

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

Thirssa Helena Grandó

**IGY ANTI - *Trypanosoma cruzi* - PRODUÇÃO E
AVALIAÇÃO IMUNOTERÁPICA**

**Santa Maria, RS
2018**

Thirssa Helena Grando

**IGY ANTI - *Trypanosoma cruzi* - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO
IMUNOTERÁPICA**

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

Orientador: Prof.^a Silvia Gonzalez Monteiro

**Santa Maria, RS
2018**

Grando, Thirssa Helena
IGY ANTI - Trypanosoma cruzi - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO
IMUNOTERÁPICA / Thirssa Helena Grando.- 2018.
75 p.; 30 cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. Tripanossomíase 2. Doença de Chagas 3.
Imunoglobulina aviária I. Monteiro, Silvia Gonzalez II.
Título.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Thirssa Helena Grando. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Fone: (55) 99933-3698 - e-mail: thirssagrando@gmail.com

Thirssa Helena Grando

**IGY ANTI - *Trypanosoma cruzi* - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO
IMUNOTERÁPICA**

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

Aprovado em 30 de novembro de 2018:

Silvia Gonzalez Monteiro (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Luzia Cristina Sampaio (UFPeI)

Rovaina Doyle (IPVDF)

Luiz Antônio Sangioni (UFSM)

Bárbara Charlotte (UFSM)

Santa Maria, RS

2018

DEDICATÓRIA

*Dediquei...
Dedico...
e sempre dedicarei
minhas conquistas
à minha mãe.
“Mãe sempre te amarei”.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer...

... a Deus pela vida, e por me dar forças para superar as dificuldades e forças para nunca desistir dos meus objetivos.

... a minha Mãe que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos e alcançar meus objetivos, sei que independente em que universo ela esteja ela continua me mandando luz e força para seguir em frente.

...ao meu noivo, futuro marido e pai de meu primeiro filho, Marcelo. Meu companheiro, meu amigo, meu amor, que me acompanhou e estimulou desde a época da graduação, um grande companheiro, sempre insistindo e me ajudando a estudar. Agradeço também a família Farias, que sempre me acolheu como sendo da família, esse carinho com certeza ajudou a amenizar a saudade e a distância da minha casa.

...a minha Mana Suelem e agora meu sobrinho Bernardo, que me incentiva e acredita em mim sempre, não medindo esforços pra me ajudar mesmo estando longe, meu amor por ela é infinito.

... a minha Família, base de tudo, que sempre deu suporte para que eu nunca desistisse dos estudos.

...aos meus amigos que me deram apoio, sempre entenderem a minha ausência e por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas.

... a UCS, e a todos os meus colegas pela oportunidade do meu primeiro emprego remunerado e minha primeira vivência como docente, com certeza aprendi muito nesse período e vou guardar com carinho essas lembranças.

... ao IFFar – FW, aos meus colegas e amigos, por ter sido escolhida a fazer parte desse time e dessa instituição que me desafia, mas ao mesmo tempo me faz ser a cada dia melhor.

...a UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade, pela excelente infraestrutura, pelo qualificado corpo docente, pelo eficaz corpo técnico administrativo, É um orgulho poder tido à oportunidade de cursar a graduação, o mestrado e o doutorado nessa instituição.

...a minha Orientadora, Prof^a. Silvia Gonzalez Monteiro, pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pelos conselhos, enfim, pela oportunidade e confiança de me acolher como sua aluna e orientada, serei eternamente grata.

...ao Laboratório de Parasitologia Veterinária, LAPAVET, agradeço imensamente. os estagiários, os pós-graduandos e os professores, sem vocês nada seria possível. Agradeço: a orientação, a paciência, a ajuda nos experimentos, a parceria, as risadas na salinha, as ideias, enfim agradeço por tudo.

RESUMO

IGY ANTI - *Trypanosoma cruzi* - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO IMUNOTERÁPICA

AUTOR: THIRSSA HELENA GRANDO

ORIENTADORA: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da Doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae. Esta doença é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e na América Latina, e por isso há a necessidade de pesquisas para o controle dessa enfermidade, visto que o tratamento químico existente é longo, produz efeitos colaterais e nem sempre é eficaz. A denominação IgY refere-se a imunoglobulina da gema do ovo (Y = yolk) e a produção e o uso desse anticorpo aviário tem sido estudado por diversos pesquisadores devido à diversidade de aplicações diagnósticas e terapêuticas. Pesquisas têm demonstrado que o uso de IgY específicas previne e controla doenças infecciosas e parasitárias. Sabendo que a terapêutica da Doença de Chagas necessita de novas alternativas, esta pesquisa teve como objetivo produzir e avaliar a eficácia terapêutica, de anticorpos aviários específicos contra *Trypanosoma cruzi*. Primeiramente, galinhas foram imunizadas com tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) para a produção de anticorpos IgY eficazes e específicos, os mesmos foram extraídos, caracterizados, quantificados e analisados quanto ao seu efeito citotóxico. Após a obtenção das IgY anti-*T. cruzi*, foi avaliada em roedores, a eficácia terapêutica de anticorpos policlonais aviários específicos (IgY) contra *Trypanosoma cruzi* e sua interação com ecto-enzimas do sistema purinérgico (atividades de NTPDase e adenosina desaminase (ADA) em linfócitos esplênicos. Para tanto, camundongos foram experimentalmente infectados com *T. cruzi* (cepa Y) tratados com a IgY anti-*T. cruzi* na dose de 50mg/kg em dois protocolos, sendo um profilático (antes e durante a infecção) e outro terapêutico (após a infecção). Os resultados deste estudo demonstraram que *T. cruzi* foi capaz de gerar nas galinhas, uma excelente produção de imunoglobulinas específicas. Nos testes citotóxicos, as Igy não causaram danos na membrana celular e no seu efeito proliferativo. No estudo *in vivo*, o uso terapêutico de IgY anti-*T. cruzi* diminuiu a invasão dos parasitos nas células cardíacas na fase aguda e melhorou a resposta imune e inflamatória dos camundongos infectados experimentalmente por *T. cruzi*. Esses resultados evidenciam que a imunoterapia pela Igy - anti *T. cruzi* pode ser considerada mais uma ferramenta no controle e tratamento da doença de Chagas, sendo necessário mais estudos em outras espécies animais, duração do tratamento e testes com diferentes concentrações do imunoterápico.

Palavras-chave: Tripanossomíase. Doença de Chagas. Imunoterapia. Imunoglobulina aviária.

ABSTRACT

IGY - ANTI *Trypanosoma cruzi* - - PRODUCTION E IMUNOTERAPIC EVALUATION

AUTHOR: THIRSSA HELENA GRANDO
ADVISER: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, is a flagellate protozoan belonging to the family Trypanosomatidae. Chagas disease is one of the main public health problems in Brazil and Latin America, and therefore there is a need for research to control this disease, since the existing chemical treatment is long, produces side effects and is not always effective. The name IgY, refers to egg yolk immunoglobulin (Y = yolk) and the production and use of this avian antibody has been studied by several researchers because of the diversity of diagnostic and therapeutic applications. Research has shown that the use of specific IgY prevents and controls infectious and parasitic diseases. Knowing that the treatment of Chagas disease requires new alternatives, this research aimed to produce and evaluate the therapeutic efficacy of specific avian antibodies against *Trypanosoma cruzi*. Firstly, chickens were immunized with trypomastigotes of *T. cruzi* (strain Y) for the production of effective and specific IgY antibodies, which were extracted, characterized, quantified and analyzed for their cytotoxic effect. After obtaining the anti-*T. cruzi* IgY, the therapeutic efficacy of specific avian polyclonal antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi* and its interaction with ecto-enzymes of the purinergic system (NTPDase and adenosine deaminase (ADA) activities) in splenic lymphocytes. To this end, mice were experimentally infected with *T. cruzi* (strain Y) treated with IgY - anti *T. cruzi* at a dose of 50mg / kg in two protocols, one prophylactic (before and during infection) and one therapeutic (after infection). The results of this study demonstrated that *T. cruzi* was able to generate in chickens an excellent production of specific immunoglobulins. In cytotoxic assays, Igy did not cause damage to the cell membrane and its proliferative effect. In the *in vivo* study, the therapeutic use of IgY - anti *T. cruzi* decreased the invasion of the parasites in the cardiac cells in the acute phase and improved the immune and inflammatory response of the mice infected experimentally by *T. cruzi*. These results show that Igy - anti *T. cruzi* immunotherapy may be considered as a tool for the control and treatment of Chagas' disease, requiring further studies in other animal species, duration of treatment and tests with different immunotherapeutic concentrations.

Key-words: Trypanosomiasis. Chagas disease. Immunotherapy. Avian immunoglobulin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Forma tripomastigota de Trypanosoma cruzi em esfregaço sanguíneo. Fonte: Foto de Mateus Fracasso.	6
Figura 2 - Ciclo biológico do T. cruzi. Fonte: CDC - Centers for Disease Control - https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html	7
Figura 3- Triatoma rubrovaria, ingurgitada (1), e suas fezes após alimentação (2). Fonte: Monteiro, 2017.	9
Figura 4 - Estrutura de IgY aviária versus IgG de mamífero. Fonte: MULLER et al., 2015...	17
Figura 5 - Inoculação intramuscular em galinha. Fonte: Arquivo pessoal.....	20

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 DOENÇA DE CHAGAS.....	5
2.1.1 Panorama da Doença de Chagas.....	5
2.1.2 <i>T. cruzi</i>	6
2.1.4 Vetores e reservatórios.....	8
2.1.5 Formas da doença de Chagas.....	10
2.1.6 Principais tratamentos.....	11
2.1.7 Resposta imune e inflamatória na Doença de Chagas.....	12
2.1.7.1 O sistema imune.....	13
2.1.7.2 Sistema colinérgico.....	14
2.1.7.3 Sistema purinérgico.....	15
2.2 IMUNOGLOBULINA Y (IGY).....	16
2.2.1 Produção, extração e purificação da IgY.....	19
2.2.2 Usos da tecnologia IgY.....	21
3. CAPÍTULO II - ARTIGO 1.....	24
TÍTULO:Avian antibodies (igy) against <i>Trypanosoma cruzi</i> : purification and characterization studies.....	24
4. CAPÍTULO III - ARTIGO 2.....	43
TÍTULO:Ecto-enzymes activities in splenic lymphocytes of mice experimentally infected by <i>Trypanosoma cruzi</i> and treated with specific avian immunoglobulins.....	43
5. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

APRESENTAÇÃO

Os resultados e as metodologias que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois artigos que demonstram a pesquisa de uma nova alternativa de controle e tratamento da Doença de Chagas a partir da produção de uma imunoglobulina aviária (IgY) anti- *T. cruzi*. Esse documento está organizado seguindo as normas do manual de dissertações e teses da UFSM (MDT – 2015). O item CONCLUSÕES, encontrado no final da tese, apresenta as interpretações discutidas sob um ponto de vista que buscaram estabelecer uma relação entre os objetivos e resultados obtidos. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS se referem somente às citações que aparecem no item REVISÃO DE LITERATURA.

Os artigos estão estruturados conforme as normas das revistas que foram publicados. Portanto, o ARTIGO 1 encontra-se de acordo com as normas do Journal of Immunological Methods, enquanto que o ARTIGO 2, está descrito conforme as normas da revista Molecular and Cellular Biochemistry.

Os experimentos e as análises referentes a este trabalho foram desenvolvidos no Setor de Experimentação Animal e nos laboratórios de pesquisa do Laboratório de Parasitologia Veterinária (LAPAVET) sob a coordenação e orientação dos professores Dr^a. Silvia Gonzalez Monteiro e Dr. Daniel Roulim Stainki.

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Essa doença é importante problema de saúde pública e até o momento, os quimioterápicos existentes para o tratamento possuem toxicidade, efeitos colaterais e não atuam eficientemente na sua forma crônica. Por esse motivo, existem vários grupos de pesquisas no mundo que buscam alternativas no tratamento, controle e prevenção dessa doença, investigando terapias mais eficazes e menor efeito tóxico e colateral.

A ação do sistema imune do hospedeiro frente à infecção por *T. cruzi* é um dos principais fatores que determinam a ocorrência de diferentes manifestações clínicas da Doença de Chagas no homem. A utilização de meios que auxiliem na resposta imune e inflamatória (sistema purinérgico e colinérgico) do hospedeiro para que o mesmo consiga controlar a infecção parasitária é uma alternativa válida e eficiente, que auxilia no tratamento de inúmeras doenças.

A produção de Igy anti - *T. cruzi* é um importante recurso a ser estudado, considerando que as galinhas são refratárias à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e que esse parasito é capaz de estimular o sistema imune das aves a produzirem anticorpos IgY específicos contra o antígeno inoculado. Sendo assim, o presente trabalho representa uma nova opção de estudo, onde a imunoterapia baseada no uso de IgY anti – *T. cruzi* buscou desenvolver uma alternativa eficaz e inovadora no controle da Doença de Chagas, uma doença negligenciada, muitas vezes esquecida pelas indústrias farmacêuticas e que tem grande importância no contexto da saúde pública.

2. CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1 Panorama da Doença de Chagas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil é um dos países com maior ocorrência de Doenças Tropicais Negligenciadas. O termo “Negligenciada” se refere a doenças com predomínio em populações de baixo poder aquisitivo, que não atraem os interesses das grandes indústrias farmacêuticas (COURA; DE CASTRO, 2002; CHATELAIN, 2015).

As doenças negligenciadas de maior prevalência são: malária, doença de Chagas, leishmanioses, esquistossomose, dengue, hanseníase, onchocercose e filariose linfática. O impacto dessas doenças difere de região para região, mas apresenta uma estreita relação com as áreas de maior pobreza e menor desenvolvimento socioeconômico (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909); até o momento não existe vacina imunoprolifática para a tripanossomíase americana, tampouco tratamento quimioterápico efetivo, tendo em vista que as drogas normalmente usadas para tratar a infecção humana, possuem alta toxicidade e não previnem a progressão de sua forma crônica (URBINA; DO CAMPO, 2003).

A enfermidade é um importante problema de saúde pública, uma doença de origem parasitária que afeta cerca de 8 milhões de pessoas nas Américas do Sul e Central (OMS, 2013). Anualmente são relatadas aproximadamente 21 mil mortes associadas à doença. No Brasil cerca de 5 a 6 milhões de pessoas estão infectadas por essa doença, havendo aproximadamente seis mil óbitos por ano (SILVEIRA, 2000), sendo que predominam os casos crônicos decorrentes de infecções adquiridas no passado com, aproximadamente, três milhões de indivíduos infectados. Conforme inquérito sorológico, as maiores prevalências ocorrem nos estados do Rio Grande do Sul (8,8%), Minas Gerais (8,8%) e Goiás (7,4%) (RASSI; RASSI JR., 2008).

Aproximadamente 30% da população infectada desenvolve manifestações clínicas da doença, o que torna a patologia relevante em termos de saúde pública e impacto econômico (BRENER et al., 2000). No período de 2000 a 2013, foram registrados no Brasil 1.570 casos de Doença de Chagas aguda, onde 1081 (68,9%) foram transmitidos por via oral, 100 (6,4%) por transmissão vetorial, em 372 (23,7%) casos não foi identificada a forma de transmissão, e

em 17 (1,1%) casos por transmissões acidental, transfusional, vertical (gestacional) e outras. Apesar da ocorrência em menor proporção da transmissão vetorial (6,4%), observa-se a persistência desta forma a partir de 2006, ano da certificação de interrupção de transmissão por *Triatoma infestans* no país (SVS - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Considerado um importante problema de saúde pública na América Latina, a doença de Chagas é responsável por consideráveis taxas de morbidade e mortalidade (ZULANTAY et al., 2004). O panorama da enfermidade tem relação direta com as baixas condições socioeconômicas, o que leva a crer que a prevenção e controle da doença dependem das condições de saúde, alimentação, educação e acesso ao diagnóstico e tratamento eficiente (VIOTTI et al., 2009).

2.1.2 *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae. Sua forma circulante, tripomastigota é caracterizada pela existência de um único flagelo e um grande cinetoplasto que contém o DNA mitocondrial localizado próximo ao flagelo (TELLERIA et al., 2006). Este protozoário foi descoberto e descrito em 1909, pelo cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas e é o agente etiológico da Doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

As formas tripomastigotas (Figura 1) possuem aproximadamente 25 μm de comprimento, núcleo central, cinetoplasto localizado na porção posterior da célula e presença da membrana ondulante. As formas amastigotas, com aproximadamente 5 μm de comprimento, são caracterizadas pelo formato arredondado, cinetoplasto visível, corpo achatado com flagelo interno e ausência de membrana ondulante. As formas epimastigotas, com 20 a 40 μm de comprimento, se caracterizam pelo cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002).

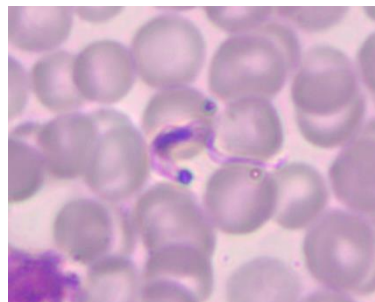


Figura 1 - Forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* em esfregaço sanguíneo. Fonte: Foto de Mateus Fracasso.

T. cruzi apresenta um ciclo de vida heteroxeno alternado entre hospedeiros invertebrados (barbeiros) (Figura 2), que atuam como vetores do parasito e uma grande variedade de hospedeiros, incluindo diversos mamíferos silvestres e domésticos e o homem. Nos hospedeiros vertebrados são observadas as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas. Enquanto nos hospedeiros invertebrados ocorrem as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (BRENER et al., 2000).

