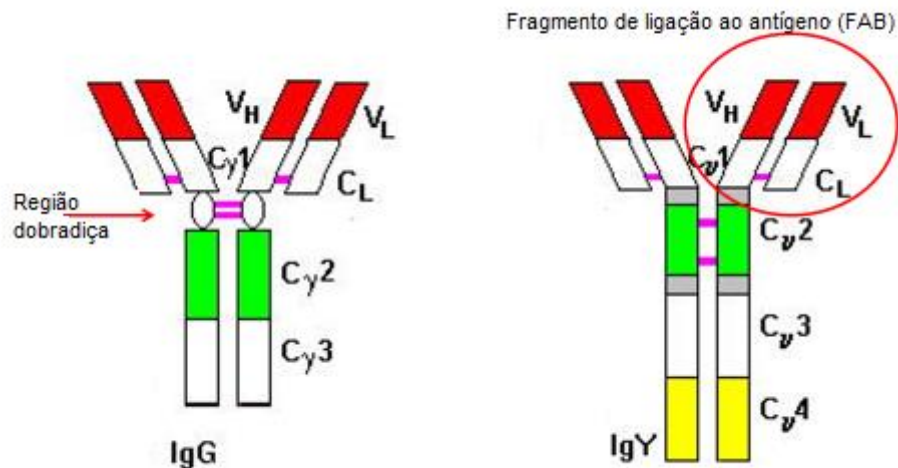


Figura 3 - Estrutura das imunoglobulinas de mamífero (IgG) e de galinhas (IgY) (<http://www.mcmaster.ca/inabis98/immunology/szabo0509/two.html>).

Contreras et al (2005) ao produzirem IgY anti epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, obtiveram duas cadeias pesadas com peso molecular igual a 57 e 70 kDa e duas cadeias leves de peso igual a 35 e 37 kDa. Ferella et al. (2012) obtiveram IgY específica contra o vírus sincicial respiratório bovino com peso molecular de 70 kDa na cadeia pesada e 25 kDa na cadeia leve. Observa-se que o peso molecular é variável de acordo com a metodologia e antígeno utilizado. A molécula IgY é mais hidrofóbica que a IgG, tem ponto isoelétrico entre 5,7 a 7,6, é sensível a desnaturação ácida e resistente a altas temperaturas (JARADAT & MARQUARDT, 2000). Em temperatura ambiente a meia vida desta imunoglobulina é superior a 6 meses. Em temperaturas superiores a 37 °C a meia vida pode ser igual ou inferior a 30 dias. O congelamento a -70°C por 12 meses provoca a perda de 50% de sua atividade, enquanto a -20°C, pelo mesmo período, a perda é mínima (STAAK et al., 2001; LEE et al., 2002).

2.2.2 Transferência passiva de imunidade em galinhas

A transferência de imunoglobulinas da mãe para o filho é um processo comum a todas as espécies e é denominada imunidade passiva. Enquanto nos mamíferos a

IgG é transferida no ambiente uterino ou após o nascimento via colostro, nas aves ocorre a transferência de IgY do soro para a gema do ovo (BERNARDO, 2009).

A IgY é transferida para o ovo durante sua formação no ovário da ave, sendo transportada ativamente para a gema através do epitélio folicular. Este processo é mediado por receptores. Para que ocorra a transferência é necessário que a fração Fc da imunoglobulina esteja intacta, uma vez que é necessária a ligação desta fração com receptores específicos no epitélio do oócito (MORISSON et al., 2001; DE SOUSA, 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário o pinto absorve a IgY da gema. As IgA e IgM da mãe se difundem através do líquido amniótico e são ingeridas pelo embrião. Ao nascer, os pintos já apresentam a IgY no soro e as demais na mucosa intestinal (BERNARDO, 2009).

A quantidade de imunoglobulina transferida depende da concentração sérica, sendo toda a concentração transferida (MOHAMMED et al., 1998). Já a IgM e a IgA são incorporadas juntamente com a albumina à clara do ovo durante a passagem do ovo pelo oviduto, em quantidades bastante inferiores quando comparada a IgY. A quantidade de IgY transferida independe do tamanho do ovo (PATTERSON et al., 1962). A passagem transovariana leva aproximadamente 5 dias (SCHADE et al., 2005). A meia vida circulante em aves adultas é de 36-65 horas (MORRISON et al., 2001).

A quantidade de IgY na gema é dependente da sua concentração no soro. Segundo Carlander et al. (2002) a concentração varia entre 10 e 20 mg/ml, podendo ser obtido entre 100 e 400 mg por ovo. Tini et al. (2002) encontraram valores entre 6 e 13 mg/ml, o que permite obter até 200 mg de anticorpo em uma única gema. A linhagem genética, raça e biorritmo da ave são fatores que influenciam nestes parâmetros.

2.2.3 Composição da gema do ovo

A gema possui em torno de 51% de matéria seca e 49% de água, correspondendo a 36% do peso total de um ovo fresco. É constituída predominantemente de lipídios e proteínas. As proteínas encontram-se na forma livre

ou conjugadas aos lipídios (apoproteínas). A fração lipídica é constituída por triglicerídeos, fosfolipídios, colesterol e carotenoides. A interação entre estes dois constituintes originam lipoproteínas de baixa densidade e alta densidade.

As proteínas podem ser separadas através de centrifugação, originando duas frações principais: a granular (precipitado) e o plasma (fluido sobrenadante claro) (KOVACS-NOLAN et al., 2005).

A fração granular constitui 22% das proteínas totais da gema, sendo composta por lipoproteínas de alta densidade (HDL: α e β -lipovitelinas) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A fração de plasma possui 78% das proteínas totais da gema, sendo constituída por LDL e livetinas (BURLEY & COOK, 1961; ANTON, 2007).

As livetinas são divididas em frações α -, β -, e γ , sendo as proteínas séricas. O principal componente da α -livetina é a albumina, sendo a α -2-glicoproteína o principal constituinte das β -livetinas. Nas γ -livetinas predominam as IgY (SCHADE & CHACANA, 2007).

2.2.4 Vantagens do uso de anticorpos aviários

As vantagens em se produzir anticorpos em galinhas em vez de mamíferos são enumeradas por Contreras et al. (2005) e Schade et al. (2005), e incluem:

- IgY aviária combina as funções da IgG e IgE de mamíferos. Nos mamíferos a IgG forma imunocomplexos e facilita a opsonização, ativa o sistema complemento e dá proteção ao feto através da passagem através da placenta. IgE pode sensibilizar células efectoras e mediar reações anafiláticas. IgY não só promove proteção contra infecções, como também pode ser mediadora da anafilaxia;
- Os anticorpos da galinha não tem reações cruzadas com a IgG de mamíferos (fator reumatoide) e não atacam os glóbulos vermelhos desta espécie. Os fatores reumatoides podem causar reações inespecíficas em testes imunológicos, podendo determinar resultados falso-positivos em testes ELISA. A IgY não tem afinidade com fatores reumatoides;

- Não ativam o sistema complemento e a cascata de coagulação. Durante a ativação do sistema complemento, o componente C4 ativado pode ligar-se ao fragmento Fab da IgG, interferindo na ligação com o antígeno;
- Permite a obtenção de maior quantidade de anticorpos devido à distância filogenética entre aves e mamíferos. Os anticorpos produzidos possuem alta afinidade e avides;
- O sistema imunitário das aves pode produzir anticorpos contra antígenos de mamíferos altamente complexos, podendo reconhecer partes de uma molécula que a IgG não o faria;
- Podem ser liofilizadas, possibilitando longa vida nas prateleiras. A IgY é bastante estável frente as variações de temperatura. Pode ser armazenada em solução salina a 0,85% associada à azida sódica a 0,02% a 4°C por até 10 anos. Sua atividade no ovo *in natura* estocado a 4°C se mantém por no mínimo seis meses (OLOVSSON & LARSSON, 1993);
- Podem ser produzidos a baixo custo e em larga escala. O manejo das aves é simples e relativamente mais barato quando comparado a experimentos com mamíferos. Além de produzir IgY rapidamente e em grandes quantidades, as galinhas mantêm altos níveis de anticorpos específicos por um longo período;
- Quando comparado a IgG dos mamíferos, o rendimento da IgY pode ser 5 a 10 vezes superior, dependendo do adjuvante utilizado (GOTTSTEIN & HEMMELER, 1985), protocolo de imunização e purificação (SVENDSEN et al., 1996);
- Não é necessário sangrar a ave porque os anticorpos são extraídos da gema do ovo. A coleta de ovos é um método simples, não invasivo e reduz o número de animais utilizados na produção de anticorpos.

2.2.5 Importância da tecnologia IgY

É importante ressaltar que, embora os conhecimentos sobre estes anticorpos datem desde o século XIX, sua aplicação nos meios científicos ressurgiu a partir do final da década de 1950 como técnica alternativa para minimizar o sofrimento de

animais utilizados na pesquisa (RUSSEL & BURCH, 1992). A partir de 1980 houve um incremento na utilização de IgY nos ensaios laboratoriais, principalmente devido a disponibilidade de reagentes comerciais para purificação, venda de padrão IgY e anticorpos específicos anti IgY marcados com fluoresceína, fosfatase alcalina ou peroxidase (CHACANA et al., 2004). Conforme Karlsson et al. (2004) outros fatores que vem estimulando as pesquisas com estas imunoglobulinas referem-se ao custo de produção, facilidade de manejo e aumento da produção de ovos por ave (cerca de 280 ovos/ave/ano).

A tecnologia IgY é recomendada pelo Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos em substituição a IgG de mamíferos. Também foi aprovada como recurso alternativo a favor do bem estar animal pelo *Office Vétérinaire Federal* da Suíça (CHACANA et al., 2004; SCHADE et al., 2005).

Garcia et al. (2005) desenvolveram anticorpos IgY anti *Giardia duodenalis* e avaliaram diferentes métodos de purificação a partir da gema do ovo. A imunização foi realizada com trofozoítos do parasito, por via intramuscular aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias. A pureza da IgY foi avaliada através do SDS-PAGE, o qual na ausência de redutor mostrou uma banda de 180 kDa e na sua presença bandas de 30 e 68 kDa (referente as cadeias leve e pesada respectivamente). As maiores concentrações (4,6 mg/ml) de imunoglobulina foram obtidas pela deslipidação com dextran sulfato-cloreto de cálcio e precipitação com sulfato de amônio.

A produção e purificação de anticorpos IgY contra *Trypanosoma cruzi* foi relatada por Contreras et al. (2005). Os autores imunizaram as galinhas com formas epimastigotas do protozoário, via intradérmica, utilizando 10 mg do parasito na primeira dose seguido por três injeções de reforço (5 mg/ave) a cada dez dias. O ensaio avaliou três métodos de purificação da imunoglobulina, sendo o método do clorofórmio-PEG o de melhor rendimento, facilidade de execução e baixo custo.

Relatos de Ferreira Junior et al. (2012) descrevem a produção, caracterização e aplicações da IgY contra o *Toxoplasma gondii*. Os autores referem-se à alta especificidade e avidéz dos anticorpos produzidos e demonstram a capacidade da imunoglobulina em detectar formas de *T. gondii* em seções embebidas em parafina e cultura celular.

Palaniyappan et al. (2012) desenvolveram um sistema de detecção quantitativa para diagnóstico da síndrome respiratória aguda causada pelo coronavírus. Segundo os autores, o método é sensível, efetivo e permite um diagnóstico precoce.

Antígenos circulantes de *Trichinella spiralis* no soro de ratos experimentalmente infectados foram detectados através da tecnologia IgY. A zoonose é transmitida principalmente pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo larvas do nematódeo. ELISA realizado com IgG de coelhos é o exame sorológico usado para diagnóstico, porém é impreciso até o terceiro mês pós-infecção. 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).

Cai et al. (2012) utilizaram a tecnologia IgY associada ao ELISA, como método diagnóstico para infecções por *Schistosoma japonicum* e compararam a sensibilidade e especificidade do método com a técnica tradicional utilizando anticorpos de mamíferos. Ao testarem amostras de soro de 43 pacientes humanos infectados com *S. japonicum*, constataram que todos os casos agudos e 91,3% das infecções crônicas apresentaram reação positiva ao teste. Observaram também que 5% das amostras controle de pacientes sadios resultaram em positividade no teste. Concluíram que a método desenvolvido é razoavelmente sensível e específico.

Relatos de Rangel et al. (2010) descrevem o desenvolvimento de anticorpos IgY e IgG em galinhas e coelhos respectivamente, contra proteínas extraídas de hifas de *Pythium insidiosum* isoladas de equinos doentes. Os autores reconhecem os anticorpos aviários como valioso instrumento diagnóstico e imunoterápico para o controle da enfermidade.

Lee et al. (2012) ao compararem a administração de IgY por via oral em apresentações encapsuladas e não encapsuladas, concluíram que a atividade do anticorpo encapsulado no estômago é menor em relação a apresentação não encapsulada. No entanto, no intestino delgado foi observada atividade significativa nos grupos que receberam as formas encapsuladas. O ensaio permitiu concluir que o encapsulamento é útil quando se quer preservar a atividade do anticorpo, principalmente na prevenção ou tratamento de infecções bacterianas entéricas.

O uso de imunoglobulina aviária específica contra *Helicobacter pylori* em ratos foi estudado por Malekshahi et al. (2011). Foi utilizada a dose de 60 mg de IgY, via oral, por um período de 28 dias. Os autores obtiveram sucesso na inibição da bactéria e considerável redução da inflamação nos tecidos estomacais, concluindo que a imunoterapia pode ser uma importante alternativa ao uso de terapias antibióticas.

A atividade terapêutica dos anticorpos aviários contra infecções agudas e recorrentes por *Clostridium difficile* foi relatada por Mulvey et al. (2011). O experimento realizado em hamsters sírios avaliou o potencial das imunoglobulinas na prevenção da morbidade e mortalidade. A dose administrada de IgY foi de 0,5 mg em 0,5 ml de tampão bicarbonatado, diariamente por um período de 10 dias. Os autores sugerem com base nos resultados obtidos que as preparações obtidas a partir da gema do ovo de galinhas imunizadas podem representar uma alternativa segura e de baixo custo para o tratamento destas infecções em humanos.

Vega et al. (2011) avaliaram o grau de proteção e a imunomodulação induzida através da administração oral da gema do ovo contendo imunoglobulina específica contra rotavírus bovino (BRV) em bezerros recém-nascidos experimentalmente infectados. Estes animais, após serem separados da mãe nas primeiras horas após o parto, receberam alimentação a base de leite suplementado com 6% de gema de ovo contendo IgY anti BRV. No segundo dia de vida foram infectados oralmente com o agente viral causador de diarreia. Os autores concluíram que a dieta suplementada com gema de ovo enriquecida com IgY anti BRV oferecida a bezerros recém-nascidos, por um período de 14 dias, representa uma importante estratégia na prevenção da diarreia produzida por este vírus.

A avaliação da ação profilática de anticorpos IgY contra o rotavírus, agente causador de diarreia em humanos, foi relatada por Vega et al. (2012). A pesquisa foi realizada com leitões gnotobióticos experimentalmente infectados com o rotavírus humano WaG1. A IgY foi administrada por via oral, como suplemento ao leite usado na alimentação destes animais. Os autores relatam que a suplementação por nove dias conferiu proteção contra a diarreia associada ao rotavírus e significativa redução da taxa viral. Sugerem ainda, que a administração como suplemento lácteo é capaz de proteger porcos recém-nascidos contra patógenos entéricos virais. Acreditam que os achados estendem-se a espécie humana, tendo em vista a similaridade entre o modelo experimental e crianças no que se refere à fisiologia gastrointestinal e sistema imune.

Testes *in vitro* realizados por Ferella et al. (2012) comprovaram a habilidade dos anticorpos aviários em neutralizar o vírus sincicial bovino (BRSV), responsável por doença respiratória grave nesta espécie animal. Os autores testaram dois protocolos de imunização das galinhas, usando como variáveis a dose de antígeno administrado e número de administrações e concluíram que a quantidade e tempo de

detecção da IgY na gema do ovo é dose dependente. Segundo os autores a IgY é uma ferramenta importante na profilaxia e/ou tratamento de infecções respiratórias causadas por este agente.

Xu et al. (2012) avaliaram a eficácia *in vitro* e *in vivo* da imunoglobulina contra a doença periodontal causada pelo *Fusobacterium nucleatum*. Os autores obtiveram inibição da formação do biofilme (placa bacteriana) e do crescimento bacteriano após administração de 10 e 20 mg/ml de IgY. Para os testes *in vivo* foram utilizados 2 mg de IgY específica em pó em 100 µl de PBS com 2% carboximetilcelulose, a cada 4 dias. Após seis semanas de tratamento, os ratos foram sacrificados para avaliação da perda óssea. Concluiu-se que a IgY preveniu a evolução da doença periodontal por diminuir a perda óssea alveolar.

Imunoglobulinas IgY produzidas na gema de ovos de avestruz foram produzidas por Tobias et al. (2012). Os autores obtiveram sucesso na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Mendonza et al. (2012) imunizaram galinhas com 500 µg de veneno de *Bothrops atrox* emulsificado com adjuvante completo de Freund (ACF) em um volume final de 1 ml, via intramuscular, em quatro pontos da zona peitoral. Foram realizados reforços a cada duas semanas, utilizando o adjuvante incompleto de Freund (AIF). Foi avaliada a capacidade neutralizante da imunoglobulina e a existência de reação cruzada com outros venenos. Os ensaios de reatividade cruzada mostraram que o veneno de *Bothrops atrox* compartilha mais epítopes comuns com o veneno de *Bothrops brazili* do que com venenos de serpentes dos gêneros *Lachesis* e *Crotalus*. Com base nos resultados, os autores comprovaram a eficácia dos anticorpos IgY contra o veneno da serpente, assim como indicam seu uso como ferramenta imunológica para avaliação da reatividade cruzada com venenos de outras espécies.

Sui et al. (2011) avaliaram a atividade antibacteriana do anticorpo da gema do ovo contra *Listeria monocytogenes*, um importante patógeno para humanos e animais, transmitido por alimentos contaminados como produtos lácteos e pescados. O efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano foi comprovado em amostras líquidas e amostras de alimentos (salmão fresco e salmão defumado). Após oito horas de incubação com a IgY específica obteve-se redução do crescimento da bactéria nas amostragens líquidas. A IgY também inibiu a multiplicação bacteriana nas amostras de salmão previamente contaminadas e armazenadas durante 15 dias a 6°C. Os

autores sugerem a utilização de IgY específica como agente antimicrobiano seguro e natural na indústria alimentícia como alternativa ao uso de conservantes químicos sintéticos.

2.2.6 Produção e purificação de IgY

As imunoglobulinas aviárias podem ser usadas para a produção de anticorpos a partir do momento em que as aves iniciam a postura. Para assegurar um alto nível de produção de anticorpos as aves devem ser imunizadas periodicamente. Estes anticorpos mostram grande avidéz logo após a primeira imunização. Porém, este resultado depende de algumas variáveis: tipo, dose e peso molecular do antígeno, adjuvante, via de administração, genética do animal e tipo de criação. A concentração do antígeno pode variar de 0,1 a 1 mg, em casos especiais 10 µg, de acordo com o tipo de adjuvante escolhido. O volume das administrações varia entre 0,5 a 1 ml e a via de aplicação usual é a intramuscular, preferencialmente no musculo peitoral. O intervalo pode ser de 4 a 8 semanas e o número de imunizações depende do interesse da produção de anticorpos (SCHADE et al., 2005). Intervalos de 14 dias também são relatados (BERNARDO, 2009; MENDONZA et al., 2012).