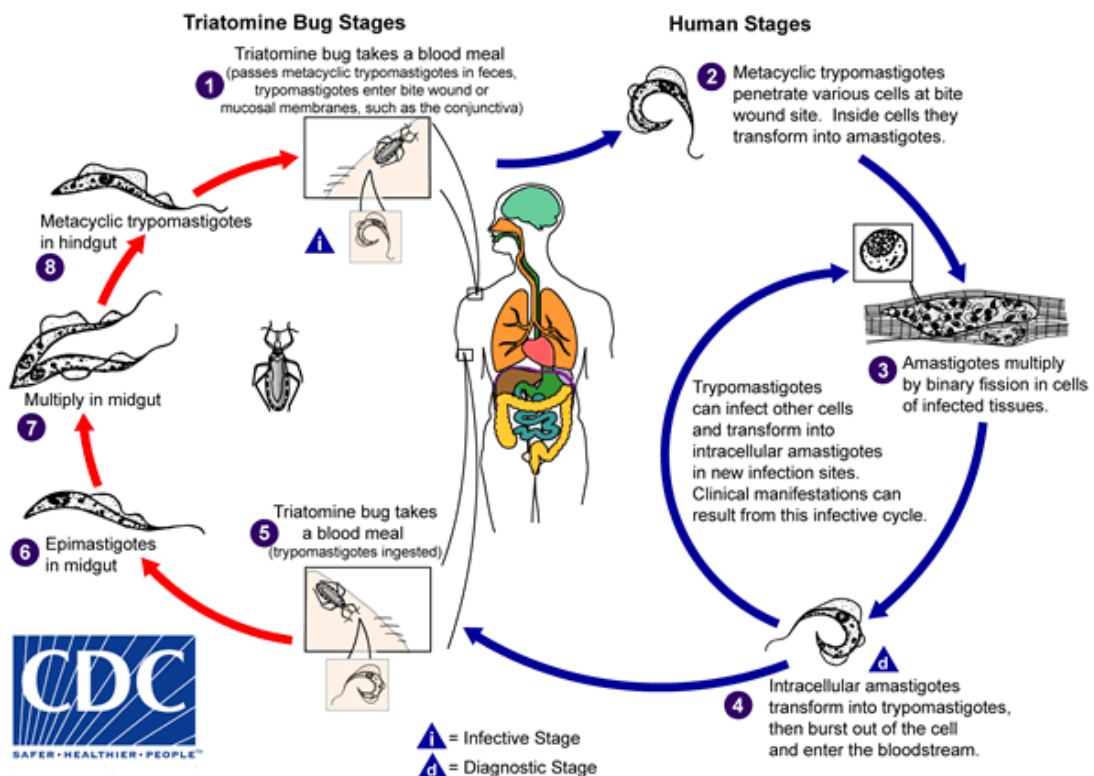


Figura 2 - Ciclo biológico do *T. cruzi*. Fonte: CDC - Centers for Disease Control - <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Durante o hematofagismo dos insetos da subfamília Triatominae, ocorre a ingestão de formas tripomastigotas presentes na circulação do hospedeiro mamífero. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* sofrem um arredondamento no estômago, originando formas esferomastigotas. Estas se transformam em epimastigotas ainda no estômago e se aderem à superfície do intestino médio e, após sucessivas divisões binárias, diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas, as quais são eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor (BRENER et al., 2000).

Estas formas tripomastigotas metacíclicas penetram no local da picada ou por qualquer solução de continuidade, e pela circulação invadem diversos tipos de tecidos onde realizam seu

ciclo intracelular, sob a forma amastigota. Após um período de três a quatro dias, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberadas ao meio extracelular, podendo migrar para a circulação sanguínea iniciando a próxima fase ciclo de infecção em outras células ou realizando o ciclo biológico quando ingerido por outro inseto vetor (BRENER, 2000; COURA; DIAS, 2009). Dependendo de características bioquímicas e moleculares, o parasito pode demonstrar tropismo preferencial por células cardíacas, digestivas ou musculares (ANDRADE et al., 1999).

Foi publicado um artigo que revelou uma nova visão sobre as formas infectivas de *T. cruzi*, abrindo portas para que a comunidade científica explorasse esse campo. Kessler (2017) e colaboradores relataram que as formas epimastigotas presentes no intestino dos insetos vetores descritas na literatura como não infecciosas para o hospedeiro mamífero, são capazes de infectarem o hospedeiro tanto em modelo *in vitro* como *in vivo*, abrindo portas para novas pesquisas (KESSLER et al, 2017).

T. cruzi é um táxon composto de diferentes cepas ou isolados que apresentam marcante variabilidade, com diferentes taxas de multiplicação, tropismo tecidual e suscetibilidade ao tratamento quimioterápico (ZINGALES et al., 1999; MACEDO et al., 2002). Foram demonstradas por Andrade (1974) e Andrade et al. (1985), as diferenças entre os grupos de cepas de *T. cruzi* e as respostas aos quimioterápicos. Na infecção com a cepa Y de *T. cruzi* foi verificado um elevado macrofagotropismo, alta virulência, com pico parasitêmico do 7º ao 12º dia e alta suscetibilidade ao tratamento com o benznidazol e o nifurtimox, enquanto que na infecção com as cepas 21 SF e Peruana observou-se curso parasitêmico mais lento e tropismo pelo miocárdio na fase aguda da infecção. A cepa Colombiana é altamente resistente ao tratamento, sendo que a parasitemia evolui lentamente atingindo níveis elevados ao 30º dia pós-infecção e apresenta um nítido miotropismo com envolvimento de músculos esqueléticos (ANDRADE et al., 1985).

2.1.4 Vetores e reservatórios

A Doença de Chagas é transmitida por insetos hematófagos conhecidos popularmente como “barbeiros”, os quais pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Existem mais de 130 potenciais espécies de vetores do *T. cruzi*, sendo as mais importantes: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (GAUNT; MILES, 2000; RASSI et al., 2000).

No boletim epidemiológico da Secretária de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, levantou-se que entre 2007 e 2011 foram registrados mais de 770.000 triatomíneos capturados por meio da vigilância entomológica passiva ou ativa dos Estados, destes, as espécies *T. vitticeps*, *R. robustus* e *P. lutzii* apresentaram as maiores taxas de infecção natural, 52,0%, 33,3% e 29,4%, respectivamente. No Rio Grande do Sul, as espécies mais encontradas foram o *T. rubrovaria* e *P. megistus* (Figura 3). Persistiram focos de *T. infestans* em quatro municípios do estado da Bahia e em 12 municípios do Rio Grande do Sul (Ajuricaba, Alegria, Coronel Barros, Doutor Maurício Cardoso, Giruá, Humaitá, Ijuí, Independência, Porto Mauá, Salvador das Missões, Santo Cristo e São José do Inhacorá) (SVS - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

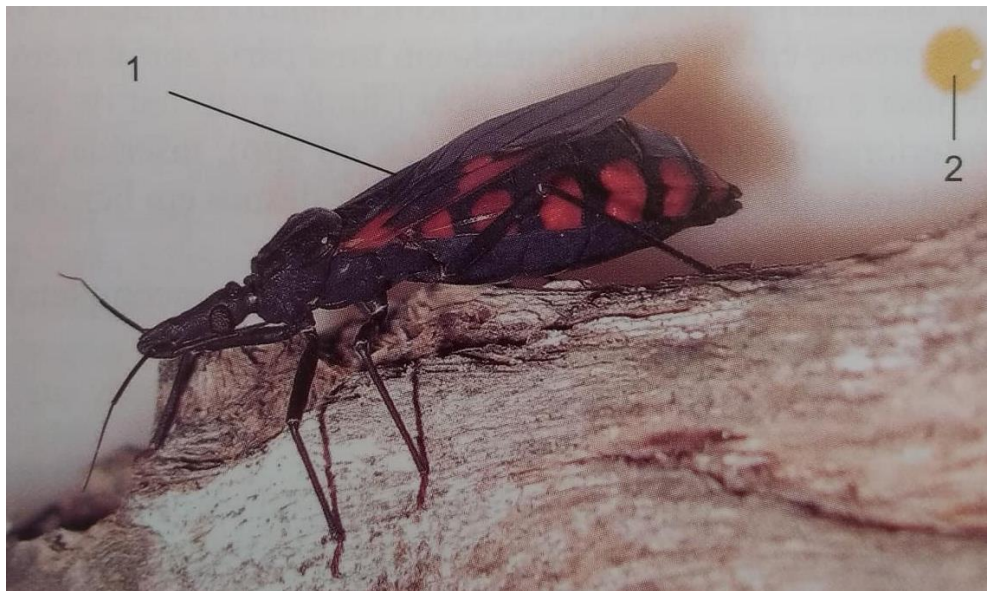


Figura 3- *Triatoma rubrovaria*, ingurgitada (1), e suas fezes após alimentação (2). Fonte: Monteiro, 2017.

Com relação aos reservatórios selvagens do parasito, mais de 100 espécies foram descritas entre marsupiais, xenartros, morcegos, carnívoros, lagomorfos, roedores e primatas não humanos. Os cães, gatos, ratos domésticos, camundongos e cobaias, nos países em que eles são criados como pets, são importantes reservatórios domésticos. Outros animais, como suínos e caprinos também podem ser infectados pelo *T. cruzi*, o que não ocorre com aves, répteis e peixes (DIAS; MACEDO, 2005).

Os cães têm sido envolvidos no ciclo de transmissão doméstica do *T. cruzi* em diferentes países. Estudos epidemiológicos demonstram a importância dessa espécie como fator de risco para a população humana, uma vez que esses animais apresentam uma capacidade muito maior para infectar triatomíneos, pois foi demonstrado em estudos que que o animal mordido com

maior frequência por insetos são cães (MONTENEGRO et al., 2002; CRISANTE et al., 2006). O cão é descrito como a única espécie animal capaz de desenvolver formas clínicas semelhantes às observadas em seres humanos (WILLIAMS et al., 1977; BARR et al., 1991).

As características clínicas da infecção chagásica natural em cães são pouco descritas e, embora essa espécie seja considerada uma vítima comum da doença, o maior conhecimento vem de infecções experimentais ou estudos *post mortem*, o que faz com que essa tripanossomíase seja raramente lembrada entre as causas de disfunção cardíaca na medicina veterinária (MONTENEGRO et al., 2002; CAMACHO; ALVES, 2007).

2.1.5 Formas da doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta um curso clínico de evolução lenta e crônica. Alguns dias após a infecção ocorre a fase inicial aguda, que dura poucos dias e pode ser caracterizada e diagnosticada por métodos de análises convencionais, onde é feita a pesquisa de formas tripomastigotas de *T. cruzi* no sangue (NETO et al., 1999). Na forma aguda da infecção, apesar da presença de parasitos na corrente sanguínea, a doença é dificilmente detectada e passa despercebida, tanto pelo paciente, como pelo médico, devido aos sinais clínicos inespecíficos, que podem ser confundidos com outras patologias (DIAS, 1997; OMS, 2002).

Nesta fase, menos de 10% das pessoas infectadas podem desenvolver o sinal de Romaña, sinal patognomônico da doença, que é caracterizado pelo edema bipalpebral e facial unilateral, causando diminuição da fenda palpebral, podendo ocorrer prurido, lacrimejamento e dor local leve, que pode ser acompanhada por um quadro febril em torno de 38°C (DIAS, 1990; RASSI et al., 2000).

A maioria dos casos não tratados evolui para a forma crônica indeterminada que consiste na presença da infecção, comprovada por testes sorológicos e/ou parasitológicos indiretos (hemocultura, xenodiagnóstico) e sem sintomatologia clínica associada (PRATA, 2001; COURA; BORGES PEREIRA, 2010).

A fase crônica da doença é silenciosa, podendo permanecer assintomática (fase indeterminada) ou evoluir para uma forma cardíaca, digestiva ou mista. Na forma cardíaca, ocorre principalmente miocardite crônica progressiva e fibrosante e/ou hipertrofia do coração, que pode se manifestar por meio de arritmias e insuficiência cardíaca congestiva. A forma cardíaca é a principal patologia responsável pela ocorrência de morte súbita, que é um fenômeno considerado como a principal causa de morte na doença de Chagas. Os pacientes com a forma digestiva apresentam alterações hipertróficas no esôfago (megaesôfago) e colón

intestinal (megacolon), que levam a disfagia e constipação intestinal, respectivamente. A forma mista é caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitantemente (BRENER et al., 2000; RASSI et al., 2000).

Na patogênese da doença, basicamente são três os processos patológicos que o parasito induz nos vertebrados: a resposta inflamatória, as lesões celulares e a fibrose. Estes processos podem ocorrer em diversos órgãos e tecidos dos vertebrados, aparecendo com maior frequência e intensidade no coração, tubo digestivo e sistema nervoso. Nas fases iniciais da primoinfecção, imediatamente após a inoculação, o parasito penetra preferencialmente em fibroblastos e macrófagos, aí permanecendo por 3 a 5 dias, em processo de multiplicação. Ao final deste período, a célula se rompe e/ou inicia sua degeneração. Os tripomastigotas resultantes vão para a corrente circulatória e invadem células vizinhas, reiniciando o ciclo de multiplicação intracelular.

Durante este processo, muitos restos celulares e parasitos mortos são lançados no interstício, elementos que irão desencadear a resposta inflamatória focal inicial. Com a repetição sucessiva do ciclo, aumentam progressivamente os focos inflamatórios. Embora o ciclo parasitário tenha continuidade na fase crônica, com repetidas reinvasões celulares, este fenômeno ocorre em uma intensidade muito menor, em razão da pressão que as defesas do hospedeiro passam a exercer sobre o *T. cruzi* (DIAS; MACEDO, 2005; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Os determinantes para a evolução da doença de Chagas resultam da quantidade de parasitos na infecção inicial, das formas infectantes no inóculo inicial, da linhagem do *T. cruzi*, reinfecção, da qualidade das linhagens e cepas e da resposta imune inicial e tardia do paciente (COURA, 2007).

2.1.6 Principais tratamentos

Desde a descoberta da doença de Chagas, vários grupos de pesquisa vêm testando diversas drogas contra o *T. cruzi* na tentativa de encontrar um medicamento eficaz para o tratamento. No entanto, mais de cem anos após a descoberta da doença, ainda não existe um medicamento totalmente eficiente na fase crônica da infecção (CASTRO et al., 2006). Embora progressos significativos na compreensão da biologia, bioquímica e epidemiologia de várias doenças tenham sido alcançados nos últimos 50 anos, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento destes agravos de saúde permanece inadequado, além disso, muitos dos fármacos desenvolvidos na primeira metade do século 20 apresentam significativos

riscos ao paciente em virtude dos seus efeitos colaterais e tóxicos (LABADIE; CHOI; AVERY, 2004).

No mundo, são utilizados dois fármacos na prática clínica: os fármacos nifurtimox e benznidazol. O primeiro não é mais usado no Brasil, devido aos seu efeito tóxico e o benznidazol, utilizado atualmente, também vem tendo relatados de toxicidade por diversos autores (CASTRO et al., 2006). Esses medicamentos são considerados mais eficazes na fase aguda da doença, com uma taxa de cura em torno de 80%, porém em pacientes que evoluíram para a fase crônica, a ação é bem menor e existem relatos de cepas resistentes a essas drogas (CLAYTON, 2010a).

Os mecanismos de ação desses compostos estão relacionados à geração de radicais livres e/ou metabólicos eletrofílicos. O efeito do benznidazol está mais associado aos metabólitos eletrofílicos, gerados a partir deste composto, sendo envolvidos na morte do *T. cruzi* através de sua ligação covalente a macromoléculas dos parasitas e/ou associação ao DNA, lipídeos e proteínas (MAYA et al., 2007).

Embora a OMS e grupos de pesquisas indiquem o tratamento com benznidazol a todos os pacientes na fase crônica da doença, este medicamento ainda está longe de tratar adequadamente pois apresenta baixa eficácia e ainda está associado a importantes efeitos colaterais, como excitações nervosas, depressão, anorexia, perda de peso, náuseas, vômitos, urticária, insônias e convulsões (CASTRO, 2000; CASTRO et al., 2006).

Somado a isso, a inexistência de vacinas associada à dificuldade do controle da transmissão e à complexidade biológica do agente fazem dos poucos quimioterápicos existentes, uma das únicas alternativas viáveis para o tratamento dos indivíduos infectados (BRENER, 2000). Sendo assim, torna-se imprescindível a busca por novas abordagens quimioterapêuticas específicas, a fim de desenvolver novos compostos tripanocidas e novas alternativas no controle e prevenção dessa doença (MESQUITA et al., 2007).

2.1.7 Resposta imune e inflamatória na Doença de Chagas

A ação do sistema imune no hospedeiro frente à infecção por *T. cruzi* é um dos principais fatores que determinam a ocorrência de diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas no homem. Além de reduzir a multiplicação do parasito durante a fase aguda, a ativação da resposta imunológica também pode determinar a patogenia nos tecidos na fase crônica (ANDRADE, 1999). Quando as formas infectantes são depositadas na pele dos hospedeiros mamíferos, elas encontram as primeiras barreiras do sistema imune inato, como a pele e

mucosas, macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK) e proteínas do sistema complemento (FERREIRA, 2002; TARLETON, 2007). A resposta imune inata é responsável por controlar a replicação do parasito no início da infecção, assim como preparar o sistema imune para gerar a resposta adquirida (GAZZINELLI; DENKERS, 2006; TARLETON, 2007)..

2.1.7.1 O sistema imune

Diversos estudos apontam para a participação de diferentes citocinas no controle da replicação do *T. cruzi* e no desencadeamento de processos inflamatórios. Durante a fase aguda da Doença de Chagas ocorre uma síntese sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (interferon-gama (IFN- γ); fator de necrose tumoral α (TNF- α); Interleucina 12 (IL-12) que são responsáveis por ativar componentes da imunidade inata, como células NK e macrófagos (LIEKE et al., 2006).

A função protetora das células NK está ligada à produção de IFN- γ e ativação de macrófagos (CARDILLO et al., 1996). Dessa forma, macrófagos ativados por IFN- γ e TNF- α são capazes de destruir os parasitos (SILVA et al., 1998) através de enzimas proteolíticas nos fagolisossomos e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente óxido nítrico (NO) (MURAD, 1994). Desta forma, a resposta imune gerada contra o *T. cruzi* na fase aguda, com infiltração de células T e macrófagos no coração parece ser essencial para o controle da replicação do parasito. Camundongos depletados destes tipos celulares apresentaram parasitismo cardíaco e miocardite exacerbados (TARLETON, 2007).

A ativação do sistema imune inato está aparentemente envolvida na resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. A síntese de IL-12 e TNF- α por macrófagos ativam células NK que passam a produzir IFN- γ e TNF- α . Essas citocinas favorecem a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ (linfócitos T auxiliar) com o fenótipo secretório de células Th1 (Linfócito T *helper* 1), que consiste na principal população celular produtora de IFN- γ , razão pela qual uma onda de ativação de células Th1 ocorre primeiro na infecção chagásica, predominando no início da fase aguda (ZHANG; TARLETON, 1996). Os macrófagos ativados pelo IFN- γ e TNF- α irão produzir NO, responsável pelo controle parcial da replicação do parasito na fase aguda da doença (VESPA et al., 1994; ALIBERTI et al., 1996).

A resposta imune adquirida, mediada por linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ (linfócito T citotóxico) e pelos anticorpos produzidos pelos linfócitos B, é essencial para o controle da parasitemia e para a sobrevivência do hospedeiro, embora esse controle seja parcial, não protegendo o hospedeiro contra reinfecções (ROTTENBERG et al., 1996).

Estudos da resposta imune humoral durante a infecção por *T. cruzi* demonstram que anticorpos estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra este parasito. No início da infecção, o parasito induz uma resposta imune humoral poli-isotípica com produção de IgM e IgG (BOUHDID et al., 1994), sendo que em sua maioria, reconhecem o epítipo galactosil α -(1→3) galactose, presente nas glicoproteínas ancoradas na membrana do parasito (ALMEIDA et al., 1994). Com a evolução do quadro, o nível de parasitemia será modulado principalmente por anticorpos da classe IgG que começam a surgir a partir da segunda semana de infecção e alcançam seus níveis máximos ao fim da terceira ou quarta semana, assim permanecendo nos indivíduos não curados até o fim da vida (KRETTLI; BRENER, 1982; BOUHDID et al., 1994).