Após a primeira inoculação as aves iniciam a produção de anticorpos, os quais após alguns dias são encontrados na gema dos ovos.

O processo de extração sempre inicia pela separação da gema e da clara. Para separar a fase aquosa da gema utilizam-se solventes orgânicos, substâncias hidrófilas ou congelamento a – 20°C. Este processo é denominado deslipidação (STAAK et al., 2001).

O isolamento da imunoglobulina a partir da gema pode ser realizado por técnicas de precipitação com sais ((DEIGNAN et al., 2000), técnicas cromatográficas (MEULENAER & HUYGHEBAERT, 2001; CHACANA et al., 2003) e ultrafiltração (KIM & NAKAI, 1998). A escolha do método está na dependência da quantidade, pureza e atividade biológica desejada, assim como do custo da técnica.

Dentre os sais citados nas técnicas de precipitação destacam-se o sulfato de sódio, ácido caprílico, dextransulfato, sulfato de amônio e polietilenoglicol. Bernardo (2009), ao produzir anticorpos aviários contra *Leishmania amazonenses*, comparou

as extrações realizadas com sulfato de amônio e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000), e constatou que enquanto o primeiro apresentou maior rendimento, o segundo obteve maior pureza. O polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) é um polímero de alto peso molecular formado a partir do etileno glicol. O uso desse polímero para extração de IgY da gema foi introduzido por Polson et al. (1980). O método tem como vantagem a possibilidade de manipulação em temperatura ambiente sem risco de desnaturação da imunoglobulina (AKITA & NAKAI, 1993).

Embora a IgY seja uma imunoglobulina com características e funções semelhantes a IgG dos mamíferos, ela possui uma estrutura levemente diferenciada, a qual confere propriedades e características bioquímicas distintas. IgY tem uma massa molecular um pouco mais alta do que a equivalente dos mamíferos (aproximadamente 167 kDa). Não há um consenso sobre seu peso molecular, havendo divergências na literatura, que pode variar entre 167 a 206 kDa (MOREIRA, 2007). Bernardo (2009) obteve uma banda proteica de aproximadamente 250 kDa.

3 ARTIGOS

Os resultados desta tese são apresentados na forma de artigos, com sua formatação de acordo com as orientações das revistas ao quais foram submetidos:

3.1 Artigo 1

Autores: Luzia Cristina Lencioni Sampaio, Matheus Dellaméa Baldissera, Michele Rorato Sagrillo, Tiago da Silva Heres, Camila Belmonte Oliveira, Daniel Roulim Stainki, Silvia Gonzalez Monteiro

De acordo com normas para publicação em:
International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

Artigo publicado na Revista “International Journal of Pharmacy and
Pharmaceutical Sciences” em abril de 2014
(Anexo 1)

**IN VITRO CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF CHICKEN EGG YOLK
ANTIBODIES (IGY) AGAINST *TRYPANOSOMA EVANSI* IN HUMAN
LYMPHOCYTES**

Luzia Cristina Lencioni Sampaio^{a*}, Matheus Dellaméa Baldissera^{a,b}, Michele Rorato Sagrillo^b, Tiago da Silva Heres^c, Camila Belmonte Oliveira^a, Daniel Roulim Stainki^a, Silvia Gonzalez Monteiro^a.

^aDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil.

^bLaboratório de Cultura Celular, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Brazil.

^cCentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Brazil.

*Corresponding author at: Departamento de Microbiologia e Parasitologia - UFSM. Faixa de Camobi - Km 9, Campus Universitário, Santa Maria - RS, Brasil. 97105-900, Prédio 20, Sala 4232

Tel: +55 55 3220-8958

E-mail: sampaio.cris@gmail.com , sgmonteiro@uol.com.br

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of polyclonal antibodies (IgY), produced from the immunization of chickens against protozoan *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*). For the tests a culture of human lymphocytes and IgY samples (1, 2.5, 5 and 10 mg/mL) were used. Cell viability was assessed by employing MTT assay, and the formation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation were measured by testing the 2-thiobarbituric acid (TBARS). Genotoxicity was evaluated by chromosomal instability test. At the concentrations tested, the study revealed that IgY anti-*T.evansi* showed no significant cytotoxic and genotoxic effects. These findings demonstrate the safety of these antibodies to mammalian cells.

Keywords: MTT assay; chromosomal instability; avian immunoglobulin; passive immunization.

INTRODUCTION

Trypanosoma evansi (*T. evansi*) is a protozoan that affects most of the domestic animals, as well as some wild species [1, 2]. In 2005, it was reported the first case of human infection in a farmer in India [3]. The disease has a worldwide distribution, affecting mainly tropical and subtropical regions [4, 5, 6, 7].

The transmission of tripanosomosis occurs through inoculation of *T. evansi* by the saliva of flies of Tabanidae and Muscidae families, or artificially by fomites, such as needles, contaminated with infected blood [8]. In South America, vampire bats (*Desmodus rotundus*) can also transmit it [9].

Following the infection is initiated the multiplication of the parasite (in the bite site) and its migration into the bloodstream and lymphatic system. As the parasitemia increases, the inflammatory response is activated and peaks of fever occur. The infection usually tends to become chronic, with periods without blood parasites and/or fever [8, 10]. At this stage, a hemolytic anemia occurs due to the release of hemolysins and enzymes or directly by the trypanosomes, which are able to induce lesions in the membrane and increase the fragility of these cells [11, 8]. By the other hand, acute infections can cause rapid death in untreated horses and dogs [12, 13, 14]. Chronic infections can last for years [15] and at this stage the worsening of clinical signs and cachexia usually occurs [16, 9, 17]. Neurological signs have been described in the terminal phase of the disease, especially in horses and cattle [18, 17, 19].

Chemical therapy is still the method of choice in controlling the disease in domestic animals. The major problems observed in the treatment are the high host toxicity of some drugs and the emergence of resistant strains, since most of these compounds have been used in the field for over 40 years [9]. Specific avian antibodies immunotherapy against this parasite may be a therapeutic alternative in controlling and/or prevention of these infections.

Immunoglobulin Y (IgY) are polyclonal antibodies obtained from egg yolk (yolk=y) of hens immunized. The production and uses of these immunoglobulins has drawing the attention of the scientific community, mainly because of the diagnostic diversity and therapeutic applications in biomedical research. Furthermore, it is considered an alternative technique to reduce the suffering of animals used in researches [20], since the antibodies are derived from egg yolk. Since 1980 there was an increase in IgY application in laboratorial tests, mainly due to the availability of commercial reagents

for purification, availability of standard IgY and specific antibodies anti-IgY labeled with fluorescein, alkaline phosphatase or peroxidase [21].

A considerable number of advantages to the use of avian antibodies, rather than mammalian antibodies are recognized, such as: avian IgY aggregates the functions of the mammalian IgG and IgE; hens antibodies do not have cross reactions with mammalian IgG, red blood cells are not attacked by it, not activating the complement system, as well as the coagulation cascade. IgY technology allows to obtain antibodies with high affinity and avidity. Individually, a hen is able to produce more antibodies than rabbits, goats, horses or rodents [22, 23].

The production and evaluation of the therapeutic activity of avian antibodies in parasitic diseases [22, 24, 25], bacterins [26, 27, 28] and viral [29] are widely reported in the scientific literature. The application of these immunoglobulins consists in an important alternative for the prevention or treatment of several acute, chronic or recurrent diseases. There is now a concern, not only with therapeutic efficacy, but also with pharmacology safety, determined by cytotoxicity and genotoxicity tests. Toxic stimuli threaten the cellular metabolic functions, and thus, the response of cells depends on the toxicity generated, may allowing the cells to adapt to the environment in which they were submitted [30]. The toxicity tests are performed to determine the potential risks that can be generate by new products on health and environment [31]. Thus, the cytotoxicity reflects the effects on cellular structures. Most of the cells should show a similar response, and respond similarly when the toxicity is measured by several criteria of viability [32].

In vitro cytotoxicity assay is the first test for evaluating the biocompatibility of any material for uses in biomedicine. In vitro methods, for assessing the toxicity of biomaterials, were standardized using cell cultures. In these tests the material evaluated is directly or indirectly when placed in contact with mammalian culture cells, in order to verify cellular changes may produced by different mechanisms [33]. Cell viability is a general term, and it may be assessed by assays that determine one or more cellular parameters such as: 3-(4,5)-dimethylthiazolil-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (mitochondrial activity), lactate dehydrogenase enzyme (LDH), Trypan Blue, among others. These assays are generally suitable for measuring acute toxic effects of cultured cells [34].

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) have been applied for decades as biomarkers of genotoxic and cytotoxic effects. Abundant in the bloodstream, these

cells are exposed to any mutagenic agent, being able to reflect recent damage. Cultured PBMC have become the promising in vitro model for many studies, highlighting the usefulness of this kind of cell line in studies of cyto-genotoxicity [35]. When a new agent is incorporated into the cellular environment, an important aspect that deserves to be evaluated is whether this agent are able to cause genotoxicity. Damage to genetic material can result in the induction or promotion of carcinogenesis, influencing cell reproduction if the DNA of germ cells was compromised [36]. These compounds can react with several structures and cellular organelles, including DNA, proteins and lipids, affecting multiple cellular processes. The DNA, when exposed to certain agents, can mutate, affecting the stability of the genome and leading to the development of genetic diseases and cancer. It may also results in the formation of reactive species, which involve cell dysfunction, mutations and aging [37]. Although all cellular components are susceptible to the action of reactive oxygen species (ROS), the membrane structure is generally the most affected by the lipid peroxidation, leading to changes in the structure and permeability. Consequently, there is selectivity loss in ion exchange and release of organelle contents, such as hydrolytic enzymes of lysosomes, and formation of cytotoxic products (e.g., malondealdeído), culminating in cell death [38].

Therefore, the present study aims to assess the cytotoxic and genotoxic effects produced by antibodies IgY anti-*T. evansi* in cell-cultured human lymphocytes.

MATERIAL AND METHODS

IgY obtainment and characterization

Three New Hampshire hens, at 25 weeks of age, were immunized with trypomastigotes of *T. evansi*. Extraction of IgY from egg yolk was carried out according to the method previous described [39, 40]. After extraction, the immunoglobulins were analyzed by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE), under reducing conditions [41]. The antigen antibody reaction was detected by Western blot and ELISA avidity. The concentration of specific IgY anti-*T.evansi* extracted was assessed by *Coomassie blue* method [42] using bovine serum albumin as standard.

Obtention of samples for cytotoxicity and genotoxicity tests

Peripheral blood samples were drawn (Vacutainer® - BD Diagnostics, Plymouth, UK), from a healthy female volunteer, 21 years old, non-smoker, without drinking or under

chronic medication and under 12-h overnight fasting. Blood samples were stored in heparin tubes and 5 mL were used to obtain cultured lymphocytes in culture media composed by 1 mL of RPMI 1640 (with 10% of fetal calf serum - FCS), 1% of penicillin/streptomycin and phytohemagglutinin (PHA). The cells were maintained in suspension culture at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 growth medium during 72 hours. Further, the cells were exposed to 72 hours treatment and the cell viability, mitotic index and chromosomal instability were assessed. All the treatments were carried out in triplicate.

Treatments

In order to test the damage effects of IgY on cell viability, as well as its protective effects on chromosomes damage in human lymphocytes, a similar protocol as described by Wilms et al. (2005)[43] was performed. The concentrations of 1, 2.5, 5 and 10 µg/mL were tested. The medium culture was used as a negative control, while the medium added of 25 µM of hydrogen peroxide was used a positive control group.

Evaluation of IgY cytotoxicity

MTT assay was based on the metabolism of MTT reagent (yellow color) in formazan crystals (violet color). The reaction occurs through the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase, which remains active only in viable cells. Cells were treated at the given concentrations (1, 2.5, 5 and 10 mg/mL) and, after 72 hours of incubation (at 37 °C, CO₂/5%), 10 µL of MTT was added to each well (5 mg/mL), diluted in phosphate buffered saline (PBS-1X). Then, the plate was homogenized (150 rpm/5 minutes) and still maintained at the same conditions (37 °C and CO₂/5%) for 4 hours. Later, the supernatant was removed and 150µL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added. Finally, the plate was shaken at 150 rpm/5 minutes and the reading was performed in an ELISA reader (wavelength of 570 nm). The results were expressed as "%" of cell viability compared with the controls.

Evaluation of IgY genotoxicity

After exposure treatments, one replicate of each treatment was used to investigate the mitotic index, as well as the chromosomal instability, using the G-band cytogenetic analysis. At least 50 mitoses were analyzed in each sample.

Lipid peroxidation of IgY

Lipid peroxidation was assessed by TBARS (thiobarbituric acid reactive species) method [44]. After treatment, the cells were centrifuged for 10 minutes at 2000 rpm, in order to remove the culture medium. The supernatant was discarded and 2 additional centrifugations (10 minutes at 2000 rpm) were made using saline (0.9 % NaCl). After these steps, the supernatant was discarded and 100 μ L of Butylated hydroxytoluene (BHT/10 mM), plus 500 μ L of trichloroacetic acid (TCA 20 %) were added for a final centrifugation (5 minutes at 2000 rpm). After centrifugation, 900 μ L of the supernatant was mixed with a reaction medium containing thiobarbituric acid (TBA at 0.8 %), being incubated at 95 °C during 1 hour. Absorbance was measured at 532 nm wavelength with results expressed in nmol MDA/10⁶ cells.

Data analysis

Assay results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Dunnett test in order to verify the accuracy of the data. Values with $p < 0.05$ were considered statistically different. (*) $P < 0.05$ when compared with the control (#) $P < 0.05$ when compared with phytohemagglutinin.

RESULTS AND DISCUSSION

Our immunization protocol stimulated the production of immunoglobulins anti-*T.evansi*, since this immunoglobulin was detected and extracted from egg yolks from the fourth week post immunization. A well-defined peptide band, stained by SDS-PAGE, was observed by Western blot, revealing in the light (25-20kDa) and heavy (75-50 kDa) chains of the extracted IgY. The binding capacity of the antibody produced against the antigen was detected through the high avidity levels obtained by ELISA avidity. The average production of IgY anti-*T. evansi* was 2.64 ± 0.15 (4th week) and 2.87 ± 0.14 (10th week) [$t(3) = -4.31$, $p < 0.05$].

The IgY antibodies, when subjected to *in vitro* culture medium containing human lymphocytes, did not produce damage in the cellular structures. The percentage of cellular viability did not decrease in any of the tested concentrations. The cytotoxicity test showed that the IgY produced did not cause damage when in direct contact with the blood cell, especially evidenced by preservation of mitochondrial physiology. It was also observed a slight increase for cell viability as the concentration of the samples increased, although it was not statistically significant. However, when the concentration

of 10 mg/mL was reached, the increase in the percentage of viability was statistically significant compared to the control group, H₂O₂ group, as well as with the lowest concentration groups (Figure 1); it did not differ from group treated with phytohemagglutinin (PHA), a substance that stimulates mitosis of lymphocytes.

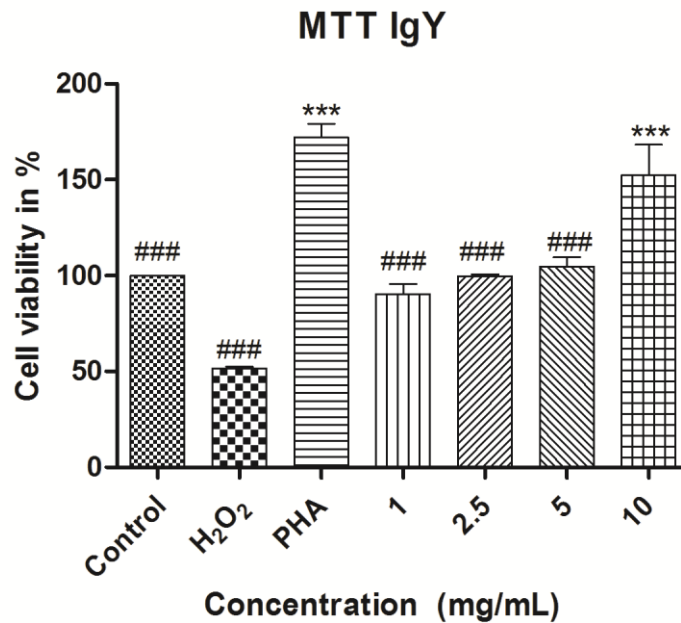


Fig. 1: IgY MTT after 72 hours of incubation.

These findings suggest that the concentration increase of IgY can enhance the proliferation of lymphocytes. Lymphocytosis is a late cellular response and is related to the production of specific and lasting antibodies. Antibodies are a major opsonins produced by the host defense system and they are essential for the stimulation of antigen phagocytosis [38]. On *T. evansi* infection, it is desirable that the host has an immediate cellular immune response, in order to neutralize or minimize the action of the parasite. Our finding suggests that IgY binds on *T. evansi* and, additionally, it also stimulates the proliferation of lymphocytes, inducing an immune response against this specific and long-lasting parasite. However, only in vivo tests, preferably parenterally, may evaluate the effectiveness, or not, of these cells on the protozoan infection.

Our results did not detect structural changes in metaphase of the chromosomes (chromatid breaks, centromeric, acentric and dicentric fragments, as well as the formation of tri and tetra radial figures), which could indicate the occurrence of chromosomal aberrations (Figure 2).

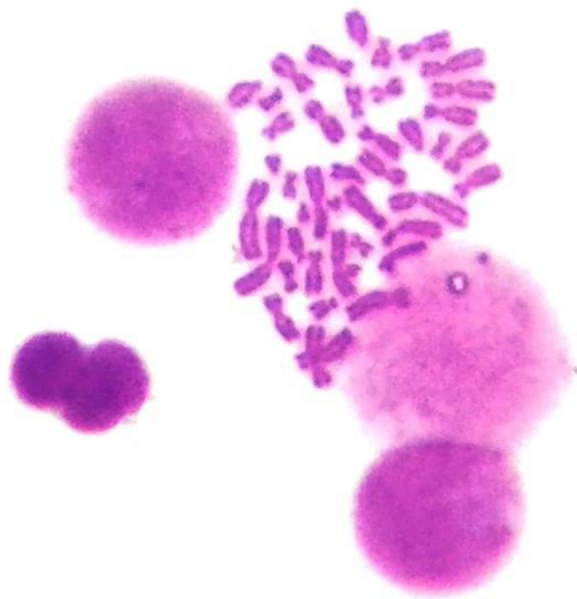


Fig. 2: Lymphocyte in metaphase by the karyotype technique, without chromosomal alteration.

The analysis of chromosomal instability test (Table 1) demonstrated, at all concentrations tested, 100 % of metaphase integrity, as evidenced in the control group. Similarly, the interphase nuclei were normal and without any metanuclear changes. The dependent dose effect on the mitotic index was well evidenced (data shown in Table 1), where concomitant, as the concentration of IgY increased, also the number of metaphases enhanced. The concentration of 10 mg/mL showed a significant difference when compared with the control ($p < 0,05$). The proliferative activity observed in the MTT assay, at the concentration of 10 mg/mL, was also observed by the mitotic index in the chromosomal instability test. Our findings suggest that the therapeutic use

of avian antibodies do not promote change in cell reproduction or change the DNA structure in human lymphocytes.

Table 1: Karyotypic changes (%) in mononuclear cells of human peripheral blood exposed to different concentrations of IgY.

Concentration	Metaphases	Intact metaphases (%)	Morphology of the nucleus	Markers of Chromosomal Instability
Control	700 ± 5	100	Normal	-
H ₂ O ₂	350 ± 4 ***	5	Karyopyknosis	Karyopyknosis
1 mg/mL	730 ± 3	100	Normal	-
2.5 mg/mL	760 ± 6	100	Normal	-
5 mg/mL	793 ± 2	100	Normal	-
10 mg/mL	810 ± 5***	100	Normal	-

According to TBARS test, the MDA values found in different concentrations of IgY, did not differ statistically from the control group ($p > 0,05$). The dose-dependent effect, on the formation of MDA, is evidenced in figure 3, where it was observed MDA growth following the increasing concentration of IgY. However, the amount of ROS produced did not result in the peroxidation of the cell membrane in any tested concentration ($p > 0.05$).

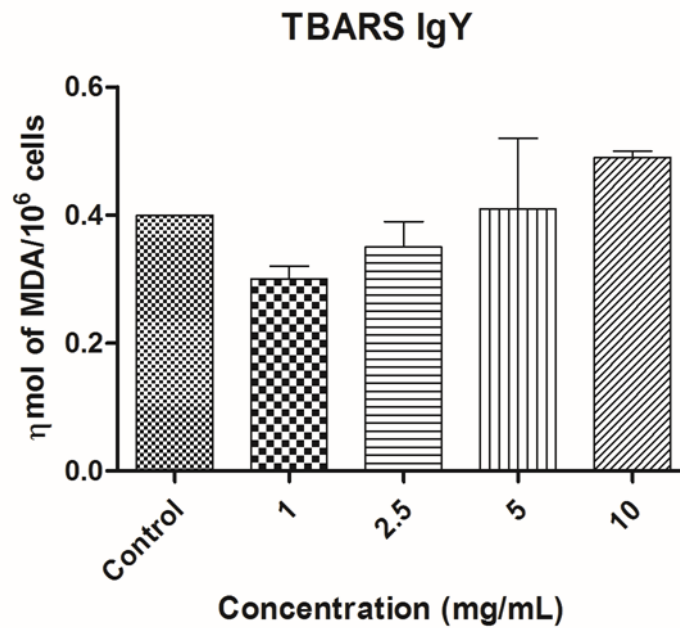


Fig. 3: TBARS assay after 72 h of incubation. Results are expressed as nmol of MDA/10⁶ cells.

Lipid peroxidation is the process in which the ROS act on phospholipids of cell membranes, causing their disintegration. Lipid peroxides formation results in the disruption of the cell membranes, DNA mutations, oxidation of unsaturated lipids and formation of chemical waste [38]. No report has been found in the literature about the occurrence of lipid peroxidation in the presence of avian antibodies.

CONCLUSION

IgY antibodies anti-*T. evansi*, at concentrations of 1, 2.5, 5 and 10 mg/mL did not cause damage to the cell membrane of human lymphocytes, did not affect the cell viability, as well as did not produce DNA damage at the chromosomal level; thus, not presenting cytotoxicity and genotoxicity. At 10 mg/mL of concentration, IgY had a proliferative effect, consisting in the normal cell proliferation, as evidenced by the chromosomal instability test, a result that can be seen in cellular viability test and mitotic index.

REFERENCES

1. Darling ST. Equine trypanosomiasis in the canal zone. **Bull Soc Pathol Exot** 1910; 3: 381-84.
2. Hoare HE. The trypanosomiasis of mammals: A zoological monograph. Oxford & Edinburgh: Blackwell Scientific Publications; 1972.
3. Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR et al. Human Trypanosomiasis Caused by *Trypanosoma evansi* in India: The First Case Report. **Am J Trop Med Hyg** 2005; 73: 491-95.
4. Hornby HE. Animal trypanosomiasis in eastern Africa, 1949. H. M. Stationery Office; 1952.
5. Bajyana Songa E, Kageruka P, Hamers R. The use of the card, agglutination test (Testryp CATT) for the serodiagnosis of *T. evansi* infection. **Ann Soc Belg Med Trop** 1987; 67: 51-7.
6. Luckins AG. *Trypanosoma evansi* in Asia. **Parasitol Today** 1988; 4: 137-142.
7. Bazolli RS, Marques LC, Machado RZ, Aquino LPC, Alessi AC, Camacho AA. Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães. **ARS Veterinaria** 2002; 18: 148-52.
8. Connor RJ, Van Den Boosche P. African animal trypanosomoses. In: Coetzer JAW, Tustin RC (Eds.). Infectious diseases of livestock. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press 2004; 1: 251-96.
9. Silva RAMS, Seidl A, Ramirez L, Dávila AMR. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia diagnóstico e controle. Corumbá, MS (Brazil): Embrapa; 2002.
10. Pays E, Vanhamme L, Pérez-Morga D. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. **Curr Opin Microbiol** 2004; 7: 369-74.

11. Jain NC. Hemolytic anemia associated with some infectious agents. In: Jain NC. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.177-92.
12. Levine ND. Protozoan parasites of domestic animals and man. 2nd ed. Minneapolis: Burgers; 1973.
13. Aquino LPCT, Machado RZ, Alessi AC, Marques LC, Castro MB, Malheiros EB. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1999; 94: 255-60.
14. Herrera HM, Norek A, Freitas TPT, Rademaker V, Fernandes O, Jansen AM. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. **Parasitol Res** 2005; 96: 121-26.
15. Brun R, Hecke, H, Lun ZR. *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Vet Parasitol** 1998; 79: 95-107.
16. Brandão LP, Larsson MHMA, Birgel EH, Hagiwara MK, Ventura RM, Teixeira MMA. Infecção natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – Relato de caso. **Clínica Veterinária** 2002; 36: 23-6.
17. Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Soares MP, Milano J et al. Outbreaks of Trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesqui Vet Bras** 2005; 25: 239-49.
18. Tuntasuvan, D, Sarataphan N, Nishikawa H. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Vet Parasitol** 1997; 73: 357-63.
19. Da Silva AS, Oliveira CB, Zanette RA, Soares CDM, Coradini G, Polenz CH et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Sci Vet** 2007; 35: 373-76.

20. Russel WMS, Burch RL. Principles of Humane Experimental Technique. Special ed. Herts, U.K.:Universities Federation for Animal Welfare 1992.
21. Chacana PA, Terzolo HR, Calazado EG, Schade R. Tecnologia IgY e aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Rev Med Vet** 2004; 85: 179-89.
22. Contreras VT, Lima AR, Navarro AC, Arteaga RY, Graterol D, Cabello L et al. Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas con epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. **Salus online** 2005; 9: 21-7.
23. Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Asplund JP, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Altern Lab Anim** 2005; 33: 1-26.
24. Garcia DA, Nicholls RS, Arévalo A, Torres O, Duque S. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. **Biomedica** 2005; 25: 451-63
25. Ferreira Junior A, Santiago FM, Silva MV, Ferreira FB, Macêdo Júnior AG. Production, Characterization and Applications for *Toxoplasma gondii*-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. **PLoS One** 2012; 7.
26. Malekshahi ZV, Gargari SLM, Rasooli I, Ebrahimizadeh W, Treatment of *Helicobacter pylori* infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. **Microb Pathog** 2011; 51: 66-372.
27. Mulvey GL, Dingle TC, Fang L, Strecker J, Armstrong GD. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. **J Med Microbiol** 2011; 60: 1181-87.

28. Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y., Li S et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. **Biotechnol Adv** 2011; 29: 860-68.
29. Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chatta KS, Fernández FM, Wigdorovitz A et al. IgY Antibodies Protects against Human Rotavirus Induced Diarrhea in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Disease Model. **PloS One** 7; 2012.
30. Yang A, Cardona DL, Barile FA. Subacute cytotoxicity testing with cultured human lung cells. **Toxicol in Vitro** 2002; 16: 33–9.
31. Castaño A, Gómez-Lechón MJ. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicol in Vitro** 2005; 19: 695-705.
32. Babich H, Rosenberg DW, Borenfreud E. In vitro cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). **Ecotoxicol Environ Saf** 1991; 21: 327-36.
33. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Mat Res** 2003; 6: 3-31.
34. Soenen SJ, De Cuyper M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast Media Mol Imaging** 2009; 4: 207-19.
35. Maluf SW, Riegel M. Citogenética Humana. Porto Alegre: Artmed; 2011.
36. Doak SH, Manshian B, Jenkins GJS, Singh N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. **Mutat Res** 2011; 745: 104-11
37. Riley T, Sontag E, Chen PP, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:402–12.

38. Vajdovich P. Free Radicals and Antioxidants in Inflammatory Processes and Ischemia-Reperfusion Injury. **Vet Clin North Am Small Anim Pract** 2008; 38: 31–123
39. Polson A, Von Vechmar MB, Van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunol Commun** 1980; 9: 475-93.
40. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. **J Vis Exp** 2011; 51: 1-5.
41. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 1970; 227: 680-85.
42. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72:248-54.
43. Wilms LC, Hollman PC, BootsAW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. **Mutat Res** 2005; 582:155-62.
44. Ohkawa H, Ohishi N, Yag K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem** 1979; 95:351-58.

3.2 Artigo 2

Autores: Luzia Cristina Lencioni Sampaio, Thirssa Helena Grandó, Lucas Trevisan Gressler, Matheus Dellaméa Baldissera, Dianni de Menezes Capeleto, Mariângela Facco de Sá, Francielli Pantella Kuns de Jesus, Alceu Gonçalves dos Santos Junior, Andreia Nobre Anciuti, Karina Colonetti, Daniel Roulim Stainki, Silvia Gonzalez Monteiro*.

De acordo com normas para publicação em: Veterinary Parasitology

Artigo submetido para publicação na Revista "Veterinary Parasitology"
(Anexo 2)

**Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for
treating *Trypanosoma evansi* infection**

Luzia Cristina Lencioni Sampaio^{a*}, Thirssa Helena Grando^a, Lucas Trevisan Gressler^a, Matheus Dellaméa Baldissera^a, Dianni de Menezes Capeleto^a, Mariângela Facco de Sa^a, Francielli Pantella Kuns de Jesus^a, Alceu Gonçalves dos Santos Junior^b, Andreia Nobre Anciuti^b, Karina Colonetti^b, Daniel Roulim Stainki^a, Silvia Gonzalez Monteiro^{a*}.

^a Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil.

^b Biotechnology Center, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Brazil.

*Corresponding author at: Departamento de Microbiologia e Parasitologia - UFSM. Faixa de Camobi - Km 9, Campus Universitário, Santa Maria - RS, Brasil. 97105-900, Prédio 20, Sala 4232

Tel: +55 55 3220-8958

E-mail: sampaio.cris@gmail.com, sgmonteiro@uol.com.br

Abstract

The use of avian antibodies has aroused interest in biomedical research due to the numerous advantages compared to mammal's antibodies. Our study aimed to produce and purify IgY immunoglobulins in order to use as an alternative therapy against *Trypanosoma evansi*. Every 14 days, four New Hampshire chickens were immunized with trypomastigotes of *T. evansi*, totaling five inoculations. Eggs were collected during 70 days and the extraction of IgY was performed by precipitation through the PEG-6000 method. Characterization and purification of IgY anti-*T. evansi* was carried out by SDS-PAGE and Western blot, where heavy and light chains were detected. The dosage of total proteins determined by photometry at 280 nm, obtaining an average yield production of 9,46 mg/mL. Sample's titration allowed the quantification of specific IgY anti-*T. evansi*, with antibodies produced showing high avidity indexes. The results indicated that *T. evansi* is able to generate an immune response in poultry, resulting in a production of specific antibodies. In the *in vivo* study, IgY treatment resulted in increase of pre-patent period and in the longevity, when compared with the positive control, demonstrating an initial, but no curative, trypanocidal activity.

Keywords: immunotherapy, avian immunoglobulin, IgY, tripanosomosis.

Introduction

Trypanosoma evansi (*T. evansi*) is the etiologic agent of the disease known in Brazil as trypanosomosis, “*Mal das Cadeiras*” or “*Surra*”, which affects horses of all breeds and has worldwide distribution (Darling, 1910; Hoare, 1972). Cattle, sheep, goats, donkeys, cats and pigs are also susceptible hosts. Canines, capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), coatis (*Nasua nasua*) and vampire bats (*Desmodus rotundus*) are reservoirs and occasionally may manifest clinical symptoms; additionally, bats are considered vectors of this disease (Nunes et al., 1993; Silva et al., 2002). The transmission of the parasite is essentially mechanical, since trypomastigotes are transferred from one host to another through blood-sucking insects (flies of the families Tabanidae and Muscidae) or artificially by needles contaminated with infected blood (Silva et al., 2002). Clinical signs include weight loss, pale mucous membranes, intermittent fever, cough, swelling in the lower parts of the body, superficial lymph nodes increased, muscle atrophy, incoordination, hindquart’s paresis, difficulty to get up and proprioceptive deficits (Levine, 1973; Aquino et al., 1999; Herrera et al.; 2005). Chronic infections can last for years (Brun et al., 1998), usually occurring at this stage the worsening of the clinical signs and cachexia (Brandão et al., 2002; Silva et al., 2002; Rodrigues et al., 2005).

In Brazil, the most commonly drug used in trypanosomosis treatment in domestic animals is the diminazene aceturate, which is able to provide an elimination of the trypanosomes in bloodstream, just few hours after its administration (Peregrine and Mamman, 1993). However, it do not presents curative efficacy, sometimes occurring parasitemia relapses, mainly because most of the trypanocidal drugs do not cross the blood brain barrier (Lonsdale-Eccles and Grab, 2002; Masocha et al., 2007).

The production of polyclonal antibodies, by poultry immunization, has aroused interest in scientific community. In addition to the numerous advantages described in literature (Olovsson and Larsson, 1993; Svendsen et al., 1996; Contreras et al., 2005; Schade et al., 2005) for antibodies produced in mammals, the IgY technology is an ethical experimental procedure by replacing the bleeding for collecting eggs. The process consists in the immunization of chickens at regular intervals, with subsequent production of serum immunoglobulin (IgG). These proteins are transferred to the yolk and are named IgY (Y=yolk). The amount of IgG in the yolk is dependent upon its

concentration in serum (Carlander et al., 2002; Tini et al., 2002). The time between immunization and detection of antibodies in yolks is variable, depending on the biological assay performed (Patterson et al., 1962; Schade et al., 2005). The extraction and purification of it from yolk involves two mechanisms: delipidation and aqueous extract purification (Staak et al., 2001).

The present study aims to produce highly effective and pure antibodies by immunizing chickens with trypomastigotes of *T. evansi*; evaluate the therapeutic efficacy of these antibodies in rats experimentally infected with this protozoan; compare the therapeutical responses among rats treated only with IgY-anti *T. evansi* and rats treated with this antibody in association with diminazene aceturate and imidocarb dipropionate

Material and Methods

All procedures in this study were approved by the Animal Welfare Committee of Ethics in Animal Experimentation of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), number 018/2013.

2.1 IgY production and characterization

The antigen

For this experiment, it was used a strain of *T. evansi* obtained from a dog naturally infected (Colpo et al., 2005), which is kept in liquid nitrogen. Prior of each immunization, the parasites were thawed and injected into rats, intraperitoneally (Silva et al., 2003). When the rats presented high parasitemia, their blood was collected and the parasites were counted using a Neubauer chamber (Wolkmer et al., 2007).

Chicken immunization

Four 30-days-old egg-laying New Hampshire hens were kept in individual cages, receiving food and water *ad libitum* until the beginning of the egg laying. For

inoculation, a solution containing at least 10^7 tripomastigotes of *T. evansi* was used, added to incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich®) at a 1:1 ratio, with a final volume of 1.0 mL. Inoculations were performed in three chickens, intramuscularly, at five different sites of the pectoral muscle (200 μ L/site). The first immunization was performed so that the hens began posture. The interval between immunizations was set as 14 days (days 0, 14, 28, 42 and 56), totaling five inoculations. The fourth hen was not immunized, serving as the negative control.

Selection and initial processing of eggs

From the fourth week post-immunization (day 21), the eggs were collected daily until the 70th day. They were all identified and stored at 4 °C for further purification and antibodies characterization.

*Extraction of immunoglobulin IgY anti-*T. evansi**

Extraction was performed by the method of precipitation of polyethylene glycol 6000 (PEG-6000) as described by Polson et al. (1980) and Pauly et al. (2011). After separation of white and yolk, the egg yolk was transferred to a filter paper and after to a 250 mL tube. The delipidation was performed through the emulsion of the yolk in PBS at 2:1 proportion. After this step PEG-6000 at 3,5 % was added. The mixture was then centrifuged at 4 °C, 13,000 x g for 20 minutes. The supernatant obtained was transferred to a new tube, while the lipid layer was discarded. The process was repeated twice using PEG-6000 at 8,5 % and 12 %, respectively. After dialysis, the obtained extract was transferred to a 2 mL eppendorf tubes and stored at -20 °C.

Total protein concentration

The determination of protein content was performed by photometry at 280 nm, with the samples diluted in PBS (1:50). To estimate the amount of IgY anti-*T. evansi* produced a calculation according to the Lambert-Beer law was applied, using an extinction coefficient of 1,33 to IgY (Pauly et al., 2011).

SDS-PAGE - Polyacrylamide gel electrophoresis

Purified IgY was electrophoresed on SDS-PAGE using 10 % polyacrylamide gel to check the purity, according to Laemmli (1970). The extracted samples were applied to the stacking gel wells in a final volume of 10 μ L. The electrophoresis, subjected to an initial current of 80V and 120V, was stopped when the dye used in the samples reached the base of the separating gel. One removed from the system, the gel was stained with Coomassie blue R 250 (Sigma-Aldrich®) for at least 1 hour and, then, treated with a decolorizing solution (glacial acetic acid 100 mL + methanol 400 mL + distilled water 500 mL) for visualization of protein bands (Bernardo, 2009). In another assay, the sample with trypomastigotes forms of *T. evansi* (antigen) were subjected to SDS-PAGE under the same conditions described above.

Western blot

The IgY extracted was subjected to polyacrylamide gel of electrophoresis as described above, being electro transferred to a nitrocellulose membrane 0,45 μ m (Bio-Rad®). For the transfer it was used electroblotting mini tank (30V), which remained in cold chambering "overnight". The membrane was blocked with 5 % skim milk in PBS-T for 1 hour. The membrane was washed 3 times with PBS-T and incubated for 1 hour with rabbit anti-chicken IgY peroxidase conjugate (1:2000) (Sigma-Aldrich®, USA). Finally, the membrane was washed with PBS-T 3 more times. The reaction was revealed with diaminobenzidine prepared in Tris HCl + nickel sulphate + hydrogen peroxide. The membrane remained under constant stirring until visualization of the reactive bands.