O óxido nítrico (NO) tem um papel importante na resistência da célula hospedeira à infecção por protozoários, incluindo *T. cruzi*. Tem sido demonstrado, em modelo experimental de fase aguda, que camundongos deficientes na expressão da enzima sintase induzível de óxido nítrico (iNOS) são suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, proporcionando o aumento da parasitemia e consequente, mortalidade (WAGHABI et al., 2005).

2.1.7.2 Sistema colinérgico

O sistema colinérgico tem um papel fundamental em várias funções vitais, como o aprendizado, a memória e a organização cortical do movimento e até mesmo a frequência cardíaca (MESULAM et al., 2002). O conhecimento desse sistema, principalmente das vias de sinalização intracelular e intercelular, que se iniciam pela ativação dos receptores colinérgicos, tem sido utilizado no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para algumas doenças (TONIN, 2014).

As colinesterases são enzimas presentes em tecidos colinérgicos, e não colinérgicos, assim como no sangue e outros fluídos corporais (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989). A acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa, preferencialmente, ésteres com grupamento acetil, e a butirilcolinesterase (BChE;) hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina (TAYLOR; BROWN, 1999).

Há alguns anos, uma nova propriedade foi identificada para a AChE e BChE: a atuação dessas enzimas como marcadores inflamatórios (DAS, 2007). A via colinérgica anti-inflamatória é mediada pela acetilcolina (ACh), cuja atuação se dá pela inibição da produção de TNF, IL-1 e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF). A ACh regula os níveis da serotonina, dopamina e de outros neuropeptídeos e, portanto, modula tanto a resposta imune

como a neurotransmissão (RAMIREZ et al., 1997). A ativação de fibras do nervo vago aferente, por endotoxinas ou citocinas pró-inflamatórias, estimula a resposta anti-inflamatória hipotalâmica-pituitária-adrenal que conduzem os sinalizadores por meio do nervo vago eferente (DAS, 2007). Essa via tem sido chamada de via colinérgica anti-inflamatória, pois a ACh é o principal neurotransmissor envolvido, sendo considerado uma molécula anti-inflamatória, pois macrófagos expostos a esse neurotransmissor são eficientemente inibidos em secretar TNF α , IL-1 β , proteína do tipo *high mobility group box 1* (HMGB1) e uma série de outros mediadores inflamatórios (TRACEY, 2002; 2009).

Em estudo realizado por da Silva et al. (2011), foi avaliado a resposta da AChE em linfócitos de ratos infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi*, onde foi observado um aumento na atividade dessa enzima na fase aguda e uma diminuição na fase crônica da doença, sugerindo-se que o sistema colinérgico tem uma importância na modulação na resposta inflamatória na infecção de tripanossomatídeos.

2.1.7.3 Sistema purinérgico

O sistema purinérgico é conhecido por ser uma via de sinalização importante em diversos tecidos, desencadeando múltiplos efeitos celulares. É considerado um sistema primitivo, envolvido em muitos mecanismos neurais e não-neurais e em eventos de curta e longa duração, incluindo a resposta imune e a inflamatória, a dor, a agregação plaquetária, a vasodilatação mediada pelo endotélio, a proliferação e a morte celular (BURNSTOCK, 2004).

Três componentes principais fazem parte do sistema purinérgico: nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, seus receptores e ectoenzimas responsáveis pela regulação de níveis destas moléculas (YEGUTKIN, 2008). Os nucleosídeos (inosina e adenosina) são moléculas resultantes da união de uma base púrica ou pirimídica com uma pentose (ATKINSON et al., 2006). Os nucleotídeos de adenina como ATP, ADP e AMP são considerados importantes moléculas sinalizadoras em tecidos (YEGUTKIN, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina regulam processos relacionados à tromborregulação, modulam a resposta imune e sinalizam vias cruciais para o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (BURNSTOCK, 2002). Por exemplo, o ATP e a adenosina participam na ativação ou inibição do sistema imunológico, onde o ATP apresenta funções pró-inflamatórias, pois é responsável pela estimulação e a proliferação de linfócitos, células envolvidas na liberação de citocinas (BOURS

et al., 2006), enquanto isso, a adenosina apresenta-se como uma molécula anti-inflamatória (GESSI et al., 2007).

O controle dos níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina são realizados por enzimas ancoradas na membrana celular ou meio intersticial. Dentre estas enzimas destacamos as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), ectonucleotídeo pirofosfatase (E-NPPs), 5'-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA) (YEGUTKIN, 2008). Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP as quais hidrolisam o ATP e ADP, formando o AMP, que em seguida é hidrolisado pela 5'-nucleotidase formando adenosina. Finalmente, a adenosina é desaminada pela ADA em inosina (YEGUTKIN, 2008).

Em estudo que avaliou a resposta do sistema purinérgico em pacientes diagnosticados com a doença de Chagas, foi observado uma diminuição da atividade das enzimas E-NTPDase e da ADA nos linfócitos desses pacientes, sugerindo que esse sistema está envolvido na manutenção do parasitismo e na integridade dos tecidos destes pacientes. Em um estudo que utilizou as plaquetas desses pacientes também se observou uma diferença da atividade dessas enzimas do sistema purinérgico, indicando mais uma vez que esse sistema está envolvido no sistema fisiológico e imune desses pacientes bem como na trombo regulação (SOUZA, 2011).

Portanto, os sistemas imune, colinérgico e purinérgico possuem um papel importante no combate à Doença de Chagas e podem ser utilizados como alvo na investigação de tratamento e controle dessa doença.

2.2 IMUNOGLOBULINA Y (IgY)

A capacidade dos anticorpos de reconhecerem moléculas com alta especificidade faz deles uma ferramenta indispensável em laboratórios, principalmente na pesquisa de novos métodos para diagnósticos, terapias e vacinas. O anticorpo aviário também chamado de imunoglobulina Y (IgY) é uma molécula com elevada especificidade para a ligação e inativação de substâncias externas, tais como: moléculas tóxicas ou antigênicas, que são capazes de invadir o corpo (CHALGHOUMI et al., 2009).

A denominação IgY refere-se a imunoglobulina da gema do ovo (Y = yolk). A transferência de imunidade da galinha para o embrião, por meio de anticorpos presentes na gema foi demonstrada pela primeira vez em 1893 por Klemperer.

Existem três isotipos de anticorpos aviários conhecidos como, IgY, IgM e IgA, sendo que a IgY é a imunoglobulina mais abundante no soro de aves, podendo ser isolada também de

anfíbios e répteis, apresentando função equivalente a IgG nos mamíferos, contudo a IgA e IgM são homólogas as de mamíferos (SOARES, 2013; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A IgY é continuamente sintetizada pela ave, secretada para o sangue e transferida para a gema de ovo, onde se acumula, através de um receptor na superfície da membrana da gema, específico para a translocação de IgY (WARR et al., 1995; MORRISON et al., 2002; TESAR et al., 2008), enquanto que IgA e IgM são depositadas na clara de ovo (ROSE et al., 1974). Este acúmulo de IgY na gema é responsável pela imunidade passiva a embriões e neonatos, pois a produção de IgY nos pintinhos, começa apenas seis dias após a eclosão (ZHANG, 2003; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A estrutura geral do IgY é semelhante a IgG de mamíferos (Figura 4), com duas cadeias pesadas e duas leves, porém apresenta diferença em suas características bioquímicas e funções imunológicas que se devem a sequência de aminoácidos e diferenças estruturais (ZHANG, 2003; KARLSSON et al., 2004). A IgY apresenta massa molecular em torno de 180 kDa, sendo mais pesada que a IgG de mamíferos (aproximadamente 150 kDa) (SHIMIZU et al., 1993). A cadeia leve pode pesar 18 kDa (SUN et al., 2001) até 21 kDa (HATTA et al., 1993). A cadeia pesada tem massa molecular entre 65-105 kDa e apresenta um domínio constante a mais em relação à IgG dos mamíferos (BIZANOV; JONAUSKIEN, 2003; NARAT, 2003).

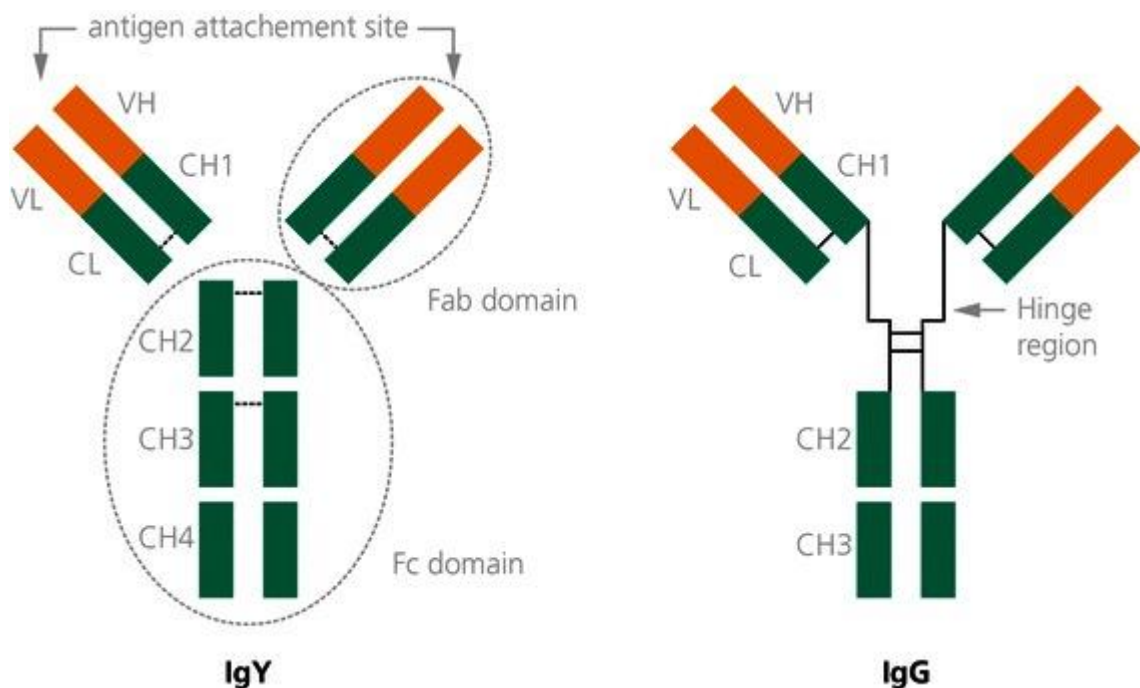


Figura 4 - Estrutura de IgY aviária versus IgG de mamífero. Fonte: MULLER et al., 2015.

A distância filogenética entre galinhas e mamíferos torna possível a produção de anticorpos contra proteínas altamente conservadas de mamíferos e ainda é necessária uma quantidade menor de antígeno para produzir uma resposta imune eficiente (LARSSON et al., 1998). A distância evolutiva também determina a ausência de reação cruzada entre IgG de mamíferos e IgY, o que reforça as vantagens da utilização de IgY como anticorpo primário em alguns tipos de imunodiagnóstico (HADGE; ANBROSUIUS, 1984; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

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

Além dos benefícios citados acima, inúmeras outras vantagens em se produzir anticorpos em galinhas ao invés de mamíferos foram elencadas por Carlander et al. (1999), Karlsson et al. (2004), Contreras et al. (2005) e Schade et al. (2005), que incluem:

- A IgY aviária combina as funções da IgG e IgE de mamíferos, promovendo proteção contra infecções, como também pode ser mediadora da anafilaxia;
- Os anticorpos da galinha não têm reações cruzadas com a IgG de mamíferos (fator reumatoide), e não atacam os glóbulos vermelhos desta espécie;
- 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 e gerar resultados subestimados. A IgY é incapaz de ativar as proteínas do sistema complemento do soro de coelhos, cobaias, bovinos, camundongos, caprinos, cães e gatos, por não se ligar ao componente C1;
- Permite a obtenção de maior quantidade de anticorpos devido à distância filogenética entre aves e mamíferos. Os anticorpos produzidos possuem alta afinidade e avidéz;
- Anticorpos de galinha reconhecem epítomos diferentes dos anticorpos de mamíferos, aumentando assim o número de anticorpos diferentes e conseqüentemente a possibilidade de ligação;
- 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;

- As imunoglobulinas produzidas são altamente específicas;
- Podem ser liofilizadas, possibilitando longa vida nas prateleiras;
- 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;
- Quando comparado a IgG dos mamíferos, o rendimento da IgY pode ser 5 a 10 vezes superior, dependendo do adjuvante utilizado e do protocolo de imunização e purificação;
- 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.

2.2.1 Produção, extração e purificação da IgY

As imunoglobulinas aviárias podem ser usadas para a produção de anticorpos a partir do momento em que as aves iniciam a postura (SAMPAIO, 2014a). O desenvolvimento e a produção de anticorpos IgY podem ser obtidos através da apresentação de antígenos complexos (vírus, bactérias e parasitos) ou simples (proteínas, polissacarídeos e toxinas) (SCHADE et al., 2005).

As galinhas (*Gallus domesticus*) são consideradas o modelo animal ideal para a produção de IgY, podendo ser utilizadas durante todo o seu período de postura de ovos (MUNHOZ et al., 2014). Diferentes protocolos de imunização dessas aves já foram descritos, e baseiam-se na inoculação do antígeno de interesse mais o adjuvante em uma proporção de 1:1, sendo que a imunização por método de inoculação pela via intramuscular, frequentemente resulta em níveis mais altos de anticorpos no 28º dia após a imunização (WOOLEY; LANDON, 1995).

O número total de imunização necessário, dependerá do tipo e dose do antígeno, bem como sobre o adjuvante empregado (MUNHOZ et al., 2014); sendo que, atualmente, o adjuvante incompleto de Freund (AIF) é o mais utilizado.

A imunoglobulina aviária exibe alta avidéz (10^9 L/mol) mesmo após a primeira imunização (WOOLEY; LANDON, 1995). 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. Larsson et al. (1998) estudaram a resposta imunológica em galinhas utilizando pequenas quantidades de antígenos de mamífero e observaram boa resposta imunitária obtida com a utilização de 0,1- 1.0µg.

O volume das administrações varia entre 0,5 a 1 ml e a via de aplicação usual é a intramuscular, preferencialmente no musculo peitoral (Figura 5). 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).



Figura 5 - Inoculação intramuscular em galinha. Fonte: Arquivo pessoal

Atualmente, existem vários métodos descritos de isolamento e purificação da IgY da gema de ovo (CARLANDER, 2002). A escolha do método ideal vai depender de várias fatores como o rendimento e grau de pureza desejado, aplicação final do IgY, bem como dos custos de material, tecnologia e escala de extração. O processo de extração sempre inicia pela separação da gema e da clara em seguida, exigem uma etapa inicial de deslipidação, para extrair os lipídeos e as lipoproteínas insolúveis (KO; AHN, 2007; TAN et al., 2012), por último um passo subsequente de separação. Estes métodos de isolamento da imunoglobulina podem ser realizados por técnicas de precipitação com sais (DEIGNAN, 2000; CHACANA et al., 2003); técnicas cromatográficas (MEULENAER & HUYGHEBAERT, 2001); ou ultrafiltração (KIM; NAKAI, 1998).

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 amazonensis*, 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).

A quantidade de IgY na gema é influenciada pela 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. Em estudo de Sampaio (2014), ao utilizar o método descrito por Polson et al. (1980), foram obtidos em média 9,46 mg/mL de proteína total e 2,87 mg/mL de imunoglobulina específica anti-*T.evansi*, sendo a média de IgY obtida neste experimento, similar aos valores descritos por Contreras et al. (2005), Malekshahi et al. (2011) e Paula et al. (2011), usando PEG-6000.

O rendimento protéico do purificado de IgY anti-*T. evansi* foi superior aos encontrados por Garcia et al. (2005) e Ferreira Júnior et al (2012) ao utilizarem sais de sódio e amônio para precipitação. Isto leva a crer que o método descrito por Polson et al. (1980) tem rendimento protéico similar ou, até mesmo, superior aos métodos de precipitação com sulfato de sódio e sulfato de amônio.

Anticorpos IgY contra *Trypanosoma cruzi*, já foram produzidos e purificados por Contreras et al. (2005), que imunizaram galinhas com formas epimastigotas do protozoário, via intradérmica, e avaliaram três métodos de purificação da imunoglobulina, sendo o método do clorofórmio-PEG o de melhor rendimento, facilidade de execução e baixo custo. Garcia et al. (2005) desenvolveram anticorpos IgY anti-*Giardia duodenalis* e também avaliaram diferentes métodos de purificação a partir da gema do ovo e as maiores concentrações de imunoglobulina foram obtidas pela deslipidação, com dextran sulfato-cloreto de cálcio e precipitação com sulfato de amônio.

2.2.2 Usos da tecnologia IgY

Atualmente, a maioria das pesquisas envolvendo a tecnologia IgY abordam duas grandes linhas: a produção de IgY para ser utilizada no imunodiagnóstico e a produção de IgY para utilização na imunização passiva, tanto para ser utilizado na prevenção como na terapia como imunoterápico (SANTOS, 2012).

Ferreira Junior et al. (2012) descreveram a produção, caracterização e aplicações da IgY contra *Toxoplasma gondii*. Os autores relataram alta especificidade e avidéz dos anticorpos produzidos e demonstraram a capacidade da imunoglobulina em detectar formas de *T. gondii*

em seções embebidas em parafina e cultura celular, indicando o seu uso para o desenvolvimento de testes diagnósticos.

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. O exame sorológico usado para diagnóstico, 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, Wang et al. (2012), concluíram que a IgY de galinhas além de ligar-se especificamente ao antígeno, foi mais sensível que a IgG de coelhos.

Cai et al. (2012) utilizaram a tecnologia IgY associada ao ELISA, como método diagnóstico para infecções por *Schistosoma japonicum* e compararam a sensibilidade e a especificidade do método com a técnica tradicional, utilizando anticorpos de mamíferos e concluíram que o método desenvolvido é razoavelmente sensível e específico. 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.

Foi obtida proteção eficaz contra *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, rotavírus, coronavírus, utilizando anticorpos derivados de gema de ovo, administrados de forma passiva (CHALGHOUMI et al., 2009). Lee et al. (2009a, 2009b) ao avaliarem IgYs produzidas a partir de diferentes espécies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. tenella* e *E. maxima*), afirmaram que a imunização passiva de aves fornece significativa proteção frente ao parasito.

Vega et al. (2011, 2015) avaliaram o grau de proteção e a imunomodulação induzida, através da alimentação a base de leite suplementado com 6% de gema de ovo, contendo IgY anti-BRV (rotavírus bovino) e o tratamento oral com extrato de IgY anti-BRV, durante sete dias em bezerros recém-nascidos e experimentalmente infectados. A partir destes tratamentos, foi constatado que estas metodologias representam uma importante estratégia na prevenção da diarreia produzida por este vírus.

De acordo com Li et al. (2016), a IgY foi capaz de modular uma resposta imune específica na mucosa intestinal de ratos infectados experimentalmente com *Salmonella typhimurium*, e tratados oralmente por três dias com 20mg/mL de IgY específica anti- *S. typhimurium*.