In the assay, in which antigen was subjected to electrophoresis in polyacrylamide gel, electro transfer to nitrocellulose membrane was identical as described above. After blocking the membrane, it was washed 3 times with PBS-T and incubated for 1 hour with IgY extracted from the samples (1:50). The membrane was washed 3 times again and incubated with rabbit anti-chicken IgY peroxidase conjugate (1:2000) for more 1 hour. All incubations were carried out at room temperature. The reaction was revealed as described previously.

Double Radial Immunodiffusion in agarose gel

In order to perform the test, initially it was prepared a borate (boric acid 0,09 g + potassium chloride 0,36 g + water 50 mL), and the agarosis gel (agarose Sigma 0,4 g + borate buffer 2,5 mL + saline 0,85 % 42,5 mL). In a Petri dish of 85 mm diameter 15 mL of agarose gel was placed. After this, was prepared a test pattern of seven wells for drilling the gel to the bottom of the plate (a central cavity around which six wells arranged in a circle). In the central cavity antigen was placed. The peripheral wells 1, 3 and 5 were filled with negative control (Milli-Q water) and the cavities 2, 4 and 6 with the extracted sample (IgY). The cavities were filled until the disappearance of the meniscus. The system was kept in BOD incubator, with reading at 24, 48 and 72 hours. The formation of a precipitation line shows the antigen recognition by the antibody.

ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay)

96-well ELISA plates (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA - USA) were sensitized with soluble antigen (10 µg/well) diluted in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6, and incubated "overnight" at 4 °C. After incubation, the plates were washed 4x with saline buffer solution (SBS) (pH 7.2). For testing, the plates were first blocked with 100 µL per well, Fetal Bovine Serum - FBS - (Cripion®, SP, Brazil) (FBS + SBS) and incubated at 37 °C. After this incubation, the plates were washed again 4x with SBST (SBS pH 7.4 with 0.05 % of Tween 20). The test sera were diluted at 1:10, 1:100, 1:500, 1:2000, 1:3000, 1:5000 in FBS + SBS, distributed on the plates (100 µL/well), and incubated for one hour at 37 °C. Followed this last incubation, the plates were washed 4x. Each test sample was subjected to three replicates per plate and 2 inter-plate repetitions. After incubation with the primary antibody the plates were washed 4x with SBST and subjected to incubation with a secondary antibody (IgY anti-peroxidase conjugate) (Sigma Aldrich®, USA) at 1:3000 dilution and incubated for one hour at 37 °C. Finally, the plates were washed again to, then, receive 100 µL of chromogenic substrate (orthophenylene-diamine, OPD). After fifteen minutes, the reaction was blocked with 10 µL of H₂SO₄ (4N), with reading held in microplate spectrophotometer with 490 nm filter.

ELISA avidity

To perform the test, 96-well ELISA plates (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA - USA) were sensitized with antigen and incubated with IgY (1:3000), as described in the previous section. Then, in each well it was added 100 μ L of 6M urea in SST, pH 7.2 for five minutes. Plates were washed three times with SSTT and the secondary antibody added. Revelation was performed as described above.

The results were expressed as the avidity index (AI) determined by the ratio between optical density values of samples treated with urea (U+) and the optical density of untreated samples (U-), and expressed in percentage ($AI = U+/U- \times 100$). The values (AI) < 40 % were considerate of low avidity, AI between 41 and 70 % of medium avidity and AI > 70 % of high avidity.

Specific IgY concentration

Specific IgY anti-*T.evansi* content was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard. This assay is based on the binding of the dye Coomassie Blue G-250 to the protein. This binding is accompanied by measuring the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

In vivo test

Experimental animals

Sixty rats (*Rattus norvegicus*), male, 90 days old and weighing an average of 346 (\pm 27.53) grams were used as the experimental model. They were kept in cages, six rats each, housed on a light/dark cycle of 12 h, and in an experimental room with temperature and humidity controlled (25 $^{\circ}$ C; 70 % respectively). They were fed with commercial ration and water *ad libitum*. All animals were submitted to a period of 10 days for adaptation.

Animal's infection

During the first step one rat (R1) were infected intraperitoneally with infected blood, kept cryopreserved in liquid nitrogen. This procedure was performed to obtain a large amount of viable parasite for infection of experimental groups. Animals in the groups A, C, D, E, F, G, H, I and J were inoculated intraperitoneally with 0.1 mL of blood from R₁ containing 10⁴ trypanosomes (Day 0). The animals were daily monitored through peripheral blood smear (Silva et al., 2006), and when it was observed an average of eight protozoan/field (microscopically), the treatment was started

Experimental design

Immunoglobulin IgY anti-*T. evansi* was administered intraperitoneally (IP), while imidocarb dipropionate and diacetate of diminazene were administered intramuscularly (IM).

The rats were divided into a ten groups (groups A to J) with six animals each group. They were named and treated as follows: Grup A (positive control - PC): infected and not-treated animals; Grup B (negative control - NC): uninfected and not-treated animals; Grup C (IgY): infected and treated (IgY anti-*T. evansi* at 10 mg.kg⁻¹), during five days; Grup D (IgY-Imid): infected and treated animals (imidocarb dipropionate 12 % [Imizol[®]]¹ at 3 mg.kg⁻¹; plus IgY *anti-T. evansi* at 10 mg.kg⁻¹), also during Five days; Grup E (IgY-Dim): infected and treated animals (diminazene diacetate 7 % [Ganaseg[®]]² at 3,5 mg.kg⁻¹; and specific IgY *anti-T. evansi* at 10 mg.kg⁻¹), during five days; Grup F (Imid): infected and treated animals (imidocarb dipropionate 12 % at 3 mg.kg⁻¹), during five days; Grup G (Dim): infected and treated animals (diminazene diacetate 7 % at 3,5 mg.kg⁻¹), during five days; Grup H (Prev) or prevention: treated with specific IgY at 10 mg.kg⁻¹ during the five days prior to the infection; Grup I (Tox) or toxicity: uninfected and treated with specific IgY *anti-T. evansi* (10 mg.kg⁻¹) for five days; Grup J (30 mg): animals treated with IgY anti-*T. evansi* (30 mg.kg⁻¹) , during five days (prior infection) and ten days (after de infection).

The animals were daily monitored during 90 days, following the technique described by Silva et al. (2006).

Data analysis

Data from experiments were analyzed by the Student *t* test and by one-way ANOVA, followed by the Tukey test when F was significant ($P < 0.05$)

Results

Total protein concentration

Considering the data obtained between the 4th and 6th and 7th and 10th weeks post-immunization (WPI), among all the chickens, significant difference was observed in protein production after the 7th WPI (Figure 1). Between the 4th and 6th WPI the average yield observed was 5.56 ± 1.5 mg/mL over the 7th and 10th weeks, where the average yield observed was 12.26 ± 2.37 mg/mL [$t(3) = -4.56$; $P < 0.05$]. Throughout the experimental period, the average concentration of total protein was 9.46 ± 1.58 mg/mL. It was observed a significant increase in protein production between the 6th and 7th weeks [$t(3) = -5.61$; $P < 0.05$]. From the 7th week on, the values remained increased until the end of the experiment (10th week).

When the chickens were evaluated separately, at the 4th to 6th weeks, the hens 1, 2 and 3 yielded an average of 7.16 mg/mL ± 2.28 , 3.84 ± 1.02 mg/mL and 6.14 ± 0.82 mg/mL respectively, while from the 7th week their respective average was 10.59 ± 5.03 mg/mL, 11.23 ± 2.09 mg/mL and 14.96 ± 5.66 mg/mL. When evaluating protein production individually, no significant differences were observed among the three hens between the 4th and 6th weeks, as well as between the 7th and 10th weeks ($P > 0.05$).

Gel electrophoresis SDS-PAGE e Western blot

The characterization of IgY was performed by SDS-PAGE and Western blot. By electrophoresis in 10% polyacrylamide, under reducing conditions, it was possible to observe that the three immunized chickens produced a well-stained peptide band, with molecular weight ranging between 75-50 KDa (Figure 2a). The recognition of peptide bands was performed by Western blot, where the IgY antibodies anti-*T.evansi* reacted with secondary antibody conjugated with peroxidase, showing a strong and specific

peptide band, with molecular weight ranging between 75-50 KDa, (heavy chain of IgY) and 25-20 KDa (light chain of IgY) (Figure 2b). The assay in that the antigen was electro transferred to a nitrocellulose membrane, the antigen-antibody reaction was characterized after addition of a secondary antibody. Due to the high concentration of antigen in sample, the reaction was identified immediately below the line of the stacking gel.

Double Radial Immunodiffusion in agarose gel

The samples taken from all immunized chickens responded positively to the presence of the antigen, forming well defined precipitation bands (figure 3). In the wells, where were deposited negative controls (non-immunized chicken sample), no reactivity with the antigen was observed.

ELISA

At all tested dilutions, positive results and producing IgY were observed throughout the study period (figure 4). Significant differences were observed in O.D. at 1:10 dilution between the 4th (1.04 ± 0.26) and 10th weeks (1.56 ± 0.12) [$t(3) = -5.72$; $P < 0.05$]. There was also a significant difference between the 4th (1.20 ± 0.31) and 10th week (1.39 ± 0.22) [$t(3) = -5.04$; $P < 0.05$]. at a dilution of 1:100. In other tested dilutions, no significances were observed ($P > 0.05$).

ELISA avidity

This test aims to determine the strength of binding of the antibody to the antigen at both sites. The analysis of avidity index revealed a significant difference between the antibodies produced on the 4th week (52.53 ± 13.2) compared to those produced on the 10th week (72.58 ± 5.1) at 1:100 dilution [$t(3) = -4.77$; $P < 0.05$]. It was also observed that increasing avidity occurred as the immunizations were performed (figure 5). All chickens showed increased rates of avidity, without statistical difference between

them, in the last week of the experiment. The other dilution showed no significant difference between the 4th and 10th weeks ($P > 0.05$).

IgY anti- T.evansi concentration

It was noted the production of IgY during the whole period (figure 6). There was significant difference between 4th and 10th week at 1:500 dilution. The average production for the period was 2.64 ± 0.15 (4th week) and 2.87 ± 0.14 (10th week) [$t(3) = -4.31$; $P < 0.05$].

In vivo tests

Table 1 shows the results regarding to the pre-patent period, longevity and time of deaths. Among all the *T. evansi* infected groups, it was found statistically significant differences in the pre-patent period for the group J, when compared with all the other groups. While the average detection of the parasite in the bloodstream was 1 to 1.6 days PI, in group J the parasitemia was detected between the 12th and 17th days ($P < 0.05$)

The longevity analysis of all the infected and treated groups showed a statistically significant difference, compared with the positive control group, exception observed for the H group (prevention). The C, D, F and J groups did not control the infection, but significantly increased the longevity of their animals. The H group did not control the infection, showing no increase in its longevity. Only in the groups E and G the parasitemia was fully controlled during the monitoring period, did not occurring recurrence of infection throughout the observation period. Comparison of longevity among rats treated with imidocarb and rats treated with the combination imidocarb + specific IgY, also resulted in a statistically significant difference ($P < 0.05$). The same result was not found between groups E and G, respectively treated with the association of antibody with diminazene aceturate and chemical drug alone ($P > 0.05$). The experimental protocols used in groups C and J resulted in a significant statistical difference between them, which was evidenced by the increase in the pre-patent period and longevity.

Discussion

The experimental production of antibodies depends on a correct immunization protocol. Ferella et al. (2012) tested two immunization protocols in poultry using variable dose of the antigen and the number of immunizations, concluding that the amount and timing of detecting the yolk IgY is dose-dependent. In our study we used the antigen at concentrations above 2×10^7 associated with the FIA, every 14 days. In none of inoculations was observed pain, distress, dermatitis or granulomatous lesions as described by Steiner et al. (1960) e Leenaars et al. (1998). According Stills Jr (2005) the lesions produced by Freund's adjuvants can be minimized by using formulations with limited mycobacterial contents and minimizing total injection site volumes. The fractionation of the total volume of antigen in five different points of inoculations prevented the occurrence of local reactions. Likewise, the range and number of immunizations adopted in this study allowed the detection of yolk IgY after the second immunization and maintenance throughout the experimental period.

In our study, using the method described by Polson et al. (1980), we obtained an average protein yield of 9.46mg/mL. The average obtained in this experiment was similar to that described by Contreras et al. (2005), Malekshahi et al. (2011) and Paula et al. (2011) using PEG-6000 in the same manner as Mendoza et al. (2012) and Vega et al. (2012) which used the technique of precipitation with ammonium sulfate. The protein yield of our sample was higher than those reported by Garcia et al. (2005) and Ferreira Junior et al. (2012), using sodium and ammonium salts to precipitation. Therefore, our results suggest that the method described by Polson et al. (1980) has similar performance than the methods of sodium and ammonium precipitation, the opposite of the findings reported by Bernardo (2009). Additionally, our data are contrary to the results of Schwarzkopf (1994), who claimed that the extraction with PEG 6000 has a lower yield compared to the methods of PEG/ethanol (6.45 mg/mL) and dextransulfate (7.05 mg/mL).

The characterization and specificity of IgY anti-*T.evansi* were confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis and by Western blot. Analyzing the proteins by electrophoresis regarding to the molecular weight, three well marked protein bands were visualized. The recognition of heavy and light chains of IgY was performed after nitrocellulose membrane transfer, where the bands 75-50 KDa and 25-20 KDa were

revealed following the addition of secondary antibody. The presence of other proteins in electrophoresis is common, and depends of the extraction method employed. The molecular weight of the heavy chain found in our study was similar to most studies described in literature (Contreras et al., 2005; Garcia et al., 2005; Malekshahi et al., 2011; Mulvey et al., 2011; Ferella et al., 2012; Vega et al., 2012). There are divergences in the literature as to the weight of light chain. However, our data agree with the findings reported by Garcia et al. (2005), Bernardo (2009), Mulvey et al. (2011), Cai et al. (2012), Ferella et al. (2012 and Vega et al. (2012). The IgY antibodies active against *T. evansi* was also demonstrated by ELISA and Immunodiffusion. Titration of purified egg yolk was made with the objective of quantifying the specific IgY anti-*T. evansi* during the trial period. Thus, our results showed the production of IgY throughout the experimental period. The immunoglobulin production and transfer to egg yolk also occurred steadily during the study. These results confirm the reports of Mohamed et al. (1998) and Morrisson et al. (2001), when referring to transfer of passive immunity in poultry. Although the statistical analysis did not show significant difference from one week to another, it was found that there was considerable difference in the production of IgY between the initial and final periods of the study. The strength of the antigen-antibody was clearly demonstrated by avidity-ELISA, as well as the increase in avidity index was observed as the new immunizations were carried out. This result shows the immunogenic potential of *T. evansi* in the production of antibodies with high avidity. The spectrophotometry of purified sample was performed to quantify the total protein in the yolk egg; however, this method does not identify the specific IgY. The average total protein in our study was similar to findings in Paula et al. (2011), Mendonza et al. (2012) and Vega et al. (2012). We also observed a significant increase in the production of proteins from the 7th week, as reported by Garcia et al. (2005), Ferreira Junior et al. (2012), Mendonza et al. (2012) and Pallaniyappan et al. (2012). The quantification of pure IgY obtained in 10th week was equivalent to 30,33% of the total protein in the sample. These data suggest that the extracted method applied resulted in a considerable degree in the purity of the sample.

In the protocol treatments used in groups C, D, E, F and G, where the rats were infected and treated 24 hours PI, it was observed that the pre patent of all the groups were similar to the positive control group. Analyzing the groups H and J, in which it was performed treatments with specific IgY, at different doses before experimental

infection, we observed that the J group showed statistically higher pre-patent period. Whereas the average life of IgY in the bloodstream ranges between from 36 up to 65 hours (Patterson et al, 1962;. Woolley and Landon, 1995), and that, in both treatments the IgY was administered during all the five days prior to the infection, we found that the dose of 30 mg.kg⁻¹ kept its the plasma levels sufficiently active to prevent the development of the parasite after the infection, which was evidenced by the pre patent $\pm 14.8 \pm 2.1$ days.

Except for group H, all the other treatment protocols, administered in infected animals, differed from the positive control group in longevity. The administration of IgY intraperitoneally for therapeutic purposes was described by Lee et al. (2000), Liou et al. (2010), Zhen et al. (2011) and Feng et al. (2013), however there are no consensus about the dose and duration of treatment. In our study avian IgY was administered at 10 mg.kg⁻¹ (group C) and 30 mg.kg⁻¹ (group J), and we observed that both significantly differed from the control group. However, comparison between these two protocols showed that the dose of 30 mg.kg⁻¹ is significantly higher, regarding to the longevity, if compared with the dose of 10 mg.kg⁻¹. Furthermore, administration of IgY, before and after infection in the animals of group J, resulted in a significant increase in the pre-patent period and longevity, when compared with all other groups. There are reports describing the efficacy of the passive immunization with IgY with prophylactic and therapeutic purposes (Malekshahi et al., 2011; Mulvey et al., 2011; Vega et al., 2012). Our study suggests that prophylaxis strengthens the immune system of the animals against the infection by *T. evansi*, as well as it increases the pre-patent period, while the continuity of the treatment increases the longevity of these animals.

Imidocarb dipropionate is indicated for the prophylaxis and treatment of babesiosis in cattle and horses (Farias, 1998). In our study, an administration similar to the one described by Silva et al (2008), who reached 30 days in longevity in rats, did not control the infection and the animals died between the 12th and 14th day. The drug administration, associated with the specific antibody, increased the survival rate of the animals; however the infection recurred from day 9 PI, leading to the death of all the animals until the 25th day PI. It is important to notice, that in this protocol, when we tested a drug with little therapeutic effectiveness against *T. evansi*, it was evidenced the effect of the avian immunoglobulin on the longevity of infected animals. The comparison between the protocols used in groups E and G (diminazene aceturate)

showed no statistical significant differences between them. Our results correspond to those described by Silva et al. (2008), regarding to the infection control and the longevity, justifying the lack of statistical difference between groups E and G. It can be stated that, in both groups, the infection was controlled by the drug, and it did not allow evaluating the effect of IgY antibodies in group E.

By submitting healthy rats to treatment with IgY (Group I), adverse reactions "in vivo" were not found, maintaining in this group the same experimental behavior when compared with the negative control group.

Conclusion

The immunizing protocol used in this assay resulted in the detection of antibodies after the second immunization. The extraction method used is of low cost, easy to perform, allowing the extraction of samples with considerable purity. Chickens immunized against *T. evansi* are capable of producing highly avid antibodies against the parasite. The administration of these antibodies intraperitoneally, at a dose of 10 mg.kg⁻¹, showed no prophylactic action, and did not control the infection; however it increased the longevity, when combined with the treatment with anti-hematozoa drugs. At 30 mg.kg⁻¹, administered prophylactically and after the experimental infection, it promoted an increased pre patent period and longevity in the infected animals. Association between anti-*T. evansi* antibodies and pharmacological treatment, strengthens the immune system of the infected animals, increasing longevity, as well as developing a better therapeutic response to the treatment.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Doctors Everton Fagonde da Silva, Fabio Pereira Leivas Leite and Odir Antonio Dellagostin, coordinators of Biotechnology Center, Universidade Federal de Pelotas, for the guidance and technical support to carry out our tests in their laboratories. To Gustavo Marçal Schimidt Garcia Moreira, Maria Elizabeth Aires Berne, and Carmen Lucia Garcez Ribeiro the technical assistance. Also, we thank to financial support to CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa.

References

- Aquino, L.P.C.T., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Marques, L.C., Castro, M.B., Malheiros, E.B., 1999. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Mem I Oswaldo Cruz* 94, 255-60.
- Bernardo, A.R., 2009. Tecnologia IgY: Produção de anticorpos aviários para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com o uso ético dos animais de experimentação. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 60p.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brandão, L.P., Larsson, M.H.M.A, Birgel, E.H., Hagiwara, M.K., Ventura, R.M., Teixeira, M.M.A., 2002. Infecção natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – Relato de caso. *Clínica Vet* 36, 23-26.
- Brun, R., Hecker, H., Lun, Z.R., 1998. *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet Parasitol* 79, 95-107.
- Cai, Y.C., Guo, J., Chen, S.H., Tian, L.G., Steinmann, P., Chen, M.X., Li, H., Ai, L., Chen, J.X., 2012. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int* 61, 385-390.

Carlander, D., Kollberg, H., Larsson, A., 2002. Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. *BioDrugs* 16, 433-437.

Colpo, C.B., Monteiro, S.G., Stainki, D.R., Colpo, E.T.B., Henriques, G.B., 2005. Infecção Natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. *Cienc Rural* 35, 717-719.

Contreras, V.T., Lima, A.R., Navarro, A.C., Arteaga, R.Y., Graterol, D., Cabello, L., Farias, M., 2005. Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas com epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista F.C.S.* 9, 21-27.

Darling, S.T., 1910. Equine trypanosomiasis in the canal zone. *B Soc Pathol Exot* 3, 381-385.

Farias, N.A., 1998. Doenças parasitárias - Babesiose eqüina. In: Correa, F.R., Shild, A.L., Mendez, M. D.C. Doenças de ruminantes e eqüinos. Pelotas: UFPel, pp. 356-360.

Feng Y., Liu, W., Shi, D., 2013. Effectiveness of Egg Yolk Antibody Against Shiga Toxin II Variant Toxicity In Vitro and In Vivo. *Curr Microbiol* 67, 448–453.

Ferella, A., Bellido, D., Chacana, P., Wigdorovitz, A., Dus Santos, M.J. Mozgovej, M.V., 2012. Chicken egg yolk antibodies against bovine respiratory syncytial virus neutralize the virus in vitro. *Procedia in Vaccinology* 6, 33-38.

Ferreira Junior, A., Santiago, F.M., Silva, M.V., Ferreira, F.B., Macêdo Júnior, A.G., 2012. Production, Characterization and Applications for *Toxoplasma gondii*-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. *PloS ONE* 7.

Garcia, D.A., Nicholls, R.S., Arévalo, A., Torres, O., Duque, S., 2005. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados em gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. *Biomédica* 25, 451-463

Herrera, H.M., Norek, A., Freitas, T.P.T., Rademaker, V., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2005. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitol Res* 96, 121-126.

Hoare, H.E., 1972. *The trypanosomiasis of mammals: A zoological monograph*. Oxford: Blackwell, p.555-593.

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

Lee, S.B., Mine, Y., Stevenson, R.M.W., 2000. Effects of Hen Egg Yolk Immunoglobulin in Passive Protection of Rainbow Trout against *Yersinia ruckeri*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 110-115.

Leenaars, P., Koedam, M., Wester, P., Baumans, V., Claassen, E., Hendriksen, C.F., 1998. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. *Lab Anim* 32, 387-406.

Levine, N.D., 1973. Protozoan parasites of domestic animals and man. 2. ed. Minneapolis: Burgers, 48-49.

Liou, J.F., Chang, C.W., Tailiu, J.J., Yu, C.K., Lei, H.Y., Chen, L.R., Tai, C., 2010. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. *Vaccine* 28, 8189-8196.

Lonsdale-Eccles, J.D., Grab D.J., 2002. Trypanosome hidrolases and the blood-brain barrier. *Trends Parasitol* 18, 17-19

Malekshahi, Z.V., Gargari, S.L.M., Rasooli, I., Ebrahimizadeh, W., 2011. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. *Microbial Pathogenesis* 51, 66-372.

Masocha, W., Rottenberg, M.E., Kristensson, K., 2007. Migration of African Trypanosomes across the blood-brain barrier. *Phy. Beh* 92, 110-114

Mendonza, J.C., Vivas, D., Rodríguez, E., Inga, R., Sandoval, G., Lazo, F., Yarlequé, A., 2012. Eficácia experimental de anticuerpos IgY producidos em huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Botrops atrox*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 29, 69-75

Mohammed, S.M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K.R., Wildeman, A .G., Bonselaar, J., Etches, R.J., 1998. Deposition of genetically engineered humam antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology* 4, 115-125.

Morrison, S.L., Mohammed, S.M., Wims, L.A., Trinh, R., Etches, R., 2001.

Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol Immunol* 38, 619-625.

Mulvey, G.L., Dingle, T.C., Fang, L., Strecker, J., Armstrong, G.D., 2011. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 60, 1181-1187.

Nunes, V.L B., Oshiro, E.T., Dorval, M E C., Garcia, L.A.M., Silva, A.A P., Bogliolo, A R., 1993. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma* (Trypanozoon) evansi no pantanal sul-matogrossense. Estudo de reservatórios. *Rev Bras de Parasitol* 2, 41-44.

Olovsson, M., Larsson, A., 1993. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. *Comp Immunol Microb* 16, 145-152.

Palaniyappan, A., Das, D., Kammila, S., Suresh, M.R. Sunwoo, H.H., 2012. Diagnostic of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapside antigen using chicken immunoglobulin Y. *Poultry Sci* 91, 636-642.

Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O., Dixon, F.J., 1962. Antibody Production and Transfer to Egg Yolk in Chickens. *J Immunol* 89, 2722-2728.

Paula, V.S., Silva, A.S., Vasconcelos, G.A.L.B.M., Iff, E.T., Silva, M.E.M., Kappel, L.A., Cruz, P.B., Pinto, A.A., 2011. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *J Virol Methods* 171, 102-106.

Pauly, D., Chacana, P.A, Calzado, E.G., Brembs, B., Schade, R., 2011. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J Vis Exp* 51, 1-5.

Peregrine, A.S., Mamman, M., 1993. Pharmacology of Diminazene: a review. *Acta Trop* 54, 185-203.

Polson, A., Von Vechmar, M.B., Van Regenmortel, M.H., 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun* 9, 475-93.

Rodrigues, A., Figuera, R.A., Souza, T.M., Schild, A.L., Soares, M.P., Milano, J., Barros, C.S.L., 2005. Outbreaks of Trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. *Pesquisa Vet Brasil* 25, 239-249.

Schade, R., Calzado, E.G., Sarmiento, R., Chacana, P.A., Asplund, J.P., Terzolo, H.R., 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 33, 1-26.

Schwarzkopf, C., Staak, C., Behn, I., Erhard, M. Immunisation. 1994 In: Schade, R.; Behn, I.; Erhard, M. Hlinak, A.; Staak, C. 2001. Chicken egg yolk antibodies, production and application IgY-technology. Berlin. Springer, p. 25-64.

Silva, A.S., Doyle, R. L., Monteiro, S.G., 2006. Métodos de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitos em ratos e camundongos. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia* 13, 83-87.

Silva, A.S., Tochetto, C., Zanette, R.A., Pierezan, F., Rissi, D.R., Santurio, J.M., Monteiro, S.G., 2008. Diminazene aceturate and imidocarb dipropionate in the control of *Trypanosoma evansi* infection in *Rattus norvegicus* experimentally infected. Cienc Rural 38, 1357-1362.

Silva, R.A.M.S., Seidl, A., Ramirez, L., Dávila, A.M.R., 2002. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia diagnóstico e controle, EMBRAPA. Corumbá, MS, Brazil, 137p.

Silva, R.A.M.S., Sanchez, V., Dávila, A.M.R., 2003. Metodologia da Criopreservação dos *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*. Embrapa Pantanal Corumbá, 2p.

Staak, C., Schwarzkopf, C., Behn, I., Hommel, U., Hlinak, A., Schade, R., Erhard, M., 2001. Isolation of IgY from yolk. In: Schade, R.; Behn, I.; Erhard, M.; Hlinak, A.; Staak, C., 2001. Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY technology. Berlin. Springer, p.65-10.

Steiner, J.W., Langer, B., Schatz, D.L., 1960. The local and systemic effects of Freund's adjuvant and its fractions. Arch. Pathol. 70, 42-424.

Stills, H.F. Jr., 2005. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. ILAR J 46, 280-293.

Svendsen, L.B., Crowley, A., Stodulski, G., Hau, J., 1996. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity

development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J Immunol Methods* 191, 113-120.

Tini, M., Jewell, U.R, Camenisch, G., Chilov, D., Gassmann, M., 2002. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Phys A* 131, 569-574.

Vega, C.G., Bok, M., Vlasova, A.N., Chatta, K.S., Fernández, F.M., Wigdorovitz, A., Parrenõ, V.G., Saif, L.J., 2012. IgY Antibodies Protects against Human Rotavirus Induced Diarrhea in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Disease Model. *Plos ONE* 7.

Wolkmer, P., Silva, A.S., Cargneelutti, J.F., Costa, M.M., Traesel, C.K., 2007. Resposta eritropoiética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. *Ciência Rural* 37, 1682-1687.

Woolley, A., Landon, J., 1995. *J. Immunol. Methods* 178, 253-265

Zhen, Y.H., Fang, R., Ding, C., Jin, L.J., Li, X.Y., Diao, Y.P., Shu, X.H., Ma, X.C., Xu, Y.P., 2011. Efficacy of specific IgY for treatment of lipopolysaccharideinduced endotoxemia using a mouse model. *J Appl Microbiol.* 11, 1524-1532.

Legends of figures

Figure 1. Total protein concentration obtained by photometry at 280 nm. Five doses of antigen were given at 14 day intervals with the production of total protein assessed for 70 days. The values were obtained using 1:50 dilution of samples purified by the PEG-6000.

Figure 2. (A) Electrophoresis in polyacrylamide gel (10%) under reducing conditions, stained with Coomassie Blue R250 reagent (Bio-Rad) from samples of three immunized hens. **(B)** immunoblot showing the recognition of IgY after addition of secondary antibody conjugated with peroxidase. In the center, the scale of molecular weight expressed in kDa.

Figure 3. Immunodiffusion in agarose gel. (A) Central wells filled with antigen; cavities 1, 3 and 5 with the negative control; wells 2, 4 and 6 filled with extracted samples (IgY). (B) Characterization of the antigen antibody reaction through the formation of precipitation lines.

Figure 4. Kinetics of the immune response in hens immunized with *T. evansi* and detected by ELISA. The optical density values obtained were expressed at dilution of 1:100 of samples purified by PEG-6000, from the egg yolk of immunized hens.

Figure 5. Avidity index (AI) of IgY antibodies produced during immunization of the hens with *T. evansi* antigens. AI<40% were considerate of low avidity; AI between 41 and 70% represnted a medium avidity; and AI> 70% was considered as high avidity.

Figure 6. Kinetics of specific IgY production of anti-*T. evansi* detected by the Coomassie Blue method. The values were obtained by photometry at 595 nm.

Table 1. Pre-patent period, longevity and mortality of different treatments throughout the experimental period.

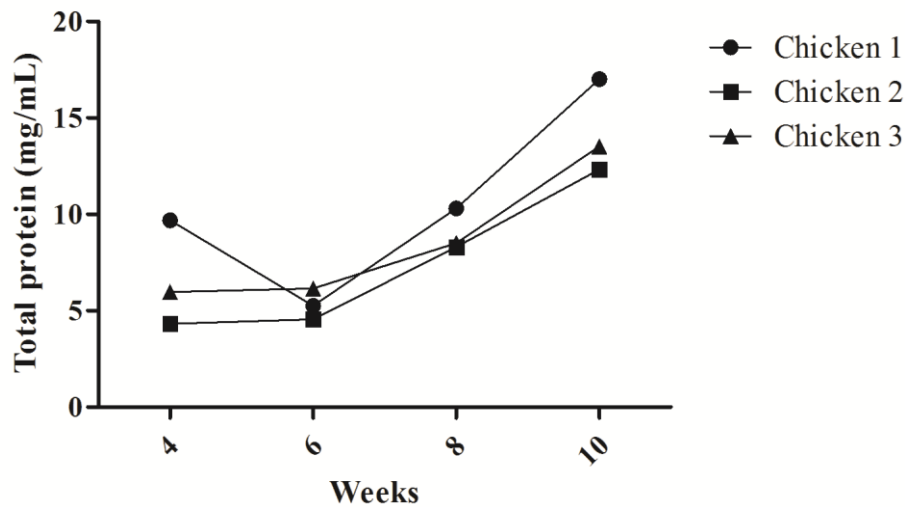


Figure 1. Total protein concentration obtained by photometry at 280 nm. Five doses of antigen were given at 14 days intervals with the production of total protein assessed for 70 days. The values were obtained using 1:50 dilution of samples purified by the PEG-6000.

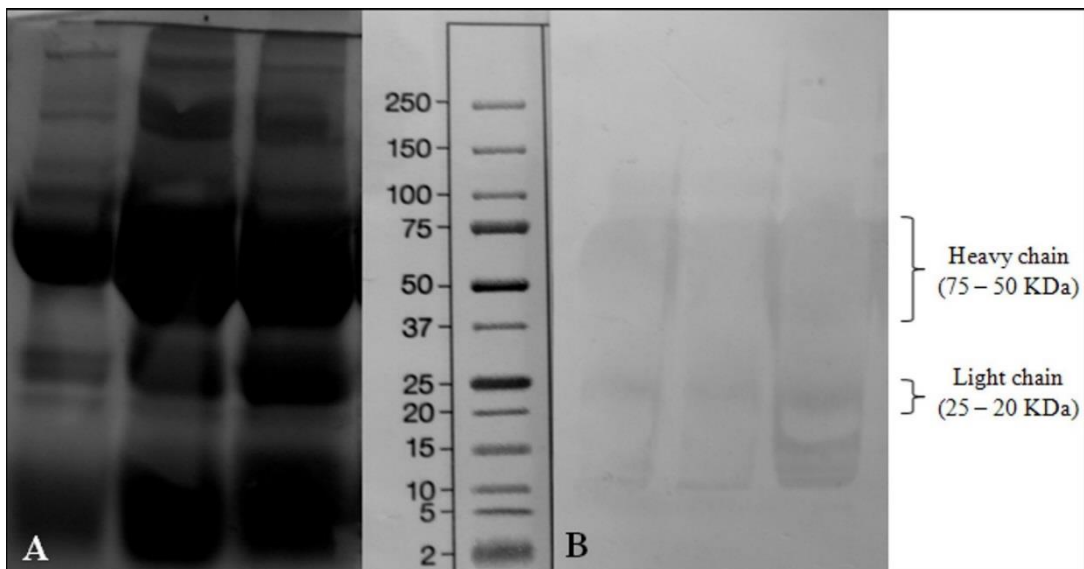


Figure 2. (A) Electrophoresis in polyacrylamide gel (10%) under reducing conditions, stained with Coomassie Blue R250 reagent (Bio-Rad) from samples of three immunized hens. **(B)** immunoblot showing the recognition of IgY after addition of secondary antibody conjugated with peroxidase. In the center, the scale of molecular weight expressed in kDa.

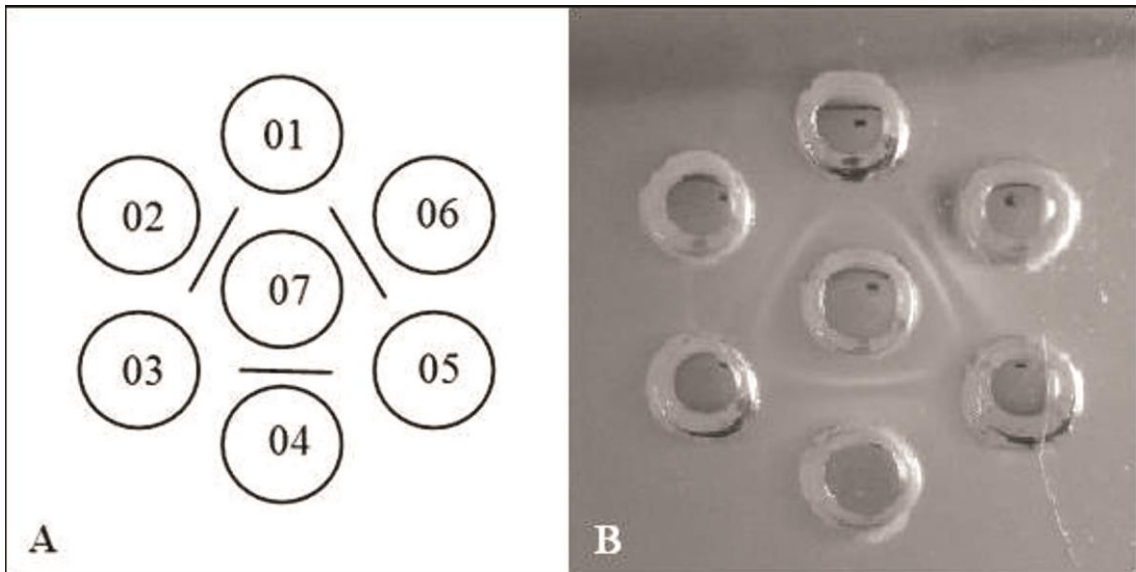


Figure 3. Immunodiffusion in agarose gel. (A) Central wells filled with antigen; cavities 1, 3 and 5 with the negative control; wells 2, 4 and 6 filled with extracted samples (IgY). (B) Characterization of the antigen antibody reaction through the formation of precipitation lines.

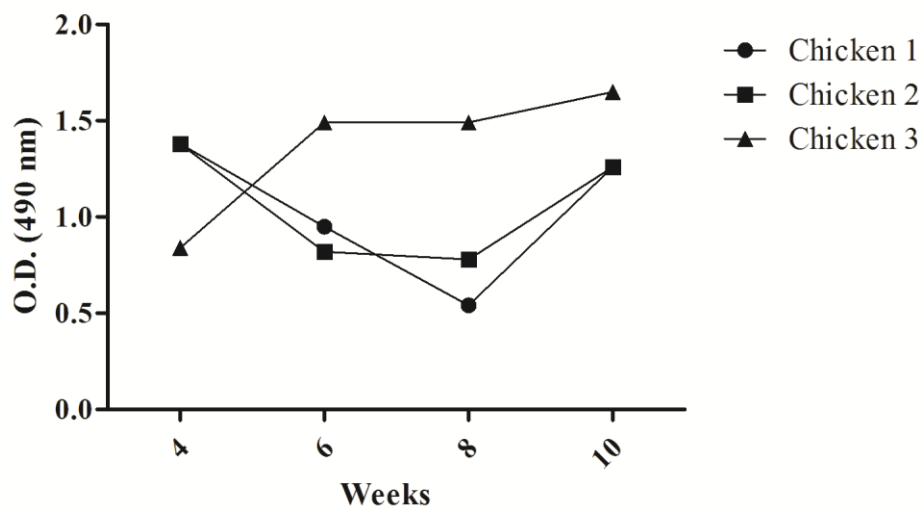


Figure 4. Kinetics of the immune response in hens immunized with *T. evansi* and detected by ELISA. The optical density values obtained were expressed at dilution of 1:100 of samples purified by PEG-6000, from the egg yolk of immunized hens.