A atividade terapêutica de imunoglobulinas aviárias é relatada por Mulvey e colaboradores (2011), frente *Clostridium difficile*. Ao utilizar uma concentração de 45 mg de purificado de IgY, por 10 dias consecutivos, os autores obtiveram aumento da sobrevivência de hamsters em relação ao grupo controle. Malekshahi et al. (2011) utilizando doses de 60 mg de IgY, via oral, em ratos, por um período de 28 dias obtiveram sucesso na inibição de *Helicobacter pylori* e considerável redução da inflamação nos tecidos estomacais, concluindo que a imunoterapia pode ser uma importante alternativa ao uso de terapias antimicrobianas.

Xu et al. (2012) avaliaram a eficácia *in vitro* e *in vivo* da imunoglobulina contra a doença periodontal causada por *Fusobacterium nucleatum*, e obtiveram inibição da formação do biofilme 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 a cada quatro dias, e conclui-se que, a IgY preveniu a evolução da doença periodontal por diminuir a perda óssea alveolar.

Em trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do LAPAVET, da UFSM, foram produzidas e purificadas IgY através da inoculação de formas tripomastigostas de *Trypanosoma evansi*. Neste estudo, foi constatado que a IgY anti – *T. evansi*, administrada profilaticamente e, após a infecção experimental em uma dose de 30mg/kg, promove um aumento do período pré patente e longevidade em ratos infectados experimentalmente com *T. evansi*, e que a associação da IgY ao tratamento farmacológico reforça o sistema imunológico de animais infectados, desenvolvendo melhor resposta terapêutica ao tratamento instituído (SAMPAIO et al., 2014).

O objetivo desta tese foi desenvolver e produzir uma Imunoglobulina Y específica anti-*T. cruzi*, por meio de uma metodologia simples e eficaz. Além disso, objetivou-se avaliar a eficácia e a modulação da resposta imune e inflamatória da imunoterapia com esses anticorpos aviários (IgY) específicos contra *T. cruzi*, em camundongos experimentalmente infectados.

3. CAPÍTULO II - ARTIGO 1

TÍTULO: Avian antibodies (igy) against *Trypanosoma cruzi*: purification and characterization studies

Artigo publicado em:

Journal of Immunological Methods

Journal of Immunological Methods 449 (2017) 56–61



Contents lists available at ScienceDirect
Journal of Immunological Methods
 journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim



Research paper

Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies



Thirssa H. Grando^{a,*}, Matheus D. Baldissera^a, Mariângela F. de Sá^a, Guilherme M. do Carmo^a, Bianca Carolina Z. Porto^a, Gisele S.V. Aguirre^a, Maria Isabel Azevedo^a, Francieli P.K. de Jesus^a, Janio M. Santurio^a, Michele R. Sagrillo^b, Lenita Moura Stefani^c, Sílvia Gonzalez Monteiro^{a,*}

^a Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal Santa Maria – UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Laboratory of Cell Culture, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brazil

^c Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 12 June 2017
 Received in revised form 7 July 2017
 Accepted 7 July 2017
 Available online 8 July 2017

Keywords:
 Chagas disease
 Avian immunoglobulins
 Egg yolk antibodies
 Cytotoxic

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a flagellated protozoan belonging to the Trypanosomatidae family, the etiologic agent of Chagas disease. Currently, there is neither a licensed vaccine nor effective treatment, characterizing an unmet clinical need. The IgY refers to the egg yolk immunoglobulin (Y = yolk) and its production and use are subjects of many studies due to the diversity of its diagnostic and therapeutic applications. Several researchers have shown that the use of specific IgY may prevent and/or control infectious and parasitic diseases. Based on these evidences, the aim of this study was to immunize chickens with trypomastigotes of *T. cruzi* in order to produce highly effective and pure antibodies (IgY), as well as extract, characterize, quantify, and verify cytotoxic effects of IgY anti-*T. cruzi*. After the induction of IgY production by chickens, the eggs were collected and the IgY was extracted by method of precipitation of polyethylene glycol 6000. The IgY anti-*T. cruzi* characterization was performed using polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), western-blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Moreover, the cytotoxic or proliferative effects of IgY anti-*T. cruzi* was verified by MTT assay. The concentration of IgY in yolk was 8.41 ± 1.47 mg/mL. The characterization of IgY revealed bands of stained peptides with molecular weight between 75 and 50 kDa and 37 and 25 kDa. In the ELISA test was observed that there was an antigen-antibody reaction throughout the sample period. The concentrations of 1, 5 and 10 mg/mL of IgY anti-*T. cruzi* presented no cytotoxic or proliferative effects in mononuclear and VERO cells in vitro. The results indicated that *T. cruzi* is able to generate a high production of specific immunoglobulins in chickens, it did not cause damage to the cell membrane and no proliferative effect.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease is a neglected tropical disease caused by *Trypanosoma cruzi*, an obligatory intracellular parasite widely spread in Latin America (Basso and Marini, 2015). This disease constitutes a serious worldwide public health issue (Coura and Dias, 2009), that causes a chronic parasitic condition characterized by a life-long infection of the host (Martin et al., 2015). Clinically, this disease may have an acute phase that lasts for 1 to 4 months characterized by patent parasitemia, and a chronic phase with a life-long phase including a subpatent parasitemia and tissue parasitism (Dias, 1997; Rassiet al., 2010). The diagnosis of *T. cruzi* infection during the acute phase is carried out by the

direct detection of circulating parasites. However, during the chronic phase, the diagnosis is performed by conventional serologic assays (WHO, 2002; Otani et al., 2009; Carlier and Torrico, 2003).

Chemical drugs, such as benzimidazole and nifurtimox, are still used as the method of choice in controlling this disease (Urbina and Docampo, 2003). However, the treatment with benzimidazole has many side effects, prolonged treatment time, and low and variable efficacy in the chronic phase of this infection, which is the most prevalent form of the disease (Urbina and Docampo, 2003; Viotti et al., 2009). Thus, the search for more effective medications with less adverse effects is one of the main focuses of many studies (Coura, 2007). In this context, the search for alternative models for the treatment and diagnosis of *T. cruzi* is essential, mainly because it is a disease considered neglected. Specific antibodies for immunotherapy against this parasite might be a therapeutic alternative in controlling and/or prevention infections. Immunoglobulin Y (IgY) are polyclonal antibodies obtained from egg yolk (yolk = y) of immunized chickens. Such molecules have high

* Corresponding authors at: Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal Santa Maria, Brazil.
 E-mail addresses: thirssa.grando@ufsm.br (T.H. Grando), sgmonteiro@ufsm.br (S.G. Monteiro).

Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: purification and characterization studies

Thirssa H. Grando^{a*}, Matheus D. Baldissera^a, Mariângela F. de Sá^a, Guilherme do Carmo^a, Bianca C. Z. Porto^a, Gisele V. Aguirre^a, Maria Isabel de Azevedo^a, Francielli P. K. de Jesus^a, Janio M. Santurio^a, Michele R. Sagrillo^b, Lenita Moura Stefani^c, Silvia Gonzalez Monteiro^{a*}

a Department of Microbiology and Parasitology– UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

b Laboratory of Cell Culture, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brazil

c Department of Animal Science - UDESC, Chapecó, SC, Brazil.

Abstract

Trypanosoma cruzi is a flagellated protozoan belonging to the Trypanosomatidae family, the etiologic agent of Chagas disease. Currently, there is neither a licensed vaccine nor effective treatment, characterizing an unmet clinical need. The IgY refers to the egg yolk immunoglobulin (Y = yolk) and its production and use are subjects of many studies due to the diversity of its diagnostic and therapeutic applications. Several researchers have shown that the use of specific IgY may prevent and/or control infectious and parasitic diseases. Based on these evidences, the aim of this study was to immunize chickens with trypomastigotes of *T. cruzi* in order to produce highly effective and pure antibodies (IgY), as well as extract, characterize, quantify, and verify cytotoxic effects of IgY anti-*T. cruzi*. After the induction of IgY production by chickens, the eggs were collected and the IgY was extracted by method of precipitation of polyethylene glycol 6000. The IgY anti-*T. cruzi* characterization was performed using polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), western-blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Moreover, the cytotoxic or proliferative effects of IgY anti-*T. cruzi* was verified by MTT assay. The concentration of IgY in yolk was 8.41 ± 1.47 mg/mL. The characterization of IgY revealed bands of stained peptides with molecular weight between 75 and 50 kDa and 37 and 25 kDa. In the ELISA test was observed that there was antigen-antibody reaction throughout the sample period. The concentrations of 1, 5 and 10 mg/mL of IgY anti-*T. cruzi* presented no cytotoxic or proliferative effects in mononuclear and VERO cells in vitro. The results indicated that *T. cruzi* is able to generate a high production of specific immunoglobulins in chickens, it did not cause damage to the cell membrane and no proliferative effect.

Keywords: Chagas disease; avian immunoglobulins; egg yolk antibodies; cytotoxic.

1. Introduction

Chagas disease is a neglected tropical disease caused by *Trypanosoma cruzi*, an obligatory intracellular parasite widely spread in Latin America (Basso and Marini, 2015). This disease constitutes a serious worldwide public health issue (Coura and Dias, 2009), that causes a chronic parasitic condition characterized by a life-long infection of the host (Martin et al. 2015). Clinically, this disease may have an acute phase that lasts for 1 to 4 months characterized by patent parasitemia, and a chronic phase with a life-long phase including a subpatent parasitemia and tissue parasitism (Dias, 1997; Rassi et al. 2010). The diagnosis of *T. cruzi* infection during the acute phase is carried out by the direct detection of circulating parasites. However, during the chronic phase, the diagnosis is performed by conventional serologic assays (WHO, 2002; Otani et al. 2009; Carlier et al. 2011).

Chemical drugs, such as benznidazol and nifurtimox, are still used as the method of choice in controlling this disease (Urbina and Docampo, 2003). However, the treatment with benznidazol has many side effects, prolonged treatment time, and low and variable efficacy in the chronic phase of this infection, which is the most prevalent form of the disease (Urbina and Docampo, 2003; Viotti et al., 2009). Thus, the search for more effective medications with less adverse effects is one of the main focuses of many studies (Coura, 2007). In this context, the search for alternative models for the treatment and diagnosis of *T. cruzi* is essential, mainly because it is a disease considered neglected. Specific antibodies for immunotherapy against this parasite might be a therapeutic alternative in controlling and/or prevention infections. Immunoglobulin Y (IgY) are polyclonal antibodies obtained from egg yolk (yolk=y) of immunized chickens. Such molecules have high specificity for binding and inactivating foreign substances, such as antigenic molecules that are able to invade the body (Karlsson et al. 2004). For this reason, IgY has been used for diagnosis and therapy (Reilly et al. 1997).

The IgY technology allows to obtain antibodies with high affinity and avidity (Karlsson et al. 2004). In addition, IgY shows numerous advantages when compared to mammalian antibodies, such as: similar functions of the mammalian IgG and IgE, no cross reaction with mammalian IgG, do not attack red blood cells, do not activate the complement system and the coagulation cascade. Furthermore, chickens are more able to produce antibodies than rabbits, goats, horses or rodents (Sampaio et al. 2014b; Contreras et al. 2005; Chacana et al. 2004).

Therefore, the aim of this study was to synthesize, extract, characterize and quantify antibodies IgY anti-*T. cruzi* extracted from eggs yolk of chickens immunized with trypomastigotes of *T. cruzi*. Moreover, effects of IgY anti-*T. cruzi* *in vitro* against mononuclear and VERO cells were performed, in order to evaluate possible colateral effects.

2. Materials and methods

All procedures in this study were approved by the Animal Welfare Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), under protocol number 5699170915.

2.1 IgY production, extraction and purification

2.1.1 The antigen

Trypomastigotes forms of *T. cruzi* (strain Y) was used as antigen to immunize the chickens, according the method described by Sampaio et al. (2014b), with some adaptations for *T. cruzi*, as follows below: cryopreserved trypomastigotes were inoculated into mice for reactivation and multiplication of strain, and blood samples were collected at the peak of parasitemia. In order to separate the parasites, blood was diluted in DMEM medium (1:1 v/v), followed by centrifugation (400 g for 10 min). The supernatant, rich of trypomastigotes, was collected and the amount of antigen was determined, aliquoted, and cryopreserved until use.

2.1.2 Chicken immunization protocol

The chicken immunization protocol was as described by Sampaio et al. (2014b). Briefly, a solution containing trypomastigotes of *T. cruzi* was added to incomplete Freund's adjuvant (Difco®) at a 1:1 ratio, with a final volume of 1.0 mL. It was injected intramuscularly at five different sites of the pectoral muscle of two 25-week-old New Hampshire chickens. The interval between immunizations was set as 10 days (days 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70 and 80), totaling eight inoculations, being 2.4×10^4 trypomastigotes for the first 4 inoculations and 7.2×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* for the other 4 inoculations. Chicken eggs were collected from the third week post-immunization and stored at 4 °C until they were processed. One chicken was not immunized and its eggs were used as controls.

2.1.3 Extraction of immunoglobulin IgY anti-*T. cruzi*

Extraction was performed by the method of precipitation of polyethylene glycol 6000 (PEG-6000) (Polson et al. 1980). Firstly, the yolk was gently separated and its fat was removed using PBS (1:2 ratio) and PEG 6000 at a final concentration of 3.5%. This mixture was held in a roller mix for 30 min and then centrifuged for 80 minutes at 4.000 rpm and 4 °C. The supernatant was removed, filtered in filter paper (28 µm), and the final volume measured. PEG 6000 was once again added (8.5 %), and the solution kept in a roller mix for 10 min, and centrifuged for 30 min at 4000 rpm and 4 °C. In this stage the supernatant was discarded and

the pellet was dissolved in 10 mL of PBS. A final step using PEG 6000 (12 %) was performed as described previously. The final pellet was dissolved in 2.4 mL of PBS, and this solution was dialyzed overnight in saline solution (0.1 %) at 4 °C. A final dialyzation was performed for three more hours, the extract was collected, placed in tubes, stored at -20 °C, and lyophilized until further use.

2.1.4 IgY specific concentration

The specific concentration of IgY anti-*T. cruzi* was measured according to the Lambert-Beer's law using an extinction coefficient of 1.33 for IgY (Polson et al. 1980). The protein content of the samples was measured by the method of Bradford (1976), with Coomassie blue using bovine serum albumin as standard, and monitored by measuring the maximum absorbance of the solution at 595 nm.

2.2 Characterization of IgY

The IgY was characterize and evaluate regarding its specificity and sensibility to the antigen, as follow below:

2.2.1 The polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The IgY samples were analyzed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) at 12 % (Bernardo, 2009). For this, 20 µL of the IgY samples collected from chickens on the week 3, 5, 7, 9, 11 and 13 post-immunization and a control sample of non-immunized chicken were mixed with 20 µL of the buffer (Laemmli Sample Buffer – BioRad®), boiled in a water bath at 95 °C for 5 min, and applied to the stacking gel wells in a final volume of 5 µL. The electrophoresis was submitted to a current of 70 V for 30 min and 120 V for 120 min. Finally, the gel was colored with Coomassie Blue R (Sigma-Aldrich®) for at least 1 hour, and treated with a decolorizing solution (glacial acetic acid and methanol)

2.2.2 Western blot

Western blot was performed as described by Bernardo (2009). Initially, electrophoresis was performed under the same conditions as described above. Two gels were prepared: one for IgY samples (the same used in 2.2.1) and a second gel with samples of the antigen used to immunize chickens (trypomastigotes of *T. cruzi*) and samples of trypomastigotes of *Trypanosoma evansi*. After protein separation in polyacrylamide gels, they were

electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane of 0.45 micrometre (BioRad) using a current of 140 V for 120 min. Finally, the membranes were removed carefully, and blocked overnight in a PBS-Tween solution with 5% skimmed milk powder. The membrane containing the IgY was washed three times with PBS-Tween, and incubated for 1 h with rabbit anti-chicken IgY peroxidase conjugate, diluted in PBS-Tween (1:2000) (Sigma-Aldrich®). The nitrocellulose membrane containing the antigens of *T. evansi* and *T. cruzi* was washed three times with PBS-Tween and incubated for one hour with the newly synthesized IgY anti-*T. cruzi* and the primary antibody control IgY. The membrane was washed again three times with PBS-Tween, incubated for one hour with rabbit anti-chicken antibody peroxidase conjugated. Membranes were washed three times with PBS-Tween, and finally incubated with a developing solution (DAB–diaminobenzidine, Tris HCl, Nickel sulfate 0.3 %, and H₂O₂) for the visualization of any reactive band.

2.2.3 ELISA

The Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) was performed as described by Sampaio et al. (2014b). A 96-well ELISA plate was coated with *T. cruzi* antigen (1 µg/well) previously diluted in 0.05 M of carbonate buffer (pH 9.6). The plates were incubated overnight at 4 °C. After incubation, the plates were washed four times with saline buffer (SB - pH 7.2). Firstly, it was blocked with 100 µL of fetal bovine serum (FBS)-(Cripion®, SP, Brazil) (SB and FBS) per well, and incubated at 37 °C. After this, the plates were washed four times with SB-Tween (SB pH 7.4 with 0.05 % Tween 20). IgY samples extracted at different weeks post-immunization (3, 5, 7, 9, 10, 11, 13) were diluted (1:1000, 1:2000, and 1:5000) in FBS and SB, distributed over the plates (100 µL/well), and incubated for 1 h at 37 °C. Then, plates were washed four times. Each sample tested was submitted to three repetitions per plate and two repetitions inter-plates. After incubation with IgY (primary antibody), the plates were washed four times with SBS-Tween and submitted to an incubation with a secondary antibody (rabbit anti-chicken IgY peroxidase conjugate, Sigma-Aldrich®) diluted at 1:3000 for 1 h at 37 °C. Finally, the plates were washed again, and 100 µL of the chromogenic substrate (orthophenylenediamine, OPD) was added. After 15 minutes, the reaction was blocked with 10 µL of H₂SO₄ and the reading was performed at 490 nm using a spectrophotometer.

2.3 Evaluation of IgY cytotoxicity

In order to evaluate whether IgY may cause a cytotoxic effects, we used the MTT assay in two cell lines: Peripheral blood mononuclear cells (non-adherent cells) and VERO cells (adherent cells).

2.3.1 Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Samples of peripheral blood were supplied by the Clinical Analysis Laboratory of the Franciscan University Center. The project was approved by the Research Ethics Committee of the Franciscan University Center, CAAE (31211214.4.0000.5306). Peripheral blood samples were collected by venipuncture using a top Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) and heparin tubes. These samples were drawn after 12 h of overnight fasting from three apparently healthy human volunteers (22–25 years old), non smokers that were not taking prescription drugs, with drinking habits of no more than two alcoholic beverages a week. Lymphocyte cells were separated by Histopaque-1077 (Sigma–Aldrich Co., St Louis, USA) under density gradient centrifugation using 4 mL of blood samples. After further centrifugation for 15 min at 2500g, cells were transferred to culture media containing 5 mL of RPMI 1640 supplemented with 10% of FBS, 1% penicillin and streptomycin. The cells were cultured in a 96-well microplate at an initial density of 2×10^5 for 24 and 72 h at 37 °C in a 5% humidified CO₂ atmosphere (Wilms et al. 2005).