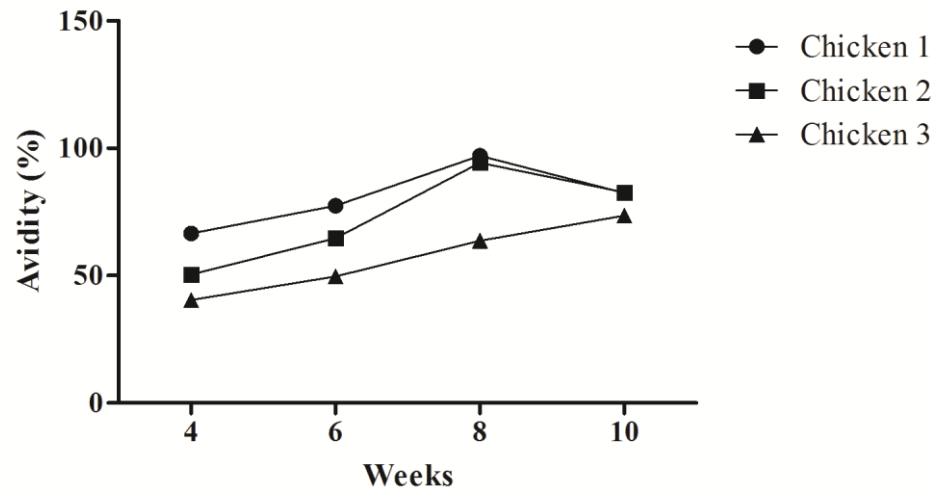


Figure 5. Avidity index (AI) of IgY antibodies produced during immunization of the hens with *T. evansi* antigens. AI < 40% were considered of low avidity; AI between 41 and 70% represented a medium avidity; and AI > 70% was considered as high avidity.

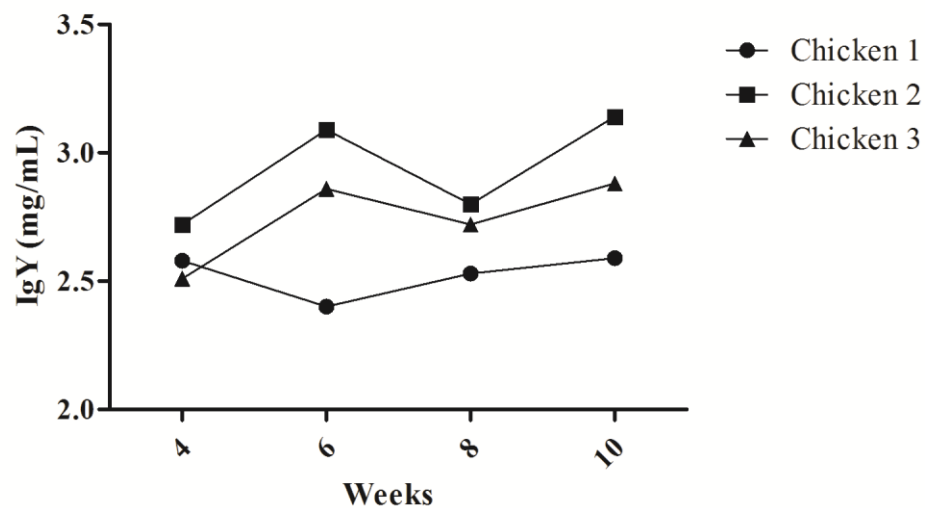


Figure 6. Kinetics of specific IgY production of anti-*T. evansi* detected by the Coomassie Blue method. The values were obtained by photometry at 595 nm.

Table 1. Pre-patent period, longevity and mortality of different treatments throughout the experimental period.

Groups (n=6)	Treatment	Prepatent Period (day)	Longevity (day)	Mortality (n) for periods (day)								
				5	10	15	20	25	30	60	90	
A	Positive control	1.0 ^a (± 0.0)	4.3 ^a (± 0.5)	4/6	6/6							
B	Negative control			0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
C	IgY	1.1 ^a (± 0.4)	11.3 ^b (± 1.3)	0/6	0/6	6/6						
D	IgY-Imidocarb	1.3 ^a (± 0.8)	22.8 ^c (± 1.3)	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	6/6			
E	IgY-Diminazene	1.0 ^a (± 0.0)	90.0 ^d (± 0.0)	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
F	Imidocarb	1.0 ^a (± 0.0)	13.0 ^b (± 1.2)	0/6	0/6	6/6						
G	Diminazene	1.0 ^a (± 0.0)	90.0 ^d (± 0.0)	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
H	Preventive	1.6 ^a (± 0.8)	4.8 ^a (± 2.0)	5/6	6/6							
I	Toxicity			0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
J	30 mg	14.8 ^b (± 2.1)	28.0 ^c (± 1.0)	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	6/6		

Means followed by the same letters in the same column do not differ statistically from each other at 5% probability by Tukey test

4 DISCUSSÃO

Estudos envolvendo a produção, extração e purificação de anticorpos policlonais aviários como recurso diagnóstico e terapêutico nas mais diversas enfermidades, tem despertado o interesse dos pesquisadores nas últimas décadas. A quantidade e qualidade do anticorpo produzido é dependente do adjuvante utilizado, intervalo e tempo de inoculações e sobretudo da técnica de extração utilizada a partir da gema do ovo (FERELLA et al., 2012). Em nosso estudo, a administração do antígeno associado ao adjuvante incompleto de Freund, em intervalos de 14 dias, em um total de 5 inoculações resultou na obtenção de imunoglobulinas anti *T. evansi* a partir da 4ª semana, atingindo as maiores concentrações a partir da 7ª semana. Em nenhuma das inoculações foi observado dor, desconforto, dermatite ou lesão granulomatosas conforme descrições de Steiner et al (1960) e Leenars et al (1998). De acordo com Stills Jr (2005) as lesões produzidas pelos adjuvantes podem ser minimizadas através do uso de formulações com uso limitado de microbactérias e menor volume do conteúdo injetado no sítio de inoculação. O fracionamento do volume total de antígeno em cinco diferentes pontos de inoculação preveniu a ocorrência de reações locais. A dose e intervalo entre as imunizações adotada neste estudo também permitiram a detecção da IgY anti-*T.evansi* a partir da segunda imunização. Nossos resultados concordam com as constatações de Ferella et al. (2012) ao afirmar que a concentração da imunoglobulina produzida é dose-dependente e a especificidade aumenta à medida que são realizadas as inoculações.

Embora as técnicas de precipitação não apresentem rendimento comparável as técnicas cromatográficas e de ultra filtração em relação a quantidade, pureza e atividade biológica desejada (KIM & NAKAI, 1998; MEULENAER & HUYGHEBAERT, 2001), em nosso estudo, usando o método descrito por Polson et al. (1980), obtivemos em média 9,46 mg/mL de proteína total e 2,87 mg/mL de imunoglobulina específica anti-*T.evansi*. A média obtida neste experimento foi similar aos valores descritos por Contreras et al. (2005) Malekshahi et al. (2011) e Paula et al. (2011) usando PEG-6000, assim como Mendoza et al. (2012) e Vega et al. (2012) ao usarem a técnica de precipitação com sulfato de amônio. O rendimento proteico de nossas amostras foi superior aos encontrados por Garcia et al. (2005) e Ferreira Junior et al (2012) ao

utilizarem sais de sódio e amônio para precipitação. Nossos resultados sugerem que o método descrito por Polson et al. (1980) tem rendimento proteico similar aos métodos de precipitação com sulfato de sódio e sulfato de amônio, contrariando os achados de Schwarzkopf (1994) (apud STAAK et al., 2001) e Bernardo (2009).

A purificação e caracterização da imunoglobulina extraída através das técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot identificaram cadeias pesadas com peso molecular similar a maioria dos resultados descritos na literatura (CONTRERAS et al., 2005; GARCIA et al., 2005; MALEKSHAHI et al., 2011; MULVEY et al., 2011; FERELLA et al., 2012; VEGA et al., 2012). Embora haja divergências com relação ao peso molecular das cadeias leves, nossos resultados confirmaram os achados descritos por Garcia et al. (2005), Bernardo (2009), Mulvey et al. (2011), Cai et al. (2012), Ferella et al. (2012) e Vega et al. (2012).

A atividade funcional do anticorpo aviário ficou bem demonstrada através do ELISA, ELISA avidéz e da formação das bandas de precipitação resultantes da reação antígeno anticorpo na reação de imunodifusão radial em gel de agarose, confirmando os relatos de Contreras et al. (2005) e Schade et al. (2005) ao referirem-se a especificidade e avidéz dos anticorpos produzidos. Observamos ainda o incremento gradativo do índice de avidéz a medida que as imunizações eram realizadas. A detecção das imunoglobulinas a partir da 4ª semana pós imunização, a constatação de que as maiores concentrações de proteína total e IgY específica são obtidas a partir da 7ª semana e que a produção destes anticorpos foi constante durante todo o período experimental confirmam os relatos de Mohamed et al. (1998) e Morrison et al. (2001) ao referirem-se a transferência de imunidade passiva em aves.

Segundo Castaño e Gómez-Lechón (2005) os testes de toxicidade devem ser realizados para testar riscos potenciais de novos produtos sobre a saúde de humanos e animais, principalmente quando produzidos com fins terapêuticos. Testes *in vitro* utilizando cultura de células de linfócitos humanos permitem avaliar os efeitos sobre a estrutura e fisiologia celular (ROGERO et al., 2003). Ao colocarmos os anticorpos IgY em contato direto com cultura de células de mamíferos, nenhuma alteração anatômica, fisiológica e da viabilidade celular foi constatada, o que os tornam biocompatíveis para uso na biomedicina. Testes de genotoxicidade são importantes para avaliação de danos ao material genético, com conseqüente indução de carcinogênese e impactos na reprodução celular (DOAK et al., 2011). Ao submetemos as imunoglobulinas IgY ao teste de instabilidade cromossômica e índice

mitótico, não foram observadas alterações da estrutura do DNA e da reprodução celular. Também não constatamos formação de radicais livres de oxigênio pelo teste TBARS. A formação de peróxidos lipídicos resulta na ruptura das membranas celulares, mutações do DNA, oxidação dos lipídeos insaturados e formação de resíduos químicos (VAJDOVICH, 2008).

Nos testes *in vivo*, ao avaliarmos a ação profilática destes anticorpos nas doses de 10 mg.kg⁻¹ e 30 mg.kg⁻¹, observamos que na maior dose o período pré-patente foi superior estatisticamente. Considerando que a vida média da IgY na circulação sanguínea varia entre 36 a 65 horas (PATTERSON et al., 1962; WOOLLEY e LANDON, 1995) e que em ambos os tratamentos a IgY foi administrada durante os cinco dias anteriores à infecção, constatamos que a dose de 30 mg.kg⁻¹ manteve níveis plasmáticos suficientes para impedir o desenvolvimento do protozoário logo após infecção, o que ficou evidenciado pelo período pré patente de 14.8 ± 2.1 dias.

Com exceção do grupo que recebeu somente a dose de 10 mg.kg⁻¹ cinco dias antes da infecção experimental, todos os demais protocolos de tratamento administrados em ratos infectados, diferiram estatisticamente do grupo controle positivo em relação a longevidade. A administração de imunoglobulinas IgY por via intraperitoneal com fins terapêuticos é descrita por Lee et al. (2000), Liou et al. (2010), Zhen et al. (2011) e Feng et al. (2013), entretanto não há um consenso em relação a dose administrada e duração do tratamento com estes anticorpos. Em nosso estudo foi administrado IgY aviária nas doses de 10 mg.kg⁻¹ e 30 mg.kg⁻¹, e constatamos que ambas diferiram significativamente do grupo controle. Igualmente, a longevidade do grupo que recebeu a dose de 30 mg.kg⁻¹ foi significativamente superior em relação ao grupo que recebeu a menor dose. Atribuímos a diferença de longevidade entre os dois grupos principalmente devido a continuidade da administração do anticorpo em seguida a infecção experimental, protocolo usado somente no grupo que recebeu 30 mg.kg⁻¹. Relatos descrevem a eficácia da imunização passiva com anticorpos IgY com fins profiláticos e terapêuticos (MALEKSHAHI et al., 2011; MULVEY et al., 2011; VEGA et al., 2012). Nosso estudo sugere que a profilaxia reforça o sistema imunológico dos animais frente a infecção pelo protozoário e aumenta o período pré-patente; e, a continuidade do tratamento aumenta a longevidade destes animais.

Dipropionato de imidocarb é indicado para profilaxia e tratamento de babesioses em bovinos e equinos (FARIAS, 1998). Em nosso estudo, a administração de protocolo semelhante ao descrito por Da Silva et al. (2008), que obteve 30 dias de

longevidade em ratos, não controlou a infecção e os animais vieram a óbito entre o 12º e 14º dia. A administração da droga associada ao anticorpo específico aumentou a sobrevivência dos animais, mas houve recidiva a partir do 9º dia pós infecção e a morte de todos os ratos até o 25º dia. Neste protocolo, ao testarmos uma droga com pouca eficácia terapêutica contra o *T. evansi*, ficou evidenciado o efeito das imunoglobulinas aviárias sobre a longevidade de animais infectados.

A comparação entre o grupo tratado com aceturato de diminazene e o grupo tratado com a associação anticorpo-aceturato de diminazene, não mostrou diferença estatística significativa entre eles. Nossos resultados coincidem aos descritos por Da Silva et al. (2008) em relação ao controle da infecção e longevidade, e justificam a ausência de diferença estatística entre os grupos. Pode-se afirmar que em ambos os grupos a infecção foi controlada pelo fármaco, não sendo possível avaliar o efeito dos anticorpos IgY.

5 CONCLUSÃO

O protocolo de imunização e técnica de extração usados neste estudo resultaram na detecção de anticorpos IgY anti *T.evansi* a partir da segunda inoculação. Galinhas imunizadas contra *T. evansi* produziram anticorpos funcionais específicos e de alta avidéz contra o protozoário.

Ao serem submetidas a testes de toxicidade *in vitro*, as imunoglobulinas IgY não mostraram danos em membrana celular de linfócitos humanos, não interferiram na viabilidade celular e não produziram alterações no DNA em nível cromossômico;

não apresentando portanto, citotoxicidade e genotoxicidade, nas concentrações testadas. A concentração de 10 mg/mL teve um efeito proliferativo, sendo está proliferação de células normais, evidenciada pelo teste de instabilidade cromossômica, resultado este que pode ser verificado no teste de viabilidade celular e índice mitótico.

Nos testes *in vivo*, a administração destes anticorpos, por via intraperitoneal, na dose de 10 mg.kg⁻¹, não apresentou ação profilática e não controlou a infecção, mas aumentou a longevidade quando associada ao tratamento com fármacos anti-hematozoários. A dose de 30 mg.kg⁻¹, administrada profilaticamente e após a infecção experimental, promoveu aumento do período pré patente e longevidade em ratos infectados com *T. evansi*. A associação de anticorpos anti *T. evansi* ao tratamento farmacológico reforçou o sistema imunológico de animais infectados, aumentando a longevidade, desenvolvendo uma melhor resposta terapêutica ao tratamento instituído.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS, L. G. Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horse. **Research in Veterinary Science**, v. 31, p. 54-61, 1981

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

ANOSA, V. O.; KANEKO, J. J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): light and electron microscopic studies on erythrocyte pathologic changes and phagocytosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 4, p. 645-651, 1983.

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

AQUINO, L.P.C.T. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p.255-260, 1999

BAJYANA SONGA, E. et al. The use of the card agglutination test (Testryp Catt) for the serodiagnosis of *T. evansi* infection. **Annales des Societes Belges de Medicine Tropicale de Parasitologie et de Mycologie**, v. 67, p. 51-7, 1987.

BARRIGA, O.O. The class mastigophora or flagellates. In:____. **Veterinary parasitology for practioners**. 2. ed. Minessota: Burgers International Group, cap. 25, p. 1-25, 1997.

BATISTA, J. S. et al. Trypanossomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 174-181, 2007

BATISTA, J. S. et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.v. 28, p. 63-69, 2008

BAZZOLI, R. S. et al. Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 18, n. 2, p. 148-152, 2002.

BEZERRA, F. S. B. et al. Aspectos clínicos e reprodutivos da infecção natural por *Trypanosoma vivax* em bovinos leiteiros no Alto Sertão da Paraíba. In: **Congresso Nordestino de Produção Animal**, Petrolina. PB, p. 1135-1137, 2006

BELLOLI et al. Pharmacokinetics of imidocarb dipropionate in horses after intramuscular administration. **Equine Veterinary Journal**, v.34, p. 625-629, 2002.

BERNARDO, A.R. **Tecnologia IgY: Produção de anticorpos aviários para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com o uso ético dos animais de experimentação**. 2009. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2009

BIZANOV, G.; JONASKIEN, I. Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 47, n. 1, p. 403-410, 2003.

BORST, P. et al. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 23, p. 31-38, 1987.

BOYT, W. P. **A Field guide for diagnosis, treatment and prevention of African animal Trypanosomiasis**. [S.I.]: **FAO**, 139 p., 1986.

BRANDÃO, J. P. et al. Natural infection by *Trypanosoma evansi* em dog – Case report. **Clínica Veterinária**, v. 36, p. 23-26, 2002.

BROWNING, C.H. The trypanocidal action of certain phenanthridinium compounds. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 46, p.203-204, 1938.

BRUN, R. et al. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 95-107, 1998.

BURLEY, R.W.; COOK, W.H. Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituents alpha and beta-lipovitellins. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 1295-1307, 1961

CAI, Y. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens

of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, v. 61, p. 385-390, 2012.

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

CARREIRA, J.C. Sanguessugas podem transmitir o Mal de Cadeiras, doença de eqüinos que tem grande importância econômica no Brasil, 2005. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/sanguessuga_adr.htm. Acesso em 10 nov. 2012.

CASTAÑO, A.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 695-705, 2005.

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

CHACANA, P.A. et al. Tecnologia IgY e aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v. 85, n. 2, p. 179-189, 2004.

CIRIACO, E. et al. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). **Microscopy Research and Technique**, United States, v. 62, n. 6, p.482-487, 2003.

COLPO, C. B. et al. Infecção Natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 717-719, 2005.

CONNOR, R. J.; VAN DEN BOSSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press, 2004. v. 1. cap. 12, p. 251-296.

CONRADO, A. C. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 928-931, 2005.

CONTRERAS, V. T. et al. Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas com epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. **Salus online**, v.9, n. 2, p.33-44, 2005

DARLING, S. T. Equine trypanosomiasis in the canal zone. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique** v. 3, p.381-385, 1910.

DA SILVA, A. S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 373-376, 2007.