2.3.2 VERO cell culture

Green monkey kidney (VERO) cells (Adolpho Lutz Institute, São Paulo, Brazil) (20–30 passages) were cultured in 96-well plates (Corning, USA) with E-MEM supplemented with 10 % (v/v) FBS (Gibco BRL), 1% (v/v) L-glutamine (200 mmol L⁻¹), 10 mg/mL-1 ciprofloxacin (Baytril, Bayer), and 0.025 g/mL-1 amphotericin B (Gibco BRL). The cells were maintained at 37 °C in a humidified incubator with a 5 % CO₂ atmosphere.

2.3.3 Cell viability

The cytotoxicity of IgY against lymphocytes (non-adherent) and VERO cells (adherent) was evaluated as described by Sagrillo et al. (2015), using MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric method based on the cleavage of the reagent by dehydrogenases in viable cells (Mosmann, 1983). In microplates, cells were incubated at 37 °C in a humid atmosphere with 5 % of CO₂ for 24 and 72 h. At the end of incubation, 50 µL of MTT solution was added to each well and the cells were incubated for three more hours. The

supernatant was removed and 200 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well. The microplate was analyzed using an ELISA reader at a wavelength of 560 nm. As a control, cells were grown in a medium lacking the constituents. The experiment was performed in triplicate and treatments used as concentrations of 1, 5 and 10 mg/mL of IgY anti-*T. cruzi*. Finally, cell viability was determined and expressed as a percentage of the control value.

2.4. Statistical analyses

Normality and homoscedasticity were analyzed through the Shapiro-Wilk and Levene test, respectively. Significant differences between groups were analyzed and detected by two-way analyses of variance (ANOVA) for independent samples, followed by Tukey post-hoc test. The differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Concentration of IgY antibody

The production of IgY by immunized chickens was observed during the study period. The average concentration of IgY antibody purified between the 3rd and 13th week after immunization was 8.41 ± 1.47 mg/mL.

3.2 Gel electrophoresis SDS-PAGE

The polyacrylamide gel showed bands of stained peptides with molecular weight between 75 and 50 kDa (IgY heavy chain), 37 and 25 kDa (IgY light chain) (Fig. 1). These findings were obtained for all samples, which demonstrates that the extraction protocol was effective in separating the IgY.

3.3 Western blot assay

The results from the first Western blot, where IgY control samples and IgY from immunized chickens after 3, 5, 7, 9, 11 and 13 weeks of immunization can be seen in Fig 1A. This figure shows bands with molecular weight between 75 and 50 kDa and other bands between 37 and 25 kDa, corresponding to the heavy and light chains of IgY. Demonstrating that the bands found on the electrophoresis gel having the same molecular weight refer to IgY

The second membrane electrophoretically transferred (figure 1B) with antigen samples shows that IgY newly synthesized anti-*T. cruzi* reacted with proteins of both species of Trypanosoma, *T. cruzi* e *T. evansi*, which indicates a cross-reactivity. The immunoglobulin produced was able to recognize in *T. cruzi* several proteins, in this some homologous proteins

in *T. evansi* were also recognized, demonstrating that IgY anti - *T. cruzi* can provide cross-reaction to other trypanosomatids and cannot be used in tests diagnoses specific. Also, results for IgY control were negative, indicating that the IgY produced has specificity for the target antigen.

3.4 ELISA assay

Positive results were obtained for all dilutions tested. There was an antigen-antibody reaction with an optical density (OD) between 0.196 ± 0.005 and 1.83 ± 0.002 (figure 3). It was also observed a decrease in the antigen-antibody reaction after the week 8, which refers to the reduction of trypomastigotes and the concentration of the antigen used to immunize chickens, thus, indicating a reduction of specific IgY anti-*T. cruzi* production.

3.5 MTT assay

In order to determine whether IgY led to increased cellular toxicity, the MTT assay for cell viability was used. As shown in Figure 4 and 5, IgY did not cause cytotoxicity effects at concentrations of 1, 5 and 10 mg/mL after 24 and 72 h post-incubation in PBMC and VERO cell cultures ($p > 0.05$).

4. Discussion

Identification of alternative treatments that are more efficient and less toxic against *T. cruzi* are necessary, since several resistance and toxic effects are reported using the conventional drugs (Viotti et al., 2009). Therefore, therapeutic immunization/immunotherapy using *T. cruzi* antigens can also be used to control the infection and reduce disease progression. Our results demonstrated that it is possible to produce IgY through the inoculation of trypomastigotes forms of *T. cruzi* in chickens from eggs yolks. The method of immunization recommended by Sampaio et al. (2014b) demonstrated to be an effective and easy method to be implemented for production of IgY anti-*T. cruzi*

Our results showed the production of IgY after the inoculation of 10^4 and 10^3 trypomastigotes of *T. cruzi*, which produced an average of 8.41 mg/mL of IgY, whereas 10^7 trypomastigotes of *T. evansi* produced an average of 2.7 mg/mL (Sampaio et al. 2014b). This difference might be related to the immunization protocol, since we used only 10 days of intervals. Moreover, this difference may occur due a greater immune response mounted by the chickens opposite to the antigenic epitopes of *T. cruzi* antigenic epitopes that may be more complex than *T. evansi*. In addition, regarding the ELISA results, higher optical densities were

observed up to 8 weeks, coinciding with the inoculation of a greater number of trypomastigotes (2.4×10^4 trypomastigotes/mL), which shows that the antigen concentration is closely related to the specific production of IgY. Furthermore, there was a major reduction of IgY activity, and this can be due to a reduction in the immune responses of the animals against the antigen, since after several inoculations this antigen can not be seen as a challenge anymore.

Currently, there are several methods to isolate and purify functional active chicken IgY from egg yolk, even for large scale purification (Munhoz et al. 2014). These methods can be performed by salt precipitation (Deignan, 2000; Chacana et al. 2003), chromatographic techniques (Meulenaer and Huyghebaert, 2001), and ultrafiltration (Kim and Nakai, 1998). We choose to use the salt precipitation method using PEG-6000 as described by Polson et al. (1980) since it is an easy to perform. This technique is widely described in the literature as effective, high-yield antibody, besides having the advantage of possibility of handling at room temperature without risk of denaturation of the immunoglobulin (Akita and Nakai, 1993).

The specificity and characterization of anti-*T. cruzi* IgY was confirmed by polyacrylamide electrophoresis gel and Western blot. The molecular weight of 75 kDa (50 for the heavy chain and 25-37 for the light chain) found in our study was similar to that described by Contreras et al. (2005), where avian antibodies were produced by intradermal immunization of chickens with *T. cruzi* epimastigotes. However, the literature reports that the light chains of IgY can weight 18 kDa (Sun et al. 2001) to 21 kDa (Hatta et al. 1993), differing from our results. There are other molecular weight characterization of different IgY as the IgY anti-*Staphylococcus aureus* with light chain of 15–25 kDa and heavy chain of 55-70 kDa (Reddy et al 2013), and IgY anti-*Schistosoma japonicum* with light and heavy chain between 25 and 68 kDa, respectively (Cai et al 2012.), demonstrating that there is a certain variability in the molecular weight of IgY produced.

IgY technology has been used in many medical areas, especially for diagnosis purposes. Specific chicken antibodies have been successfully used against a wide variety of antigens (Munhoz et al., 2014). Various authors reported the efficiency, sensitivity, and specificity of diagnostic tests using IgY from various microorganisms such as *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma japonicum*, *Trichinella spiralis* and coronavirus (Ferreira Junior et al. 2012; Cai et al. 2012; Wang et al. 2012; Palaniyappan et al. 2012). The results of our experiment regarding IgY anti-*T. cruzi* indicate that this antibody could not be used in a diagnostic test, since it showed cross-reactivity with antigens of *T. evansi*. But on the other hand, this finding leaves the possibility that IgY could be used as immunotherapy against many trypanosomes.

The MTT assay is widely used to evaluate the cell viability, as well as the level of mitochondrial metabolic activity of viable cells, with high degree of accuracy (Mossman, 1983). In the present study, the IgY concentration of 10 mg/mL was able to maintain cell viability in all exposure times tested using PBMC and VERO cells, and it did not cause damage to DNA. Our results are similar to those found by Sampaio et al. (2014a), using IgY anti-*T. evansi* against PBMC cells on concentrations of 1, 5 and 10 mg/mL, other important blood protozoan belonging to the Trypanosomatidae family. Thus, we can conclude that all concentrations of IgY may be considered safe against these cells.

5. Conclusion

The results indicated that *T. cruzi* is able to generate a humoral immune response in chickens, resulting in a synthesis of high specific immunoglobulins against *T. cruzi*, that did not cause damage to the cell membrane, as well as no proliferative effect in mononuclear and VERO cells culture.

References

- Akita, E.M., Nakai, S., 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulin from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods*. 160, 207-214.
- Basso, B., Marini, V., 2015. Experimental Chagas disease in Balb/c mice previously vaccinated with *T. rangeli*. II. The innate immune response shows immunological memory: reality or fiction. *Immuno*. 220, 428-36.
- 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.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Bio*. 72, 248-254.
- Cai, Y., 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.

- Carlier, Y., Torrico, F., 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 6, 767–771.
- Chacana, P.A., Schade, R., Terzolo H.R., 2003. A new bacterium suitable for egg yolk immunoglobulin (IgY) large-scale chromatographic purification. *ALTEX.* 3, 165.
- Chacana, P.A., Terzolo, H.R., Calzado, E.G., Schade, R., 2004. Tecnología IgY e aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. *Rev Med Vet.* 85, 179-189.
- Contreras, V.T., Lima, A.R., Navarro, M.C., Arteaga, R.Y., Graterol, D., Cabello, L., Farias, M., 2005. Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmuizadas con epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Salus online*, 9, 33-44.
- Coura, J.R., 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102, 113-122.
- Coura, J.R., Dias, J.C.P., 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 31–40
- Deignan, T., Kelly, J., Alwan, A., O'Farrelly, C., 2000. Comparative analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. *Food Agricultural Immunology.* 12, 77-85.
- Dias, J.C.P., 1997. Control de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Brasil. *Medicina.* 55, 7-9.
- Ferreira Júnior, A., Santiago, F.M., Silva, M.V., Ferreira, F.B., Macêdo Júnior, A.G., Mota, C.M., Faria, M.S., Silva Filho, H.H, Silva, D.A.O., Cunha-Júnior, J.P., Mineo, J.R., Mineo, T.W.P, 2012. Production, Characterization and Applications for *Toxoplasma gondii*-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. *PLoS ONE*, 7, 40391.
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T., 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared of rabbit IgG. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 57, 450-454.
- Karlsson, M., Larsson, A., Kollberg, H., 2004. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World's Poultry Science Journal.* 60, 341-348.
- Kim, H., Nakai, S., 1998. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. *Journal of Food Science.* 63, 485-490.
- Martin, D.L., Lowe, K.R., McNeill, T., Thiele, E.A., Roellig, D.M., Zajdowicz, J., Hunter, S.A., Brubaker, S.A., 2015. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Tropic.* 149, 15-18.
- Meulenaer, B., Huyghebaert, A., 2001. Isolation and Purification of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins: A Review. *Food and Agricultural Immunology.* 13, 275-288.

- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., Hungerfor, D.A., 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20, 613-616.
- Mosman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods.* 65, 55-63.
- Munhoz, L.S., Vargas, G. D., Fischer, G., Lima, M., Esteves, P.A., Hübner, S.O., 2014. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. *Ciência Rural.* 44, 153-160.
- Otani, M.M., Vinelli, E., Kirchhoff, L.V., del Pozo, A., Sands, A., Vercauteren, G., Sabino, E.C., 2009. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion (Paris)* 49, 1076–1082.
- Palaniyappan, A., Das, D., Kammila, S., Suresh, M.R., Sunwoo, H.H., 2012. Diagnostics of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid antigen using chicken immunoglobulin Y. *Poultry Science,* 91, 636–642.
- Polson, A., von Wechmar, M.B., van Regenmortel, M.H., 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunological Communications.* 9, 475-93.
- Rassi Jr., A., Rassi, A., Marin-neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet.* 375, 1388-1402.
- Reilly, M.R., Domingo, R., Sandhu, J., 1997. Oral delivery of antibodies: future pharmacokinetic trends. *Clin. Pharmacokin.* 32, 313-323.
- Rodríguez, C.J., Pinto Dias, J.C., 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease C 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*40, 10431–40.
- Schade, R., Staak, C., Hendriksen, C., Erhard, M., Hugl, M., Koch, G., Larsson, A., Pollmann, W., van Regenmortel, M., Rijke, E., Spielmann, H., Steinbusch, H., Straughan, D., 1996. The production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. *Altern Lab Animals.* 24, 925-934.
- Sagrillo, M.R., Garcia, L.F.M., de Souza Filho, O. C., Duarte, M.M.M.F., Ribeiro, E.E., Cadoná, F.C. and da Cruz, I.B.M., 2015. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chem.* 173, 741–748.
- Sampaio, L.C.L; Baldissera, M.D., Sagrilo, M.R., Heres, T.S., Oliveira, C.B., Stainki, D.R., Monteiro, S.G., 2014a. In vitro cytotoxicity and genotoxicity of chicken egg yolk antibodies (igy) against *Trypanosoma evansi* in human lymphocytes. I. *J. Pharmacy Pharmaceutical Sci.* 6, 167-170.
- Sampaio, L.C.L., Baldissera, M.D., Grando, T.H., Gressler, L., Capeleto, D.M., de As, M.F., de Jesus, F.P., dos Santos, A.G.Jr, Ancuti, A.N., Colonetti, K., Stainki, D.R., Monteiro,

- S.G., 2014b. Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection. *Vet. Parasitol.* 204, 96-103.
- Sun, S., Mo, W., Ji, Y., Liu, S., 2001. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM.* 15, 708-712.
- Urbina, J.A., Docampo, R., 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, 19, 495-501.
- Viotti, R., Vigliano, C.A., Alvarez, M.G., Lococo, B.E., Petti, M.A., Bertocchi, G.L., Armenti, A.H., 2009. The Impact of Socioeconomic Conditions on Chronic Chagas Disease Progression. *Rev Esp Cardiol.* 62, 1224-32.
- Wang, Z., Fu, G.Y., Jing, F.J., Jin, J., Ren, H.J., Jiang, P., Cui, J., 2012. Detection of *Trichinella spiralis* circulating antigens in serum of experimentally infected mice by an IgY-mAb sandwich ELISA. *Foodborne Pathogens and Disease.* 9, 727-733.
- WHO., 2002. World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, Technical Report Series, v. 905.
- Wilms, L.C., Hollman, P.C.H., Boots, A.W. and Kleinjans, J.C.S., 2005. 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.* 582, 155-162.

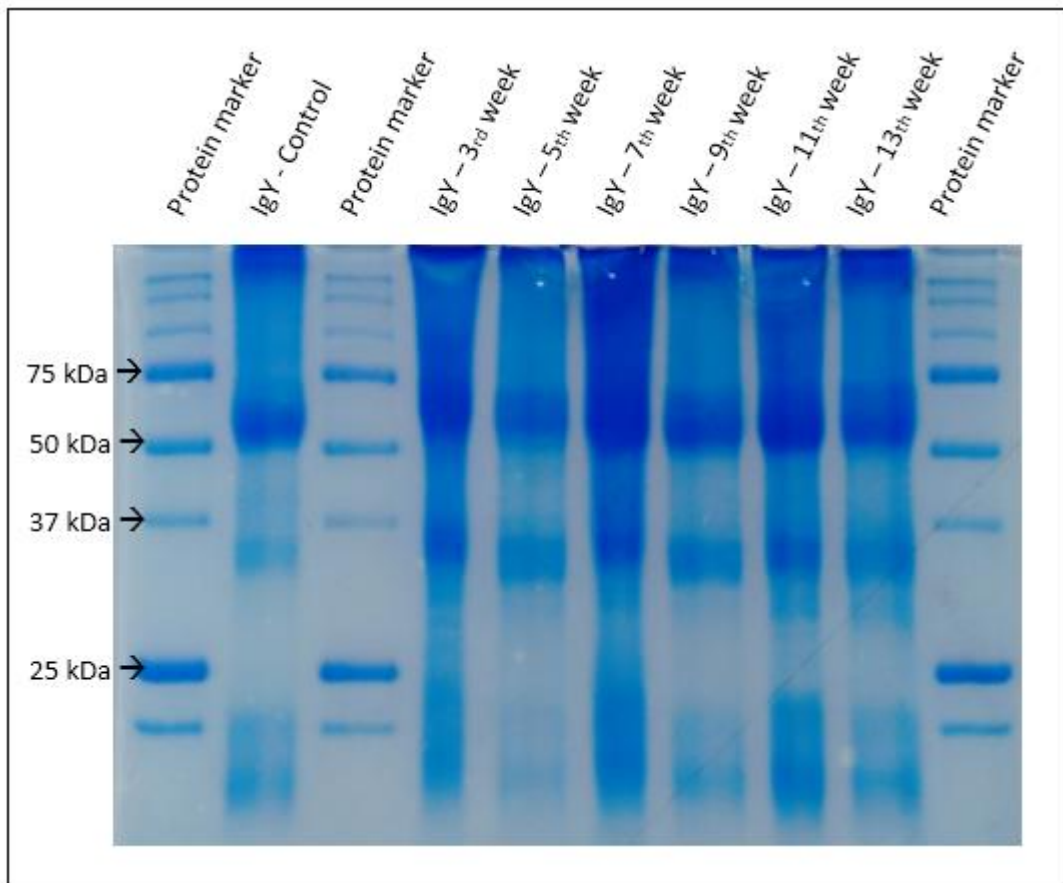


Figure 1 - IgY electrophoresis in polyacrylamide gel (10%) under reducing conditions, stained with Coomassie Blue R250 reagent (Bio-Rad) from samples of three immunized chickens. Protein marker - bands (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25 e 20 kDa). The arrows indicates the intervals of the bands being, 75 and 50 kDa refers to heavy chain and 37 and 25 kDa refers to light chain of the IgY produced at 3, 5, 7, 9, 11 and 13week post-immunization.

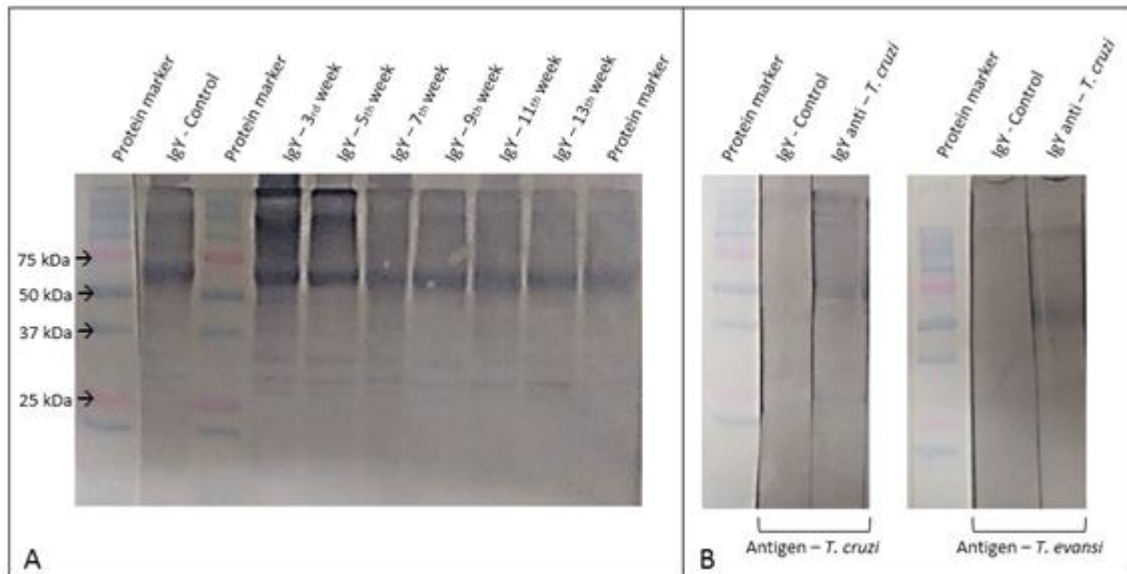


Figure 2 - A) Immunoblot showing the characterization of IgY after the addition of the secondary antibody (rabbit anti-chicken IgY peroxidase conjugate, Sigma-Aldrich®). Protein marker - bands (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25 e 20 kDa). The arrows indicate the bands (75, 50, 37 and 25 kDa) to demonstrate the range of IgY heavy and light chain bands of IgY produced at 3, 5, 7, 9, 11 and 13week post-immunization and Control IgY. B) Immunoblot showing the specific recognition of IgY - anti-*T. cruzi* and IgY - Control, to the protein antigens from *T. cruzi* and *T. evansi* samples after addition of the peroxidase-conjugated secondary antibody.

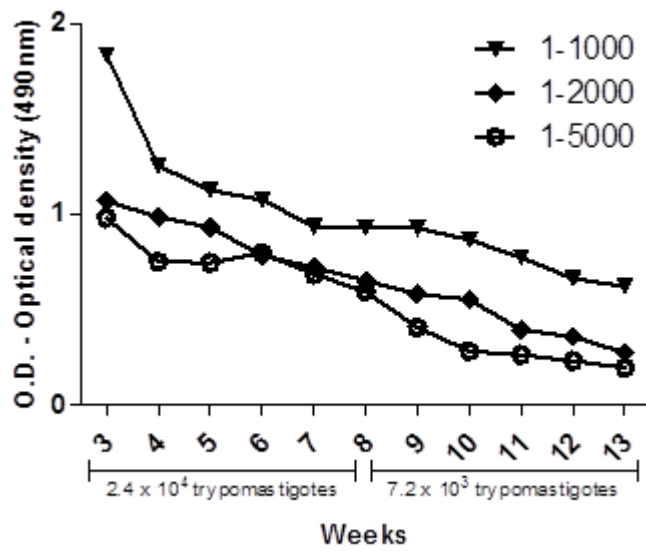


Figure 3 - Optical density values obtained in the ELISA using purified IgY from egg yolk of immunized chickens. The samples tested were IgY extracted at different weeks after immunization (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 and 13) at different concentrations (1:1000, 1:2000 and 1:5000). The arrow indicates the time of the last immunization.

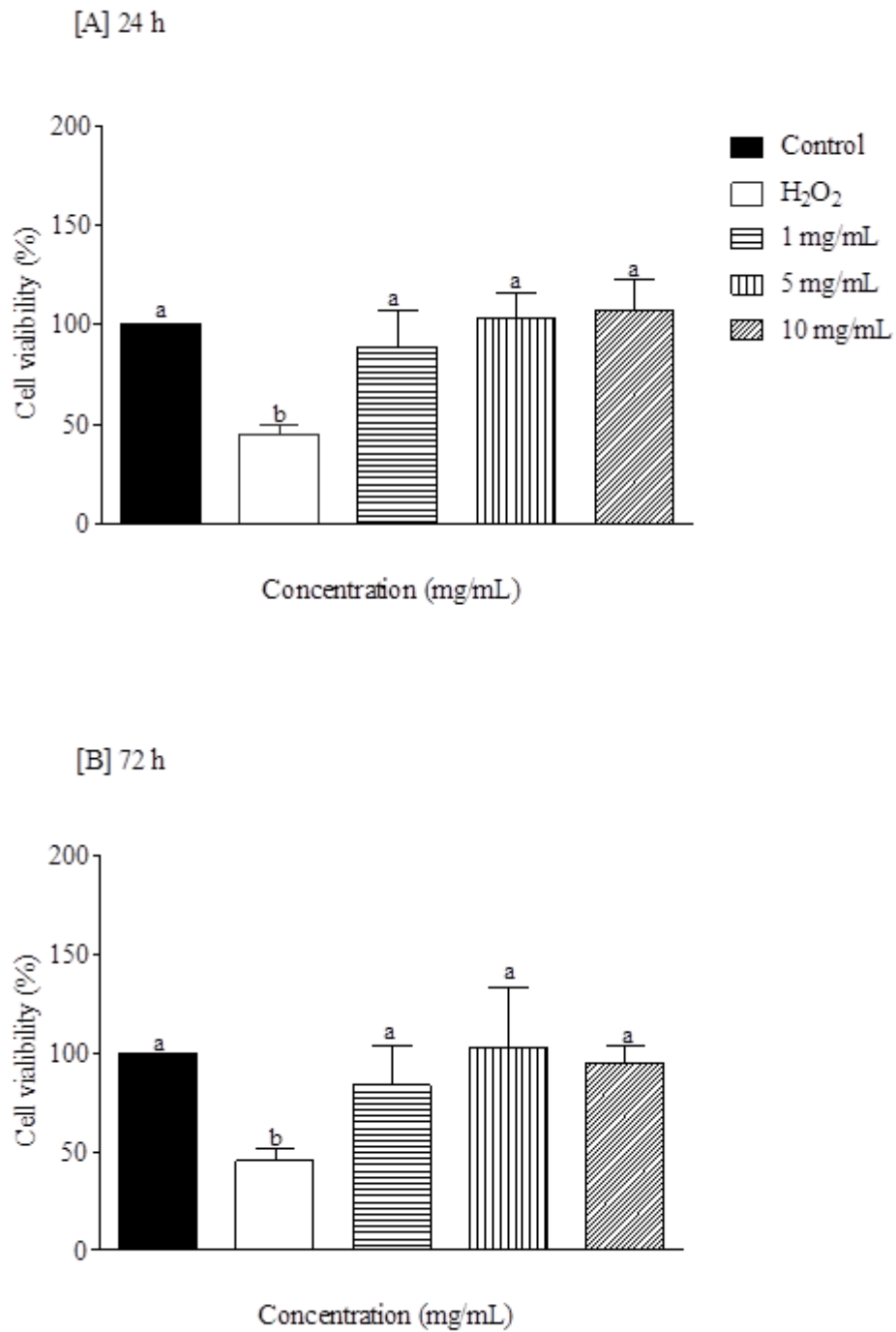


Figure 4 – Percentage of mononuclear cells (PBMC) viability after exposure to different concentrations of IgY anti-*T. cruzi* after 24 [A] and 72 h [B]. Different letters indicate statistical difference considering $p < 0.05$ using a Tukey post-hoc test.

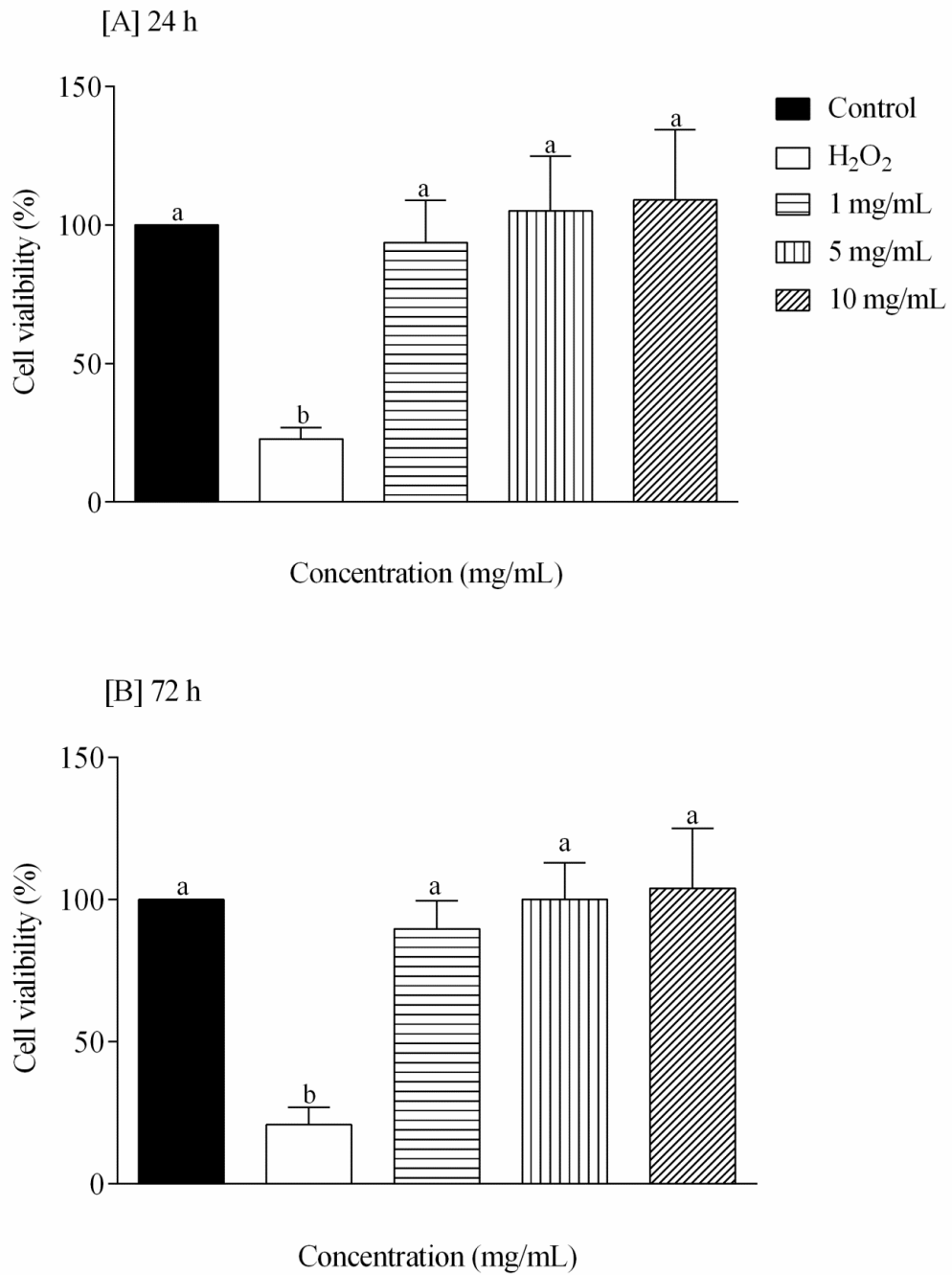


Figure 5 - Percentage of VERO cells viability after exposure to different concentrations of IgY anti-*T. cruzi* after 24 [A] and 72 h [B]. Different letters indicate statistical difference considering $p < 0.05$ using a Tukey post-hoc test.

4. CAPÍTULO III - ARTIGO 2

TÍTULO: Ecto-enzymes activities in splenic lymphocytes of mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* and treated with specific avian immunoglobulins

Artigo publicado em:

Molecular and Cellular Biochemistry

Molecular and Cellular Biochemistry
<https://doi.org/10.1007/s11010-018-3308-x>



Ecto-enzymes activities in splenic lymphocytes of mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* and treated with specific avian immunoglobulins: an attempt to improve the immune response

Thirssa H. Grando¹ · Matheus D. Baldissera¹ · Guilherme Do Carmo¹ · Camila B. Oliveira⁴ · Eduarda T. Santi¹ · Pedro Henrique Doleski¹ · Daniela B. R. Leal¹ · Lenita Moura Stefan² · Ricardo E. Mendes³ · Aleksandro S. Da Silva² · Silvia G. Montelro¹

Received: 17 November 2017 / Accepted: 25 January 2018
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The aim of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of specific avian polyclonal antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with ecto-enzymes of the purinergic system (NTPDase and adenosine deaminase (ADA) activities) in splenic lymphocytes. For this, mice were divided into six groups: three non-infected (A, B, and C) and three infected (D, E, and F). The groups A and D were composed by negative and positive controls, respectively; while the groups B and E were treated prophylactically with IgY (50 mg/kg), and the groups C and F were treated therapeutically with IgY (50 mg/kg). Treatment with IgY reduced parasitemia on day 6 post-infection (PI) compared to the infected control group, but it was similar on day 8 PI. Moreover, infected and treated animals (the groups E and F) did not show neither amastigotes in the cardiac tissue nor cardiac lesions when compared to the positive control group (the group D). The E-NTPDase (ATP and ADP as substrate) and ADA activities in splenic lymphocytes increased significantly in the positive control group (the group D) compared to the negative control group (the group A). The therapeutic treatment of IgY (the group F) was able to prevent the increase of E-NTPDase and E-ADA activities compared to the positive control group (the group D), but this finding was not observed in animals that received the prophylactic treatment (the group E). The therapeutic treatment of IgY may be considered an interesting approach to improve the immune response of mice experimentally infected by *T. cruzi*.

Keywords Chagas disease · Avian immunoglobulins · Egg yolk antibodies

Ecto-enzymes activities in splenic lymphocytes of mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* and treated with specific avian immunoglobulins

Thirssa H. Grando^a, Matheus D. Baldissera^a, Guilherme do Carmo^a, Camila B. Oliveira^d, Eduarda T. Santi^a, Pedro Henrique Doleski^a, Daniela B. R. Leal^a, Lenita Moura Stefani^b, Ricardo E. Mendes^c, Aleksandro S. da Silva^b and Silvia G. Monteiro^a

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

^b Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

^c Veterinary Pathology Laboratory, Instituto Federal Catarinense (IFC), Concórdia, SC, Brazil.

^d Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of specific avian polyclonal antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with ecto-enzymes of the purinergic system (NTPDase and adenosine deaminase (ADA) activities) in splenic lymphocytes. For this, mice were divided into six groups: three non-infected (A, B and C) and three infected (D, E and F). The groups A and D were composed by negative and positive controls, respectively; while the groups B and E were treated prophylactically with IgY (50 mg/kg), and the groups C and F were treated therapeutically with IgY (50 mg/kg). Treatment with IgY reduced parasitemia on day 6 post-infection (PI) compared to the infected control group, but it was similar on day 8 PI. Moreover, infected and treated animals (the groups E and F) did not show neither amastigotes in the cardiac tissue nor cardiac lesions when compared to the positive control group (the group D). The E-NTPDase (ATP and ADP as substrate) and ADA activities in splenic lymphocytes increased significantly in the positive control group (the group D) compared to the negative control group (the group A). The therapeutic treatment of IgY (the group F) was able to prevent the increase of E-NTPDase and E-ADA activities compared to the positive control group (the group D), but this finding was not observed in animals that received the prophylactic treatment (the group E). The therapeutic treatment of IgY may be considered an interesting approach to improve the immune response of mice experimentally infected by *T. cruzi*.

Key-words: Chagas' disease; avian immunoglobulins; egg yolk antibodies.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite that causes Chagas disease, also called American trypanosomiasis, which is a chronic parasitic infection characterized by a life-long infection of the host [1]. *T. cruzi* undergoes a complex life cycle, that allows adaptation to both intermediate hosts (triatomine insects) and mammals, and it is normally transmitted by contaminated feces of the vector deposited during or immediately after a blood meal [2]. During its life cycle, cell differentiation gives rise to four morphogenetic forms: epimastigote, metacyclic trypomastigote, amastigote and bloodstream trypomastigote [3]. Infective trypomastigotes enter the bloodstream and subsequently, may infect a wide range of cell types other than those of hematopoietic origin and professional antigen presenting function. Inside the cytoplasm, the parasite differentiates into intracellular amastigotes that burst out infected cells and re-enter the bloodstream as trypomastigotes. Indeed, the persistence of *T. cruzi* in the cardiac tissue, gut and skeletal muscles by invading muscle cells, is essential for the chronicity of the infection and to disease progression [2,4].

The migration from the bloodstream into the cell and vice versa, is a way of escaping the host immune response [5]. The control of parasite load by the host depends on effective T cell-mediated immunity [5], and the purinergic signaling system plays an important role modulating the inflammatory and immune responses by extracellular biomolecules, such as adenine nucleotides (ATP (adenosine triphosphate), ADP (adenosine diphosphate), AMP (adenosine monophosphate), and their derived nucleoside, the adenosine (Ado) [6]. Some studies indicated that high levels of extracellular ATP act as pro-inflammatory agents that potentiate the release of pro-inflammatory cytokines [7] due to their interaction with type P2 purinereceptors. Therefore, low extracellular ATP levels play a negative modulation of the immune response [8]. Adenosine exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action by inhibiting T cell proliferation and cytokine secretion [9, 10], that may enhance immune responses during infectious diseases [5]. A study conducted by Do Carmo et al. [11] demonstrated that the purinergic system exerts an important role in the pathophysiology of Chagas disease associated to inflammatory responses.

The host's immune system obviously tries to control the infection more dynamically, and the only drugs currently used to treat *T. cruzi* infections are benznidazol and nifurtimox agents. However, both drugs require long periods of treatment, display severe side effects and toxicity, as well as controversial efficacy in *T. cruzi* chronically infected adults, besides to the fact that some parasite strains are refractory to this treatment [12,13]. For these reasons, there is a need for safe and efficacious alternatives to control and treat Chagas disease. In this context, the

combination of treatments is recommended in the chemotherapy against other parasitic diseases, as well as the use of immunotherapies.

According to the literature, the production and use of polyclonal antibodies after poultry immunization have rised interest in the scientific community, due to its numerous advantages [14-17]. This technology is called the "IgY - Immunoglobulin Y", and it is considered an ethical experimental procedure since animal bleeding is replaced by egg collection [18]. In addition, IgY has been used for diagnosis and therapy against several diseases [18,19].

The aim of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of specific avian polyclonal antibodies (IgY) against *T. cruzi* and the interaction of them with ecto-enzymes of the purinergic system (NTPDase and adenosine deaminase (ADA) activities in splenic lymphocytes. Thus, our hypothesis is that the use of immunoglobulin Y (IgY), alone or associated with antiparasitic agents, may improve the immune system and, therefore, the host immune response against *T. cruzi*.