DA SILVA, A. S. et al. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1357-1362, ago, 2008.

DEIGNAN, T. et al. Comparative analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. **Food Agricultural Immunology**, United States, v. 12, n. 1, p. 77-85, 2000.

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

DOAK, S.H. et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. **Mutation Research**, v. 745, p. 104-111, 2011.

DOLAN, R.B. et al. Homidium bromide as a chemoprophylactic for cattle trypanosomiasis in Kenya. **Acta Tropica**, Kenya, v.47, p.137-144, 1990

DUNN, L. H. Experiments in the transmission of *Trypanosoma hyppicum* Darling with the vampire bat, *Desmodus rotundus* Wagner, as a vector in Panama. **Journal Preventive Medicine**, v. 6, p.415-24, 1932.

FALLIS, A. M. Discoverer of the first pathogenic trypanosome - Griffith Evans 1835-1935. **Canadian Veterinary Journal**, v. 27, p. 336-338, 1986.

FARIAS, N.A. Doenças Parasitárias – Babesiose equine. In: CORREA, F.R; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C. **Doenças de Ruminantes**. Pelotas, UFPel, p. 356-360.

FENG, Y.; LIU, W.; SHI, D. 2013. Effectiveness of Egg Yolk Antibody Against Shiga Toxin II Variant Toxicity In Vitro and In Vivo. **Current. Microbiology**, v. 67, p. 448–453, 2013.

FERELLA, A. et al. Chicken egg yolk antibodies against bovine respiratory syncytial virus neutralize the virus *in vitro*. **Procedia in Vaccinology**, v. 6, p. 33-38, 2012.

FERREIRA JÚNIOR, A. et al. Production, Characterization and Applications for *Toxoplasma gondii*-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. **PLoS ONE** v.7, n. 7, 2012.

FRANCISCATO, C. et al. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 288-291, 2007.

FRANKE, C. R. et al. Investigation on naturally occurring *T. evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v. 58, n. 2, p. 159-69, 1994.

FORD, E.J.H et al. Studies on ethidium bromide. The treatment of early *T. vivax* infections in cattle. **Veterinary Record**, v. 65, p.589-590, 1953.

GARCIA, D. A. et al. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados em gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. **Biomédica**, v. 25, p. 451-463, 2005.

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

HAROUN, E. M. et al. A preliminary comparative study on the efficacy of quinapyramine sulphate/chloride and melarsoprol in rats, experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.6, n.4, p.215-221, 2003.

HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 263-275, 2004.

HERRERA, H. M. et al. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristin area of the Brazilian Pantanal region. **Parasitology Research**, v. 96, n. 2, p. 121-126, 2005.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph.** Oxford: Blackwell, p.555-593, 1972.

HORNIBY, H. E. Animal trypanosomiasis in eastern Africa. **H. M. Stationery Office,** p. 10-11, 1953. p.

JAIN, N.C. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. **Essentials of veterinary hematology.** Philadelphia: Lea & Febiger, cap.10, p.177-192, 1993.

JARADAT, Z.W. & MARQUARDT, R.R. Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. **Food and Agricultural Immunology,** United States, v.12, n.4, p.263-272, 2000.

JENINGS, F. W. et al. The relationship between duration of infection with *T. brucei* in mice and the efficacy of chemotherapy. **Parasitology,** v. 75, p. 145-153, 1977.

JOHNSON, C. M. A natural infection of *Trypanosoma hippicum* Darling in the vampire bat *Desmodus rotundus murinus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v.16 p. 59-62, 1936.

JOSHI, P. P. et al. Human Trypanosomosis Caused by *Trypanosoma evansi* in India: The First Case Report. **American of Journal Tropical Medicine and Hygiene,** v. 73, n. 3, p. 491-495, 2005.

KARLSSON, M.; LARSSON, A.; KOLLBERG, H. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal,** v.60, p. 341-348, 2004.

KIM, H., NAKAI, S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. **Journal of Food Science,** United States, v. 63, p. 485–490, 1998.

KOVACS-NOLAN, J., PHILLIPS, M., MINE, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.,** v. 53, n. 22, p.8421-8431, 2005

KUBIAK, G. V. L.; MOLFI, A. Tripanosomíase eqüina (Mal das Cadeiras). Boletim n.33. **Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná.** Tip. João Haupt & Cia. Ltda. – Curitiba, 51p., 1954.

LANHAM, S. M.; GODFREY, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. **Experimental Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 521-534, 1970.

LEACH, T.M. Studies on ethidium bromide. The prophylactic properties of the drug. **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, p.130-142, 1955.

LEE, J.et al. Stability of orally administered immunoglobulin in the gastrointestinal tract. **Journal of Immunological Methods**, v.384, p. 143-147, 2012.

LEE, K.A. et al. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Korea (South), v. 35, n. 5, p. 488-493, 2002.

LEE, S.B.; MINE, Y.; STEVENSON, R.M.W. Effects of Hen Egg Yolk Immunoglobulin in Passive Protection of Rainbow Trout against *Yersinia ruckeri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.110-115, 2000.

LEENAARS, P. et al. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. **Laboratory Animals**, v.32, p.387-406, 1998.

LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973, 406p.

LIOU, J.F. et al. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. **Vaccine**, v.28, p. 8189-8196, 2010.

LUCKINS, A. G. *Trypanosoma evansi* in Asia. **Parasitology Today**, v. 4, p. 137-42, 1988.

MALEKSHAHI, Z.V.et al. Treatment of Helicobacter pylori infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, p. 366-372, 2011.

MASIGA, D.K.; GIBSON, W.C. Specific DNA probes for *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.40, p.279-284, 1990.

- MAWAMBU, P.M. The effect of a block treatment regimen, using ethidium, on cattle trypanosomiasis in an endemic area. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v.36, p.414-418, 1971.
- MENDOZA, J.C. et al. Eficácia experimental de anticuerpos IgY producidos em huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Botrops atrox*. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 29, n. 1, p. 69-75, 2012.
- MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. **Food and Agricultural Immunology**, United States, v. 13, n. 1, p. 275-288, 2001.
- MOHAMMED, S.M.et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology**, Netherlands, v. 4, p. 115-125, 1998.
- MOREIRA, A.S.A.S. **Produção antiveneno botrópico em ovos de galinha**. 2007. 48 p.Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- MOREIRA, R. D., MACHADO, R. Z. Identificação e isolamento do *Trypanosoma equinum* em um cão do município de Camapuã-MS. In: Encontro de Pesquisas Veterinárias, 10, 1985, Jaboticabal. **Resumos**, p.66.
- MONZÓN, C. M., COLMAN, O. L. R. Estudio seroepidemiológico de la tripanosomiasis equina (Mal de caderas) mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta en la Provincia de Formosa (Argentina). Años 1983-1987. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.40, p. 279-85, 1988.
- MONZÓN, C. M. Serological diagnosis of *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) in horses using a direct agglutination test. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.47, p.25-35, 1993.
- MORRISON, S.L.et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, England, v. 38, p. 619-625, 2001.
- MULVEY, G.L.et al. Therapeutic potencial of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1181-1187, 2011. doi: 10.1099/jmm.0.029835-0.

MURALEEDHARAN, K.; SRINIVAS, P. M. A. Report on the observation of *Trypanosoma evansi* in the aborted foetus of a cow. **Indian Veterinary Journal**, v. 62, p. 16-18, 1985.

NARAT, M. Production of Antibodies in Chickens. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v.41, n. 3, p.259–267, 2003.

NOGUEIRA, C. E. W. et al. Efeito quimioprofilático do dipropionato imidocarb na prevenção da agudização de babesiose eqüina em cavalos portadores da infecção. **A Hora Veterinária**, v. 146, p. 17-20, 2005.

NUNES, J. T. S. et al. Occurrence of *Trypanosoma evansi* in Horses in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, In Press, 2011.

NUNES, V. L. B. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* no Pantanal sul-matogrossense. Estudos de reservatórios. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2, p. 41-44, 1993.

OGWU, D.; NURU, S. Transplacental transmission of trypanosomes in animals and man: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 51, p. 381-384, 1981.

OLIVEIRA, M. A. O *Desmodus rotundus* na transmissão do *Trypanosoma equinum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 2, 1943, São Paulo. **Resumos...**p. 157.

OLOVSSON, M.; LARSSON, A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, England, v. 16, n. 2, p. 145-152, 1993.

PALANIYAPPAN, A. et al. Diagnostics of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid antigen using chicken immunoglobulin Y. **Poultry Science**, v. 91, p.636–642, 2012.

PATTERSON, R. et al. Antibody Production and Transfer to Egg Yolk in Chickens. **The Journal of Immunology**, v. 89, p. 2722-278, 1962.

PAULA, V.S. et al. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. **Journal of Virological Methods**, v.171, p.102-106, 2011.

PAYNE, R. C. et al. Efficacy of Cymelarsan in Friesian Holstein calves infected with *Trypanosoma evansi*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 26, n. 4, p. 219-226, 1994.

PAYS, E. et al. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. **Current Opinion in Microbiology**. v. 7, p. 369-374, 2004.

PELEGRINE et al. Factors Influencing the Duration of Isometamidium Chloride (Samorin) Profilaxis against Experimental Challenge with Metacyclic Forms of *Trypanosoma congolense*. **Veterinary Parasitology**, v.28, p.53-64, 1988.

PEREGRINE, A.S.; MAMMAN, M. Pharmacology of Diminazene: A Review. **Acta Tropica**, v. 54, n. 2, p. 185-203, 1993.

PEREGRINE, A. S. Chemotherapy and Delivery Systems: Haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 54, n. 1-3, p. 223-248, 1994.

POLSON, A. et al. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Communications**, United States, v. 9, n. 5, p. 475-93, 1980.

RAINA, A. K. et al. Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 1, p.67-69, 1985.

RAMIREZ, L. E. et al. **La tripanosomiasis in los animales domesticos em Colombia**. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1979.

RANGEL, M.F.N.et al. Development of IgY antibodies in chickens and IgG in rabbits immunized against proteins of *Pythium insidiosum* isolated from horses in the state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**., v. 30, n. 1, p. 87-93, 2010.

RAYNAUD, J. P. et al. A review of Cymelarsan - a new treatment proposed for animal trypanosomiasis due to *T. evansi* and other trypanosomes of the *T. brucei* group. **ISCTRC**, 20th Meeting, Mombasa, Kenya, Pub. N°. 115. 1989.

RODRIGUES, A. et al. Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 239-249, 2005.

RODRIGUES, A. et al. Neuropathology of Naturally Occurring *Trypanosoma evansi* infection on Horses. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 251-258, 2009.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 6-31, 2003.

RONCATI, N.V - Babesiose eqüina – Aspectos gerais e terapêutica - **Vet News®-Schering-Plough-** Ano XIII Nº 86, - revista eletrônica, p 9, MAR/ABR 2007.

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

SANTOS, A. S. et al. Origin of the Pantaneiro horse in Brazil. **Archives of Zootechnia**, v. 41, n. 154, p. 371-381, 1992.

SARMAH, P. C. Transplacental transmission of *Trypanosoma evansi* in mice. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 68, n. 4, p. 344-345, 1998.

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. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, England, v.33, p. 1-26. 2005.

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

SCHWARZKOPF, C.; STAAK, C.; BEHN, I.; ERHARD, M. Immunisation. 1994 In: SCHADE, R. et al. **Chicken egg yolk antibodies, production and application IgY-technology**. Berlim: Springer, 2001. p. 25-64.

SEKONI, V. O. et al. Effects of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections on the reaction time and semen characteristics of Zebu (Bunaji) x Friesian crossbred bulls. **Theriogenology**, v. 61, p. 174-194, 2004

SILVA, R. A. M. S. et al. Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil: a preliminary approach on risk factors. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 4, n. 3, p. 315-319, 1995.

SILVA, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia, Diagnóstico e Controle. **Embrapa**, 2002. Disponível em:

<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/Livro015.pdf>. Acesso em: 09 out. 2012.

SILVA, R. A. M. S. et al. Quimioterapia das Tripanossomoses ocorrentes no Pantanal. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 2004, 26 p.

STAAK, C. et al. Isolation of IgY from yolk. In: SCHADE, R et al. **Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY technology**. Berlin: Springer, 2001. p.65-107.

STEINER, J.W.; LANGER, B.; SCHATZ, D.L. The local and systemic effects of Freund's adjuvant and its fractions. **Archives of Pathology**, v. 70, p. 424-434, 1960.

STILLS, H.F. Jr. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. **ILAR Journal**. v.46, p.280-293, 2005.

SUI, J. et al. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminar evaluation of its potencial for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 91, p. 1946-1950, 2011.

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

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

TINI, M. et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, United States, v.131, n. 6, p.569-574. 2002.

TOBIAS, F.L. et al. Growth inhibition of *staphylococcus aureus* and *escherichia coli* strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 544-551, 2012.

TONIN, A. A. et al. Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of *Trypanosoma evansi* infection in rats. **Experimental Parasitology**, v.128, p.243-249, 2011.

TUNTASUVAN, D. et al. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 73, n. 4, p. 357-363, 1997.

TUNTASUVAN, D. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by immunohistochemistry. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 3, p.223-230, 2003.

UCHE, U. E.; JONES, T. W. Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. **Journal of Comparative Pathology**, v. 106, n. 3, p. 299-309, 1992.

VAJDOVICH, P. Free Radicals and Antioxidants in Inflammatory Processes and Ischemia-Reperfusion Injury. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 38, p. 31-123, 2008.

VEGA, C. G. et al. Egg yolk IgY: Protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, p. 156-169, 2011.

VEGA, C.G. et al. IgY Antibodies Protect against Human Rotavirus Induced Diarrhea in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Disease Model. **PLoS ONE**, v.7, n.8, 2012.

VENTURA, R. M. et al. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 53-63, 2002.

VERMA, B. B. et al. *Trypanosoma evansi*: Therapeutic Efficacy of Diminazine Aceturate in Crossbred Calves, *Bos taurus* and *B. indicus*. **Experimental Parasitology**, v. 40, p. 406-410, 1976.

WANG, Z. et al. Detection of *Trichinella spiralis* circulating antigens in serum of experimentally infected mice by an IgY-mAb sandwich ELISA. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 8, 2012.

WELLS, E.A. Animal Tripanosomiasis in South America. In: RIEMANN, H.P.; BURRIDGE, M.J. **Impact of diseases on livestock production in the tropics**, Amsterdam: Elsevier, 1984, p. 31-41.

WOLKMER, P. et al. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 41-46, 2009.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Tropica**, v. 27, p. 384-386, 1970.

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

XU, F.X. et al. Effectiveness of egg yolk immunoglobulin (IgY) against periodontal disease-causing *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Applied Microbiology**, 2012

ZANETTE, R.A et al; Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1468-1471, 2008.

ZHEN, Y.H. et al. Efficacy of specific IgY for treatment of lipopolysaccharide induced endotoxemia using a mouse model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 11, p. 1524-1532, 2011.

ZOBBA, R. et al. Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, vol. 28, n.5, 2008.

7 ANEXOS

7.1 Artigo “In vitro cytotoxicity and genotoxicity of chicken egg yolk antibodies (IgY) against *Trypanosoma evansi* in human lymphocytes” publicado na revista Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences em abril 2014.

Innovare
Academic Sciences

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences
ISSN- 0975-1491

Vol 6, Issue 3, 2014

Original Article

IN VITRO CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF CHICKEN EGG YOLK ANTIBODIES (IGY) AGAINST *TRYPANOSOMA EVANSI* IN HUMAN LYMPHOCYTES

LUZIA CRISTINA LENCIONI SAMPAIO^{a*}, MATHEUS DELLAMÉA BALDISSERA^{a,b}, MICHELE RORATO SAGRILLO^b, TIAGO DA SILVA HERES^c, CAMILA BELMONTE OLIVEIRA^a, DANIEL ROULIM STAINKI^a, SILVIA GONZALEZ MONTEIRO^a

^aDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil. ^bLaboratório de Cultura Celular, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Brazil. ^cCentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Brazil.
Email: sampaio.cris@gmail.com

Received: 09 Feb 2014, Revised and Accepted: 28 Apr 2014

ABSTRACT

Objective: The present study aims to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of polyclonal antibodies (IgY), produced from the immunization of chickens against protozoan *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*).

Methods: For the tests a culture of human lymphocytes and IgY samples (1, 2.5, 5 and 10 mg/mL) were used. Cell viability was assessed by employing MTT assay, and the formation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation were measured by testing the 2-thiobarbituric acid (TBARS). Genotoxicity was evaluated by chromosomal instability test.

Results: At the concentrations tested, the study revealed that IgY anti-*T. evansi* showed no significant cytotoxic and genotoxic effects.

Conclusion: These findings demonstrate the safety of these antibodies to mammalian cells.

Keywords: MTT assay; Chromosomal instability; Avian immunoglobulin; Passive immunization.

INTRODUCTION

Trypanosoma evansi (*T. evansi*) is a protozoan that affects most of the domestic animals, as well as some wild species [1, 2]. In 2005, it was reported the first case of human infection in a farmer in India [3]. The disease has a worldwide distribution, affecting mainly tropical and subtropical regions [4, 5, 6, 7].

The transmission of tripanosomosis occurs through inoculation of *T. evansi* by the saliva of flies of Tabanidae and Muscidae families, or artificially by fomites, such as needles, contaminated with infected blood [8]. In South America, vampire bats (*Desmodus rotundus*) can also transmit it [9].

Following the infection is initiated the multiplication of the parasite (in the bite site) and its migration into the bloodstream and lymphatic system. As the parasitemia increases, the inflammatory response is activated and peaks of fever occur. The infection usually tends to become chronic, with periods without blood parasites and/or fever [8, 10]. At this stage, a hemolytic anemia occurs due to the release of hemolysins and enzymes or directly by the trypanosomes, which are able to induce lesions in the membrane and increase the fragility of these cells [11, 8]. By the other hand, acute infections can cause rapid death in untreated horses and dogs [12, 13, 14]. Chronic infections can last for years [15] and at this stage the worsening of clinical signs and cachexia usually occurs [16, 9, 17]. Neurological signs have been described in the terminal phase of the disease, especially in horses and cattle [18, 17, 19].

Chemical therapy is still the method of choice in controlling the disease in domestic animals. The major problems observed in the treatment are the high host toxicity of some drugs and the emergence of resistant strains, since most of these compounds have been used in the field for over 40 years [9]. Specific avian antibodies immunotherapy against this parasite may be a therapeutic alternative in controlling and/or prevention of these infections.

Immunoglobulin Y (IgY) are polyclonal antibodies obtained from egg yolk (yolk-y) of hens immunized. The production and uses of these immunoglobulins has drawing the attention of the scientific community, mainly because of the diagnostic diversity and therapeutic applications in biomedical research. Furthermore, it is

considered an alternative technique to reduce the suffering of animals used in researches [20], since the antibodies are derived from egg yolk. Since 1980 there was an increase in IgY application in laboratorial tests, mainly due to the availability of commercial reagents for purification, availability of standard IgY and specific antibodies anti-IgY labeled with fluorescein, alkaline phosphatase or peroxidase [21].