2. Materials and methods

2.1 *T. cruzi* Inoculum

Cryopreserved blood from a previously infected mouse containing trypomastigotes of *T. cruzi* strain Y [20], known to cause acute disease in laboratory animals, was used as the inoculum.

2.2 Immunoglobulin Y anti-*T. cruzi*

IgY anti-*T. cruzi* was produced, extracted and characterized according to the methodologies described by Grando et al. [21]. In summary, chickens were immunized with trypomastigotes of *T. cruzi* (strain Y), and the eggs were collected and stored until processed. Antibodies were extracted from egg yolk by the method of precipitation of polyethylene glycol 6000 (PEG-6000) and characterized by gel electrophoresis, western blot and ELISA techniques. Then, the extracts containing IgY anti-*T. cruzi* were lyophilized and stored until use.

2.3 Experimental design

Thirty female (Swiss) mice (40 days of age, 20 to 25g of body weight) were randomly divided into six groups of five animals each. They were maintained in a room under constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12 h light/dark cycle with free access to feed and water. Animals of the infected group were intraperitoneally inoculated with blood containing 10^4 trypomastigotes of *T. cruzi* (strain Y) from a mouse previously infected. The uninfected animals

were used to assure that the treatment did not cause any tissue damage or toxic biochemical changes. The groups were composed as described below:

- Group A - Uninfected and untreated control group;
- Group B – Uninfected and prophylactically treated with IgY (daily dose of 50 mg/kg for three days before *T. cruzi* inoculation of infected groups);
- Group C – Uninfected and therapeutically treated with IgY (daily dose of 50 mg/kg for 8 days after *T. cruzi* inoculation of infected groups);
- Group D - Infected and untreated control group;
- Group E – Infected and prophylactically treated with IgY (daily dose of 50 mg/kg for three days before *T. cruzi* inoculation);
- Group F – Infected and therapeutically treated with IgY (daily dose of 50 mg/kg for 8 days after *T. cruzi* inoculation).

2.4. Blood parasitemia evaluation

The evaluation of parasitemia was performed in a two-day interval from 2 to 8 days post-infection (PI). The number of blood trypomastigotes was monitored by counting the number of motile parasites in 5 μ L of fresh blood drawn from the lateral tail vein of each mouse, as recommended by a standard protocol [22]. The number of parasites was expressed as parasites/mL of blood.

2.5. Sample collection

The animals were anesthetized and humanely euthanized on day eight PI. The spleen was removed and dissected in a glass dish for lymphocyte isolation to measure ecto-enzymes of the purinergic system. Also, cardiac tissue was collected to perform histopathology to evaluate the presence of amastigotes.

2.6 Lymphocyte isolation

Spleens were carefully homogenized in sterile phosphate buffer (pH 7.2) with the aid of a syringe plunger, and splenic lymphocytes were collected using Ficoll-Hypaque density gradients as described by Doleski et al. [23]. Lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells excluding 0.1% trypan blue, and measuring lactate dehydrogenase activity [24].

2.7 E-NTPDase and E-ADA activities

After isolation of lymphocytes, E-NTPDase activity was determined according to the method described by Leal et al. [25] and modified by Doleski et al. [23]. E-NTPDase activity was determined in a reaction medium containing 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose, and 500 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) on a final volume of 200 μ L. Twenty microliters of intact lymphocytes suspended in saline solution were added to the reaction medium (0.1–0.2 mg/mL of protein) and pre-incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was started by adding the substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2 mM, and stopped after 60 minutes with 200 μ L of 10 % trichloroacetic acid (TCA). The samples were chilled on ice for 10 min before assaying for the release of inorganic phosphate (Pi) as described by Chan et al. [26], using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as the standard. Controls, with the addition of the enzyme preparation after the addition of TCA, were used to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrate. Specific activity of E-NTPDase was reported as nmol Pi released/min/mg protein.

The E-ADA activity was assessed according to the colorimetric method of Giusti and Gakis [27] to quantify spectrophotometrically the amount of complexes of ammonia released per minute from the degradation of adenosine. The E-ADA activity was expressed in U/L.

2.8 Cardiac histopathology

Heart samples were fixed in 10% buffered formalin, routinely processed and embedded in paraffin wax. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) for histopathological examined under an optical microscope in a blind way, and lesions were scored as mild, moderate, or severe.

2.9 Statistical analysis

Normality and homoscedasticity were analyzed through the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. Therefore, statistical analysis was performed using a bilateral two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples, followed by Tukey post hoc analysis. Significance was set at $p < 0.05$. Thus, F and p values were shown only if $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Parasitemia levels

Trypomastigotes of *T. cruzi* were observed on day 4 PI in all groups, and the peak of parasitemia occurred on day 6 PI. Animals that received prophylactic IgY treatment showed

lower parasitemia compared to the positive control group on days 4 and 6 PI, but showed similar levels on day 8 PI, which indicates that the prophylactic treatment delayed the peak of the parasitemia (Fig. 1).

3.2 E-NTPDase activity

The E-NTPDase activity (ATP and ADP as substrates) in splenic lymphocytes was higher in infected control animals (the group D) compared to the uninfected control group (the group A). The prophylactic treatment of IgY (the group F) inhibited this alteration compared to the positive control group (the group D) (Fig. 2).

3.3 E- ADA activity

The E-ADA activity increased in splenic lymphocytes of infected control animals (the group D) compared to the negative control group (the group A). The prophylactic IgY treatment (the group F) prevented this alteration compared to the positive control group (the group D) (Fig. 3).

3.4 Histopathology

No cardiac changes were observed macroscopically. However, microscopic examination showed mild to moderate amount of amastigotes containing pseudocysts in the myocardium of mice experimentally infected by *T. cruzi* (the group D) (Fig. 4). No cardiac lesions and amastigotes were observed in uninfected animals (groups A, B and C) and the groups infected and treated (groups E and F).

4. Discussion

The IgY treatment against *T. cruzi* did not cause a curative effect, however it slightly decreased parasitemia (groups E and F). There were no lesions and amastigote forms in the myocardium after histopathological examinations, revealing that the treatment with IgY anti-*T. cruzi* had an effect on disease pathogenesis, reducing parasitic tissue invasion. Olivera et al. [28] evaluated the effect of various concentrations of artesunate (sodium salt of the hemisuccinate ester of the plant *Artemisia* sp.) associated or not with benznidazol and found that the artesunate alone was unable to prevent myocardium invasion by amastigotes, which was achieved only when artesunate was associated with benznidazol.

It is known that most of the symptoms and clinical signs of Chagas disease, such as heart failure, may be due to the invasion of *T. cruzi* into the tissues, leading to an intense

inflammation and necrosis [29]. Although the parasitemia remained similar in the end of experiment (day 8), we observed to the first time that the prophylactic treatment was able to control the parasitemia in the beginning of infection (days 4 and 6 PI). Thus, we can suggest that our treatment protocol had a beneficial effect on animals experimentally infected by *T. cruzi*, justifying the need of new experiments to better explore the effect and contribution that this immunotherapy could cause to treat patients with Chagas disease, since IgY associated with chemotherapy may potentiate the treatment and increase the curative effect.

In this study, the E-NTPDase and E-ADA activities in splenic lymphocytes increased in animals of the infected control group compared to those of the uninfected control group. These enzymatic alterations of the purinergic system may be related to the inflammatory response and disease pathogenesis. This hypothesis was suggested by Baldissera et al. [30] demonstrating that ADA activity could be interpreted as an important biomarker for determining the severity of the inflammatory damage during parasitic infections, such as those caused by *Trypanosoma evansi*.

In the immune system, ATP can act as a pro-inflammatory or an anti-inflammatory mediator [8,31,32], and the nucleoside Ado, in turn, may contribute to inflammation and immune responses [33-34]. The extracellular concentration of ATP and Ado is dynamically controlled by ecto-enzymes, such as E-NTPDase and E-ADA [7]. In this sense, several studies demonstrated that these ecto-enzymes have significant roles in coordinating the regulation of immune responses [5,7,8,25]

The increase of ATP hydrolyzed by E-NTPDase can be considered an anti-inflammatory profile in order to decrease the excessive levels of ATP, a pro-inflammatory molecule [7]. Experimental infection by *T. cruzi* may have caused an increase in lymphocytic ATP levels, as observed recently by Carmo et al. [11] and it is considered an attempt of the organism to eliminate the infection, but excessive ATP levels lead to cell and tissue damage. This corroborates with our hypothesis that increased NTPDase activity occurs as an attempt to regulate ATP levels since inflammation is harmful to the animal. In addition to a slightly lower parasitemia in the early course of the disease, IgY treatment prevented the invasion of the tissue by amastigotes, prevented the increase of NTPDase activity, indicating that ATP levels were not increased during infection, i.e., demonstrating the anti-inflammatory effect of IgY anti-*T. cruzi*. In studies conducted with *T. evansi*, a slight difference on the enzyme NTPDase was observed, where acute infection by *T. evansi* reduced E-NTPDase activity in the first 10 days of infection, but showed a significant increase on 15 days PI [35].

ADA is an important enzyme of the purinergic system responsible for the irreversible deamination of Ado, a molecule with anti-inflammatory properties [36]. In this current study, the activity of the ADA was visually higher in the infected group (the group D), and this response is considered a pro-inflammatory profile since it may reduce Ado levels. Haskó and Cronstein [37] emphasized that the downregulation of ADA activity leads to an increase in Ado. The activity of ADA enzymes has been described in numerous parasitic infections. Studies have demonstrated that the downregulation of ADA activity in infections by *Eurytrema coelomaticum* [38], *Haemonchus contortus* [39], *Fasciola hepatica* [40], *T. evansi* [30] and in humans with chronic Chagas disease [5], differently from what was found in this study. However, in a similar experiment where the activity of E-ADA and NTPDase were evaluated in mice experimentally infected by *T. cruzi*, it was observed increased in the E-ADA and NTPDase activities (ATP and ADP substrates) in periferic lymphocytes compared to uninfected animals [11] similarly to our results, even though we used splenic lymphocytes.

Based on this evidence, we conclude that the treatment with IgY anti-*T. cruzi* was unable to prevent parasitemia at the peak of the infection, but it may impair the invasion of amastigotes into the myocardium. In summary, the increase on E-NTPDase activity in splenic lymphocytes may be considered an anti-inflammatory characteristic in order to reduce the excessive levels of ATP during Chagas disease, while the increase on ADA activity might be considered a pro-inflammatory profile since it may reduce the Ado levels. The therapeutic treatment with IgY might be considered an interesting approach to improve the immune response in mice experimentally infected by *T. cruzi*, demonstrating that IgY associated with chemotherapy may enhance its curative effect against Chagas disease.

Ethical committee

All procedures in this study were approved by the Animal Welfare Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), under protocol number 5699170915, following the guidelines established by Brazilian Society of Science in Laboratory Animals.

Conflict of interest

None

REFERENCES

- [1] Campbell, D.A., Westenberger, S.J., Sturm, N.R., 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Current Molecular Medicine* 4, 549–562.
- [2] Martin DL1, Lowe KR2, McNeill T3, Thiele EA4, Roellig DM4, Zajdowicz J5, Hunter SA6, Brubaker SA7. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop.* 2015 Sep;149:15-8.
- [3] Giarola NL, de Almeida-Amaral EE, Collopy-Júnior I, Fonseca-de-Souza AL, Majerowicz D, Paes LS, Gondim KC, Meyer-Fernandes JR. *Trypanosoma cruzi*: effects of heat shock on ecto-ATPase activity. *Exp Parasitol.* 2013 Apr;133(4):434-41.
- [4] Tarleton R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol.* 19:430-4, 2007.
- [5] Souza VC, Schlemmer KB, Noal CB, Jaques JA, Zimmermann CE, Leal CA, Fleck J, Casali EA, Morsch VM, Schetinger MR, Leal DB. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas disease. *Parasitology International.* 61, 690-695.
- [6] Ralevic V, Burnstock G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News & Perspectives* 2003;16:133-40.
- [7] Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C., 2006. Adenosine 50-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 112, 358e404.
- [8] Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Current Opinion in Pharmacology* 2009;9:507-13.
- [9] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine* 2007;204:1257-65.
- [10] Gessi S, Varani K, Merighi S, Fogli E, Sacchetto V, Benini A, Leung E, Mac-Lennan S, Borea PA. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal* 2007;3: 109-16.
- [11] do Carmo GM, Doleski PH, de Sá MF, Grando TH, Bottari NB, Leal DB, Gressler LT, Henker LC, Mendes RE, Monteiro SG, Da Silva AS. Purinergic enzymatic activities in lymphocytes and cardiomyocytes of mice acutely infected by *Trypanosoma cruzi* modulating the inflammatory responses. *Exp Parasitol.* 2017 Apr;175:44-50.
- [12] Wilkinson S R, Kelly J M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009;11(31):1–24.

- [13] Castro J A, de Mecca M M, Bartel L C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 2006; 25:471–9.
- [14] Olovsson, M., Larsson, A., 1993. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 145–152.
- [15] 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.
- [16] Contreras, V.T., Lima, A.R., Navarro, M.C., Arteaga, R.Y., Graterol, D., Cabello, L., Farias, M., 2005. Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmuizadas com epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Salus online*, 9, 33-44.
- [17] Schade, R., Staak, C., Hendriksen, C., Erhard, M., Hugl, M., Koch, G., Larsson, A., Pollmann, W., van Regenmortel, M., Rijke, E., Spielmann, H., Steinbusch, H., Straughan, D., 1996. The production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. *Altern Lab Animals*. 24, 925-934.
- [18] Sampaio, L.C.L., Baldissera, M.D., Grando, T.H., Gressler, L., Capeleto, D.M., de As, M.F., de Jesus, F.P., dos Santos, A.G.Jr, Anciuti, A.N., Colonetti, K., Stainki, D.R., Monteiro, S.G., 2014. Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection. *Vet. Parasitol.* 204, 96-103.
- [19] Reilly, M.R., Domingo, R., Sandhu, J., 1997. Oral delivery of antibodies: future pharmacokinetic trends. *Clin. Pharmacokin.* 32, 313-323.
- [20] Silva, L.H., Nussenzweig, V., 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20, 191e207.
- [21] Grando TH, Baldissera MD, Sá MF, Carmo GM, Porto BCZ, Aguirre GSV, Azevedo MI, Jesus FPK, Santurio JM, Sagrillo MR, Stefani LM, Monteiro SG. Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *Journal of Immunological Methods*. In press.
- [22] Brener, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4, 389–396.
- [23] Doleski P.H.; Adefegha S.A.; Cabral F.L.; Leal D.B.R. Characterization of E-NTPDase (EC 3.6.1.5) activity in hepatic lymphocytes: A different activity profile from peripheral lymphocytes. *Cell Biochemistry & Function*, 2017 1-8. Doi.org/10.1002/cbf.3253
- [24] Bergmeyer H (1983) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Deerfield Beach.

- [25] Leal DB, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CA, da Silva JE, Morsch VM, Schetinger MR (2005) Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1721:9–15
- [26] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375-8
- [27] Giusti G, Gakis C (1971) Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 12:417–425
- [28] Olivera GC, Postan M, González MN. Effects of artesunate against *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 156:26-31, 2015.
- [29] Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115: 5-13. 2010.
- [30] Baldissera MD, Souza CF, Grando TH, da Silva AS, Monteiro SG. (2016) Involvement of oxidative stress, cholinergic and adenosinergic systems on renal damage caused by *Trypanosoma evansi*: Relationship with lipid peroxidation. *Microbial Pathogenesis* 99, 191-195.
- [31] Di Virgilio F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal* 2005;1:205-9.
- [32] Boeynaems JM, Communi D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. *The Journal of Investigative Dermatology* 2006;126:943-4.
- [33] Sitkovsky MV. Use of the A_{2A} adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochemical Pharmacology* 2003;65:493-501.
- [34] Sitkovsky MV, Ohta A. The ‘danger’ sensors that STOP the immune response: the A₂ adenosine receptors? *Trends in Immunology* 2005;26:299-304.
- [35] Oliveira, C.B., Da Silva, A.S., Souza, V.C., Costa, M.M., Jaques, J.A., Leal, D.B., Lopes, S.T., Monteiro, S.G., 2012. NTPDase activity in lymphocytes of rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Parasitology* 139, 232e236.
- [36] Kalvegren H, Fridfeldt J, Bengtsson T. (2010) The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. *European Journal of Cell Biology* 89, 462-467.
- [37] Hasko G, Cronstein BN. (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology* 25, 33-39.

- [38] Grosskopf HM, Schwertz CI, Machado G, Bottari NB, da Silva ES, 328 Gabriel ME, Lucca NJ, Alves MS, Schetinger MRC, Morsch VM, Mendes RE, da Silva AS. (2017) Cattle naturally infected by *Eurytrema coelomaticum*: Relation between adenosine deaminase activity and zinc levels. *Research Veterinary Science* 110, 79-84.
- [39] Baldissera MD, Pivoto FL, Bottari NB, Tonin AA, Machado G, Aires AR, Rocha JFX, Pelinson LP, Dalenogare DP, Schetinger MRC, Morsch VM, Leal MLR, Da Silva AS. (2015a) Effect of zinc supplementation on ecto-adenosine deaminase 281 activity in lambs infected by *Haemonchus contortus*: Highlights on acute phase of disease. *Experimental Parasitology* 151-152, 34-38.
- [40] Baldissera MD, Bottari NB, Mendes RE, Schwertz CI, Lucca NJ, Dalenogare D, Bochi GV, Moresco RN, Morsch VM, Schetinger MRC, Rech VC, Jaques JA, Da Silva AS. (2015b) Activity of cholinesterases, pyruvate kinase and adenosine deaminase in rats experimentally infected by *Fasciola hepatica*: Influences of these enzymes on inflammatory response and pathological findings. *Pathology, Research and Practice* 211, 871-876.

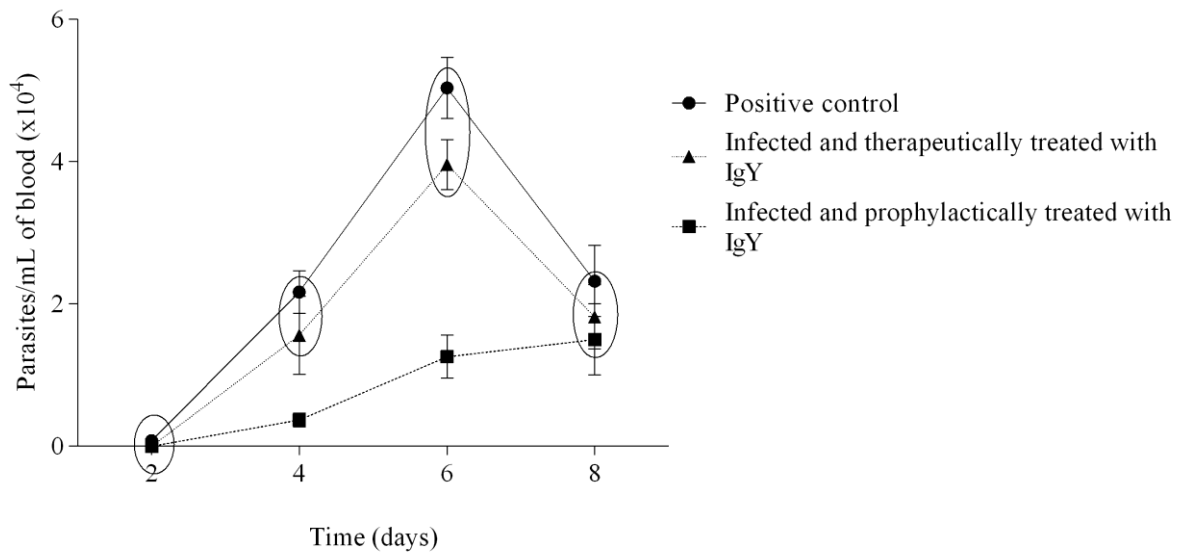


Fig 1 - Parasitemia of mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* and treated with IgY anti-*Trypanosoma cruzi* during 8 days of the experiment. Results with a circle not differ between groups considering $p < 0.05$ using a Tukey post-hoc test.