A considerable number of advantages to the use of avian antibodies, rather than mammalian antibodies are recognized, such as: avian IgY aggregates the functions of the mammalian IgG and IgE; hens antibodies do not have cross reactions with mammalian IgG, red blood cells are not attacked by it, not activating the complement system, as well as the coagulation cascade. IgY technology allows to obtain antibodies with high affinity and avidity. Individually, a hen is able to produce more antibodies than rabbits, goats, horses or rodents [22, 23].

The production and evaluation of the therapeutic activity of avian antibodies in parasitic diseases [22, 24, 25], bacterins [26, 27, 28] and viral [29] are widely reported in the scientific literature. The application of these immunoglobulins consists in an important alternative for the prevention or treatment of several acute, chronic or recurrent diseases. There is now a concern, not only with therapeutic efficacy, but also with pharmacology safety, determined by cytotoxicity and genotoxicity tests. Toxic stimuli threaten the cellular metabolic functions, and thus, the response of cells depends on the toxicity generated, may allowing the cells to adapt to the environment in which they were submitted [30]. The toxicity tests are performed to determine the potential risks that can be generated by new products on health and environment [31]. Thus, the cytotoxicity reflects the effects on cellular structures. Most of the cells should show a similar response, and respond similarly when the toxicity is measured by several criteria of viability [32].

In vitro cytotoxicity assay is the first test for evaluating the biocompatibility of any material for uses in biomedicine. In vitro methods, for assessing the toxicity of biomaterials, were standardized using cell cultures. In these tests the material evaluated is directly or indirectly when placed in contact with mammalian culture cells, in order to verify cellular changes may

produced by different mechanisms [33]. Cell viability is a general term, and it may be assessed by assays that determine one or more cellular parameters such as: 3-(4,5)-dimethylthiazolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (mitochondrial activity), lactate dehydrogenase enzyme (LDH), Trypan Blue, among others. These assays are generally suitable for measuring acute toxic effects of cultured cells [34]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) have been applied for decades as biomarkers of genotoxic and cytotoxic effects. Abundant in the bloodstream, these cells are exposed to any mutagenic agent, being able to reflect recent damage. Cultured PBMC have become the promising in vitro model for many studies, highlighting the usefulness of this kind of cell line in studies of cytotoxicity [35]. When a new agent is incorporated into the cellular environment, an important aspect that deserves to be evaluated is whether this agent is able to cause genotoxicity. Damage to genetic material can result in the induction or promotion of carcinogenesis, influencing cell reproduction if the DNA of germ cells was compromised [36]. These compounds can react with several structures and cellular organelles, including DNA, proteins and lipids, affecting multiple cellular processes. The DNA, when exposed to certain agents, can mutate, affecting the stability of the genome and leading to the development of genetic diseases and cancer. It may also result in the formation of reactive species, which involve cell dysfunction, mutations and aging [37]. Although all cellular components are susceptible to the action of reactive oxygen species (ROS), the membrane structure is generally the most affected by the lipid peroxidation, leading to changes in the structure and permeability. Consequently, there is selectivity loss in ion exchange and release of organelle contents, such as hydrolytic enzymes of lysosomes, and formation of cytotoxic products (e.g., malondialdehyde), culminating in cell death [38]. Therefore, the present study aims to assess the cytotoxic and genotoxic effects produced by antibodies IgY anti-*T. evansi* in cell-cultured human lymphocytes.

MATERIAL AND METHODS

IgY obtainment and characterization

Three New Hampshire hens, at 25 weeks of age, were immunized with trypanastigotes of *T. evansi*. Extraction of IgY from egg yolk was carried out according to the method previously described [39, 40]. After extraction, the immunoglobulins were analyzed by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE), under reducing conditions [41]. The antigen antibody reaction was detected by Western blot and ELISA avidity. The concentration of specific IgY anti-*T. evansi* extracted was assessed by Coomassie blue method [42] using bovine serum albumin as standard.

Obtainment of samples for cytotoxicity and genotoxicity tests

Peripheral blood samples were drawn (Vacutainer® - BD Diagnostics, Plymouth, UK), from a healthy female volunteer, 21 years old, non-smoker, without drinking or under chronic medication and under 12-h overnight fasting. Blood samples were stored in heparin tubes and 5 mL were used to obtain cultured lymphocytes in culture media composed by 1 mL of RPMI 1640 (with 10% of fetal calf serum - FCS), 1% of penicillin/streptomycin and phytohemagglutinin (PHA). The cells were maintained in suspension culture at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 growth medium during 72 hours. Further, the cells were exposed to 72 hours treatment and the cell viability, mitotic index and chromosomal instability were assessed. All the treatments were carried out in triplicate.

Treatments: In order to test the damage effects of IgY on cell viability, as well as its protective effects on chromosomes damage in human lymphocytes, a similar protocol as described by Wilms et al. (2005) [43] was performed. The concentrations of 1, 2.5, 5 and 10 µg/mL were tested. The medium culture was used as a negative control, while the medium added of 25 µM of hydrogen peroxide was used as a positive control group.

Evaluation of IgY cytotoxicity: MTT assay was based on the metabolism of MTT reagent (yellow color) in formazan crystals (violet color). The reaction occurs through the mitochondrial

enzyme succinate dehydrogenase, which remains active only in viable cells. Cells were treated at the given concentrations (1, 2.5, 5 and 10 mg/mL) and, after 72 hours of incubation (at 37°C, CO₂/5%), 10 µL of MTT was added to each well (5 mg/mL), diluted in phosphate buffered saline (PBS-1X). Then, the plate was homogenized (150 rpm/5 minutes) and still maintained at the same conditions (37°C and CO₂/5%) for 4 hours. Later, the supernatant was removed and 150 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added. Finally, the plate was shaken at 150 rpm/5 minutes and the reading was performed in an ELISA reader (wavelength of 570 nm). The results were expressed as "% of cell viability compared with the controls.

Evaluation of IgY genotoxicity

After exposure treatments, one replicate of each treatment was used to investigate the mitotic index, as well as the chromosomal instability, using the G-band cytogenetic analysis. At least 50 mitoses were analyzed in each sample.

Lipid peroxidation of IgY

Lipid peroxidation was assessed by TBARS (thiobarbituric acid reactive species) method [44]. After treatment, the cells were centrifuged for 10 minutes at 2000 rpm, in order to remove the culture medium. The supernatant was discarded and 2 additional centrifugations (10 minutes at 2000 rpm) were made using saline (0.9% NaCl). After these steps, the supernatant was discarded and 100 µL of Butylated hydroxytoluene (BHT/10 mM), plus 500 µL of trichloroacetic acid (TCA 20%) were added for a final centrifugation (5 minutes at 2000 rpm). After centrifugation, 900 µL of the supernatant was mixed with a reaction medium containing thiobarbituric acid (TBA at 0.8%), being incubated at 95°C during 1 hour. Absorbance was measured at 532 nm wavelength with results expressed in nmol MDA/10⁶ cells.

Data analysis

Assay results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Dunnett test in order to verify the accuracy of the data. Values with $p < 0.05$ were considered statistically different (*) $P < 0.05$ when compared with the control (#) $P < 0.05$ when compared with phytohemagglutinin.

RESULTS AND DISCUSSION

Our immunization protocol stimulated the production of immunoglobulins anti-*T. evansi*, since this immunoglobulin was detected and extracted from egg yolks from the fourth week post immunization. A well-defined peptide band, stained by SDS-PAGE, was observed by Western blot, revealing in the light (25-20 kDa) and heavy (75-50 kDa) chains of the extracted IgY. The binding capacity of the antibody produced against the antigen was detected through the high avidity levels obtained by ELISA avidity. The average production of IgY anti-*T. evansi* was 2.64 ± 0.15 (4th week) and 2.87 ± 0.14 (10th week) [t (3) = -4.31, $p < 0.05$].

The IgY antibodies, when subjected to in vitro culture medium containing human lymphocytes, did not produce damage in the cellular structures. The percentage of cellular viability did not decrease in any of the tested concentrations. The cytotoxicity test showed that the IgY produced did not cause damage when in direct contact with the blood cell, especially evidenced by preservation of mitochondrial physiology. It was also observed a slight increase for cell viability as the concentration of the samples increased, although it was not statistically significant. However, when the concentration of 10 mg/mL was reached, the increase in the percentage of viability was statistically significant compared to the control group, H₂O₂ group, as well as with the lowest concentration groups (Figure 1); it did not differ from group treated with phytohemagglutinin (PHA), a substance that stimulates mitosis of lymphocytes.

These findings suggest that the concentration increase of IgY can enhance the proliferation of lymphocytes. Lymphocytosis is a late cellular response and is related to the production of specific and lasting antibodies. Antibodies are a major opsonins produced by the host defense system and they are essential for the stimulation of antigen phagocytosis [38]. On *T. evansi* infection, it is desirable that

the host has an immediate cellular immune response, in order to neutralize or minimize the action of the parasite. Our finding suggests that IgY binds on *T. evansi* and, additionally, it also stimulates the proliferation of lymphocytes, inducing an immune response against this specific and long-lasting parasite. However, only in vivo tests, preferably parenterally, may evaluate the effectiveness, or not, of these cells on the protozoan infection.

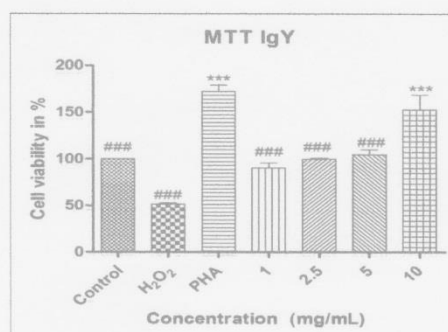


Fig. 1: IgY MTT after 72 hours of incubation.

Our results did not detect structural changes in metaphase of the chromosomes (chromatid breaks, centromeric, acentric and dicentric fragments, as well as the formation of tri and tetra radialfigures), which could indicate the occurrence of chromosomal aberrations (Figure 2).

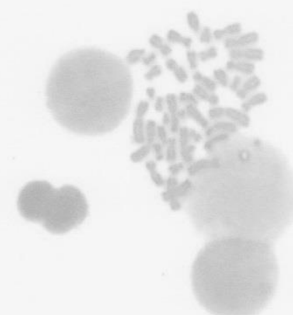


Fig. 2: Lymphocyte in metaphase by the karyotype technique, without chromosomal alteration.

The analysis of chromosomal instability test (Table 1) demonstrated, at all concentrations tested, 100% of metaphase integrity, as evidenced in the control group. Similarly, the interphase nuclei were normal and without any metanuclear changes. The dependent dose effect on the mitotic index was well evidenced (data shown in Table 1), where concomitant, as the concentration of IgY increased, also the number of metaphases enhanced. The concentration of 10 mg/mL showed a significant difference when compared with the control ($p < 0.05$). The proliferative activity observed in the MTT assay, at the concentration of 10 mg/mL, was also observed by the mitotic index in the chromosomal instability test. Our findings suggest that the therapeutic use of avian antibodies do not promote change in cell reproduction or change the DNA structure in human lymphocytes.

Table 1: Karyotypic changes (%) in mononuclear cells of human peripheral blood exposed to different concentrations of IgY.

Concentration	Metaphases	Intact metaphases (%)	Morphology of the nucleus	Markers of Chromosomal Instability
Control	700 ± 5	100	Normal	-
H ₂ O ₂	350 ± 4 ***	5	Karyopyknosis	Karyopyknosis
1 mg/mL	730 ± 3	100	Normal	-
2.5 mg/mL	760 ± 6	100	Normal	-
5 mg/mL	793 ± 2	100	Normal	-
10 mg/mL	810 ± 5 ***	100	Normal	-

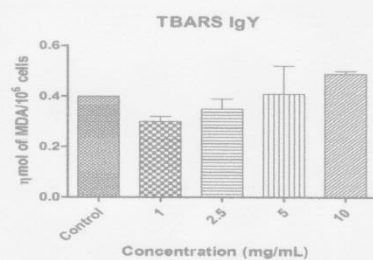


Fig. 3: TBARS assay after 72 h of incubation. Results are expressed as nmol of MDA/10⁶ cells.

According to TBARS test, the MDA values found in different concentrations of IgY, did not differ statistically from the control group ($p > 0.05$). The dose-dependent effect, on the formation of

MDA, is evidenced in figure 3, where it was observed MDA growth following the increasing concentration of IgY. However, the amount of ROS produced did not result in the oxidation of the cell membrane in any tested concentration ($p > 0.05$).

Lipid peroxidation is the process in which the ROS act on phospholipids of cell membranes, causing their disintegration. Lipid peroxides formation results in the disruption of the cell membranes, DNA mutations, oxidation of unsaturated lipids and formation of chemical waste [38]. No report has been found in the literature about the occurrence of lipid peroxidation in the presence of avian antibodies.

CONCLUSION

IgY antibodies anti-*T. evansi*, at concentrations of 1, 2.5, 5 and 10 mg / mL did not cause damage to the cell membrane of human lymphocytes, did not affect the cell viability, as well as did not produce DNA damage at the chromosomal level; thus, not presenting cytotoxicity and genotoxicity. At 10 mg/mL of concentration, IgY had a proliferative effect, consisting in the normal cell proliferation, as evidenced by the chromosomal instability test, a result that can be seen in cellular viability test and mitotic index.

REFERENCES

- Darling ST. Equine trypanosomiasis in the canal zone. *Bull Soc Pathol Exot* 1910; 3: 381-84.
- Hoare HE. The trypanosomiasis of mammals: A zoological monograph. Oxford & Edinburgh: Blackwell Scientific Publications; 1972.
- Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR et al. Human Trypanosomiasis Caused by *Trypanosoma evansi* in India: The First Case Report. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: 491-95.
- Hornby HE. Animal trypanosomiasis in eastern Africa, 1949. H. M. Stationery Office; 1952.
- Bajyana Songa E, Kageruka P, Hamers R. The use of the card, agglutination test (Testryp CATT) for the serodiagnosis of *T. evansi* infection. *Ann Soc Belg Med Trop* 1987; 67: 51-7.
- Luckins AG. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol Today* 1988; 4: 1371-42.
- Bazolli RS, Marques LC, Machado RZ, Aquino LPC, Alessi AC, Camacho AA. Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães. *ARS Veterinaria* 2002; 18: 148-52.
- Connor RJ, Van Den Boosche P. African animal trypanosomiasis. In: Coetzer JAW, Tustin RC (Eds.). *Infectious diseases of livestock*. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press 2004; 1: 251-96.
- Silva RAMS, Seidl A, Ramirez L, Dávila AMR. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* - Biologia diagnóstica e controle. Corumbá, MS (Brazil): Embrapa; 2002.
- Pays E, Vanhamme L, Pérez-Morga D. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 369-74.
- Jain NC. Hemolytic anemia associated with some infectious agents. In: Jain NC. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.177-92.
- Levine ND. Protozoan parasites of domestic animals and man. 2nd ed. Minneapolis: Burgess; 1973.
- Aquino LPCT, Machado RZ, Alessi AC, Marques LC, Castro MB, Malheiros EB. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 255-60.
- Herrera HM, Norek A, Freitas TPT, Rademaker V, Fernandes O, Jansen AM. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitol Res* 2005; 96: 121-26.
- Brun R, Hecke H, Lun ZR. *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet Parasitol* 1998; 79: 95-107.
- Brandão LP, Larsson MHMA, Birgel EH, Hagiwara MK, Ventura RM, Teixeira MMA. Infecção natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão - Relato de caso. *Clínica Veterinária* 2002; 36: 23-6.
- Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Soares MP, Milano J et al. Outbreaks of Trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. *Pesqui Vet Bras* 2005; 25: 239-49.
- Tuntasuvan, D, Sarataphan N, Nishikawa H. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. *Vet Parasitol* 1997; 73: 357-63.
- Da Silva AS, Oliveira CB, Zanette RA, Soares CDM, Coradini G, Polenz CH et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. *Acta Sci Vet* 2007; 35: 373-76.
- Russel WMS, Burch RL. Principles of Humane Experimental Technique. Special ed. Herts, U.K.: Universities Federation for Animal Welfare 1992.
- Chacana PA, Terzolo HR, Calazado EG, Schade R. Tecnologia IgY e aplicações de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. *Rev Med Vet* 2004; 85: 179-89.
- Contreras VT, Lima AR, Navarro AC, Arteaga RY, Graterol D, Cabello L et al. Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas com epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Salus online* 2005; 9: 21-7.
- Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Asplund JP, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim* 2005; 33: 1-26.
- García DA, Nicholls RS, Arévalo A, Torres O, Duque S. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados em gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. *Biomedica* 2005; 25: 451-63.
- Ferreira Junior A, Santiago FM, Silva MV, Ferreira FB, Macêdo Júnior AG. Production, Characterization and Applications for *Toxoplasma gondii*-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. *PLoS One* 2012; 7.
- Malekshahi ZV, Gargari SLM, Rasooli I, Ebrahimi Zadeh W. Treatment of Helicobacter pylori infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. *Microb Pathog* 2011; 51: 66-372.
- Mulvey GL, Dingle TC, Fang L, Strecker J, Armstrong GD. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 2011; 60: 1181-87.
- Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. *Biotechnol Adv* 2011; 29: 860-68.
- Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chatta KS, Fernández FM, Wigdorovitz A et al. IgY Antibodies Protects against Human Rotavirus Induced Diarrhea in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Disease Model. *PLoS One* 7; 2012.
- Yang A, Cardona DL, Barile FA. Subacute cytotoxicity testing with cultured human lung cells. *Toxicol in Vitro* 2002; 16: 33-9.
- Castañó A, Gómez-Lechón MJ. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. *Toxicol in Vitro* 2005; 19: 695-705.
- Babich H, Rosenberg DW, Borenfreund E. In vitro cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). *Ecotoxicol Environ Saf* 1991; 21: 327-36.
- Rogero SO, Lugaño AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Mat Res* 2003; 6: 3-31.
- Soenen SJ, De Cuyper M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol Imaging* 2009; 4: 207-19.
- Maluf SW, Riegel M. *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Artmed; 2011.
- Doak SH, Manshian B, Jenkins GJS, Singh N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat Res* 2011; 745: 104-11.
- Riley T, Sontag E, Chen PP, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 402-12.
- Vajdovich P. Free Radicals and Antioxidants in Inflammatory Processes and Ischemia-Reperfusion Injury. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38: 31-123.
- Polson A, Von Vechmar MB, Van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun* 1980; 9: 475-93.
- Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J Vis Exp* 2011; 51: 1-5.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-85.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res* 2005; 582: 155-62.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yag K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-58.

7.2 Comprovante submissão artigo “Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection” enviado para Revista Veterinary Parasitology.



7.3 Parecer Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Eficácia da imunoterapia a base de Igy aviária, associada ou não ao diaceturato de diminazeno e/ou propionato de imidocarb em ratos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi*".

Número do Parecer: 018/2013

Pesquisador Responsável: Prof.^a Dr.^a Sílvia Gonzalez Monteiro.

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.
O comitê recomenda o uso de 5 ratos por grupo.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 19/09/2013.

Santa Maria, 19 de setembro de 2013.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Alexandre Krause", is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Alexandre Krause

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

Comissão de Ética no Uso de Animais - UFSM - Av. Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria - 2º andar -
Campus Universitário 97105-900 – Santa Maria – RS - - Tel: 0 xx 55 3220 9362