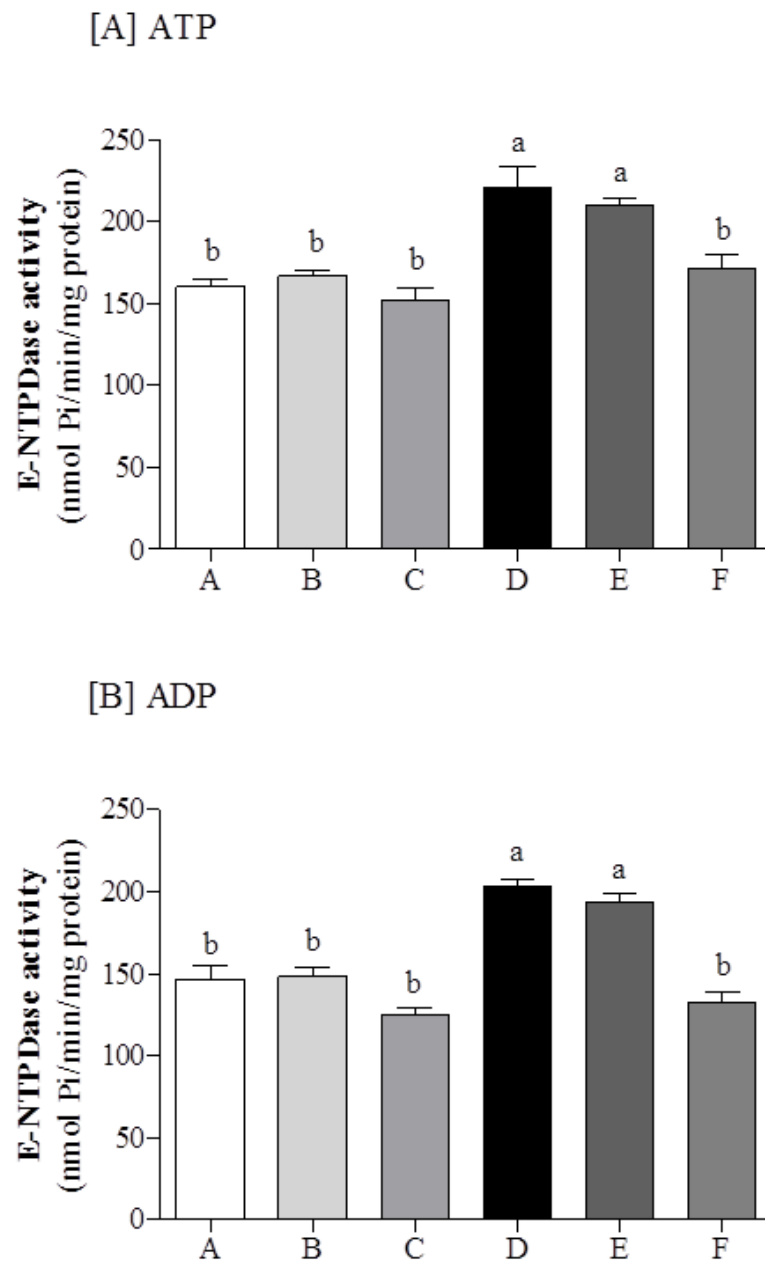


Fig. 2 - Adenosine triphosphate (ATP) [A] and adenosine diphosphate (ADP) [B] hydrolysis by E-NTPDase in splenic lymphocytes of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* treated with IgY anti-*T. cruzi*. Group A – uninfected control; group B – uninfected and treated prophylactically with IgY (50 mg/kg); group C - uninfected and treated therapeutically with IgY (50 mg/kg); group D – infected control; group E – infected and treated prophylactically with IgY (50 mg/kg); group F - infected and treated therapeutically with IgY (50 mg/kg). Different letters indicate statistical difference considering $p < 0.05$, using a Tukey post-hoc test.

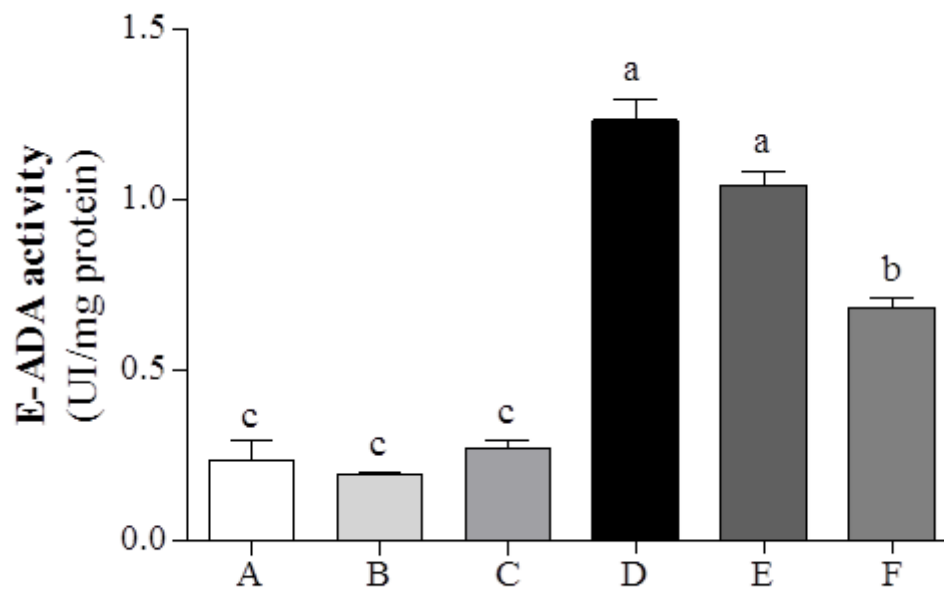


Fig. 3 - Ecto-adenosine deaminase (E-ADA) activity in splenic lymphocytes of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* treated with IgY anti-*T. cruzi*. Group A – uninfected control; group B – uninfected and treated prophylactic with IgY (50 mg/kg); group C - uninfected and treated therapeutically with IgY (50 mg/kg); group D – infected control; group E – infected and treated prophylactically with IgY (50 mg/kg); group F - infected and treated therapeutically with IgY (50 mg/kg). Different letters indicate statistical difference considering $p < 0.05$, using a Tukey post-hoc test.

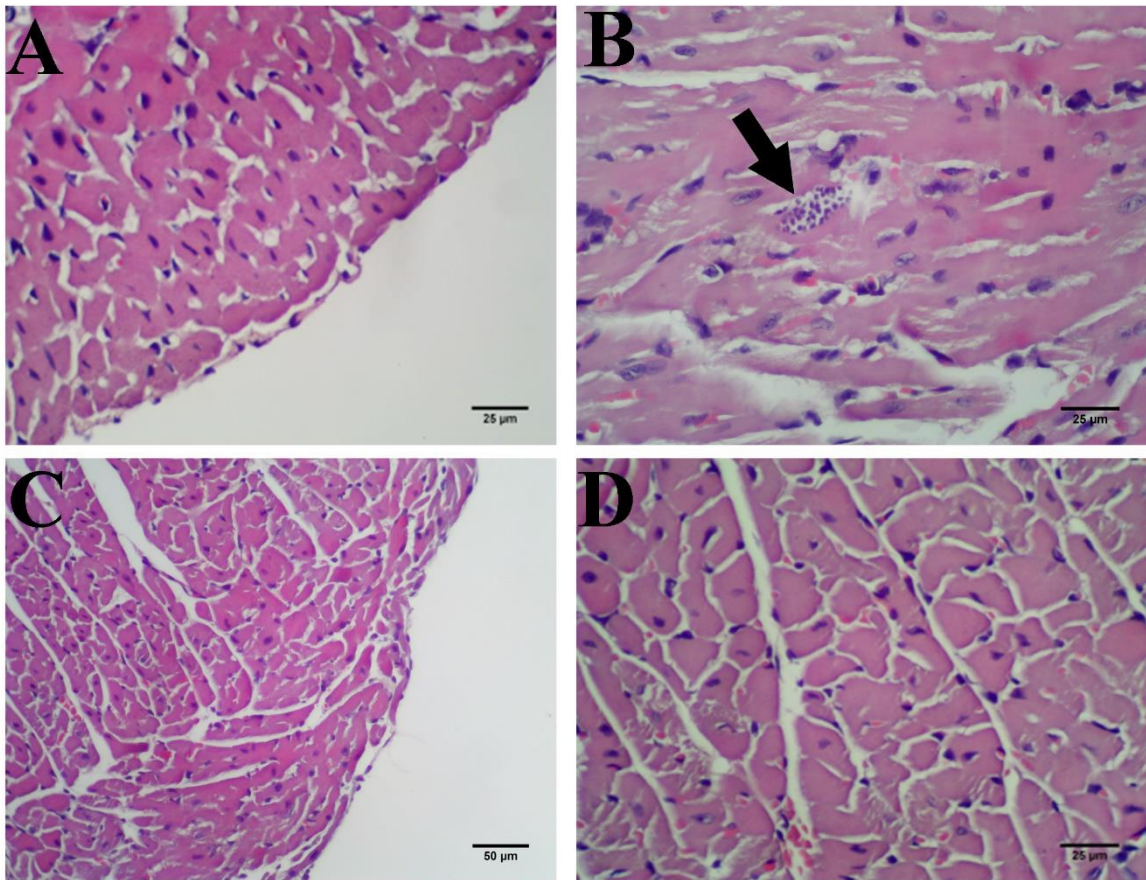


Figure 4 – Cardiac histopathology of uninfected mice (negative control) (group A) without presence of lesions (Figure A). Cardiac histopathology of experimentally infected mice with *Trypanosoma cruzi* showed mild to moderate amount of amastigotes containing pseudocysts in the myocardium (arrow) (Figure B), while no lesions and amastigotes were showed in the groups infected treated prophylactically with IgY (group E) (Figure C) and infected treated therapeutically with IgY (group F) (Figure D). Bar = 25 and 50 μm.

5. CONCLUSÕES

Na primeira etapa deste estudo foi possível constatar que o *Trypanosoma cruzi* foi capaz de induzir a produção de imoglobulinas Y específicas, em galinhas imunizadas com tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Com base nos resultados pode-se concluir que foi produzido uma quantidade significativa de IgY por meio de uma metodologia simples, além disso, as IgYs se mostraram efetivas no reconhecimento do antígeno e não apresentaram qualquer efeito tóxico a membrana celular em cultivos *in vitro*, mostrando assim que ela pode ser alvo de estudos como terapia alternativa em mamíferos infectados com este protozoário. Porém ela não se mostrou atrativa para uso em testes diagnósticos uma vez que o nosso protocolo de produção produziu imunoglobulinas que tiveram reconhecimento de cepas de *Trypanosoma evansi*, demonstrando uma possível reação cruzada.

O uso da IgY anti- *T.cruzi* como imunoterápico pode ser considerado uma abordagem interessante no controle e tratamento da doença de Chagas, uma vez que tanto o protocolo terapêutico como o profilático foi capaz de diminuir e/ou impedir a invasão dos parasitos nas células cardíacas na fase aguda. Além disso, a terapia com a IgY anti- *T.cruzi* levou a uma alteração nas ecto-enzimas do sistema purinérgico (atividades de NTPDase e adenosina desaminase (ADA) em linfócitos esplênicos sugerindo uma modulação na resposta imune e inflamatória de camundongos infectados experimentalmente por *T. cruzi* (cepa Y).

As perspectivas futuras deste estudo é que a IgY anti-*T. cruzi* possa servir como terapia de suporte, sendo uma alternativa eficaz e inovadora para auxiliar no controle e tratamento da Doença de Chagas, uma doença negligenciada, muitas vezes esquecida pelas indústrias farmacêuticas e que tem grande importância no contexto da Saúde Pública, porém para isso são necessários mais estudos sobre a sua farmacodinâmica, farmacocinética, mecanismos de ação e sua utilização terapêutica.

REFERÊNCIAS

- 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**, v. 160, p. 207-214, 1993.
- ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. G.; MARTINS, G. A. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotas. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1961-1967, 1996.
- ALMEIDA, I. C. et al. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 15, p. 793-802, 1994.
- ANDRADE, L. O. et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, p. 163-172, 1999.
- ANDRADE, S. G. Characterization of strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from an area around the city of Salvador, state of Bahia (Brazil). **Revista de patologia tropical**, v. 3, p. 65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, p. 721-726, 1985.
- ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 36, p. 217-222, 2006.
- BARR, S. C.; GOSSET, K. A.; KLEI, T. R. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observation of trypanosomiasis in dog infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 954-960, 1991.
- 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.; JONAUSKIEN, 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, p. 403-410, 2003.
- BOUHDIDI, A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotípico hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2 concentrations and highly avid IgG1 antibodies. **Parasite Immunol**, v. 16, p. 69-76, 1994.
- BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 358-404, 2006.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 114, p. 103-110, 1997.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431 p.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v. 4, p. 701-711, 2002.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in lower urinary tract. In: ABBRACCHIO, M. P.; WILLIAMS, M. (Eds.). **Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 151/I. Purinergic and Pyrimidinergic Signalling I - Molecular, Nervous and Urinogenitary System Function**. Springer - Verlag: Berlin, p. 423-515, 2001.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31-304, 2004.

CAI, Y. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, v. 61, p. 385-390, 2012.

CAMACHO, A. A.; ALVES, R. O. Cardiopatia chagásica en caninos. In: BELERENIAN, G.; MUCHA, C. J.; CAMACHO, A. A.; GRAU, J. M. **Afecciones cardiovasculares em pequenos animais**. Buenos Aires: **Inter-Médica**, Cap. 21, p. 289-295, 2007.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 128-138, 1996.

CARLANDER, D. et al. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization by gargling with specific antibodies. In: SIM, J. S. (Ed.). **Egg Nutrition and Biotechnology**. Wallingford: **CAB International**, p. 371- 374, 1999.

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

CASTRO, J. A. Contribution of toxicology to the problem of Chagas disease (American trypanosomiasis). **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 13, p. 271 - 279, 2000.

CASTRO, J. A.; MECA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chaga's disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006.

- CHACANA, P. A. et al. A new bacterium suitable for egg yolk immunoglobulin (IgY) large-scale chromatographic purification. **ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten**, v. 3, 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**, v. 85, p. 179-189, 2004.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- CHALGHOUMI, R. et al. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** v. 13, p. 295-308, 2009.
- CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **J Biomol Screen**, v. 20, p. 22-35, 2015.
- CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 260, p. 625-634, 1989.
- CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, p. 12-15, 2010.
- CONTRERAS, V. T. et al. Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas con epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. **Salus online**, v. 9, p. 33-44, 2005.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.
- _____. Doença de Chagas. In: COURA, J. (Ed.). **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 12-18, 2008.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 03-24, 2002.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.
- CRISANTE, G. et al. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3, p. 247-254, 2006.
- DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 12, p. 214-221, 2007.
- DEIGNAN, T. et al. Comparative analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. **Food Agricultural Immunology**, v. 12, p. 77-85, 2000.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 135, n. 3-4, p. 173-180, 2010.

DIAS, J. C. P. Control de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Brasil. **Medicina**, v. 55, p. 7-9, 1997. _____. **Doença de Chagas, Clínica e Terapêutica. In: Controle da doença de Chagas. Um manual prático par o clínico geral.** Brasília: Ministério da Saúde, Sucam, 1990. 56 p.

DIAS, J. C. P.; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, J.R. (ed.), **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 557-593.

ELLMAN G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p. 88-95, 1961.

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

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromise patients- a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 443-457, 2002.

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

GAUNT, M.; MILES, M. The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 557-565, 2000.

GAZZINELLI, R. T. et al. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi* : a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 345-356, 1991.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol.** v. 6, p. 895-906, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P. The microbicidal activity of interferongamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol.** v. 22, p. 2501-2506, 1992.

GESSI, S. et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: Focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, p. 826- 836, 2007.

GIUSTI, G. Adenosine deaminase. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Academic Press, New York, p. 1092-1099, 1974.

- HADGE, D.; ANBROSUIUS, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins-IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. **Mol. Immunol.** v. 21, p. 699-707, 1984.
- HATTA, H. et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared of rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 450-454, 1993.
- HÖLSCHER, C. et al. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi* -infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun.** v. 66, p. 1208-1215, 1998.
- KARLSSON, M.; LARSSON, A.; KOLLBERG, H. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2004.
- KESSLER, R.L.; CONTRERAS, V.T.; MARLIÉRE, N.P.; APARECIDA GUARNERI, A.; VILLAMIZAR SILVA, L.H.; MAZZAROTTO, G.A.C.A.; BATISTA, M.; SOCCOL, V.T.; KRIEGER, M.A.; PROBST, C.M. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Mol Microbiol** v.104, p.712-736, 2017.
- KIM, H.; NAKAI, S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 485-490, 1998.
- KO, K. Y.; AHN, D. U. Preparation of immunoglobulin y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. **Poultry Science**, v. 86, p. 400-407, 2007.
- KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 128, p. 2009-2012, 1982.
- LABADIE, G. R.; CHOI, S. R.; AVERY, M. A. Diamine derivatives with antiparasitic activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 615-619, 2004.
- LARSSON, A. et al. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, v. 10, p. 29-36, 1998.
- LEAL, D. B. R. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ectodiphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9-11, 2005.
- LEE, S. H. et al. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk IgY. **Poultry Science**, v. 88, p. 562-566, 2009a_____.
- Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 123-126, 2009b.
- LI, X. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) modulate the intestinal mucosal immune response in a mouse model of *Salmonella typhimurium* infection. **Int Immunopharmacol**, v. 36, p. 305-314, 2016.
- LIEKE, T. et al. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi* -infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, p. 357-364, 2006.

- LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** S. Paulo, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.
- MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 4, p. 1-16, 2002.
- 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.
- MAYA, J.D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.601-620, 2007.
- 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 Pública**, v. 29, p. 69-75, 2012.
- MESQUITA, M. L. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.
- MESULAM, M. M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-639, 2002.
- MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and Purification of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins: A Review. **Food and Agricultural Immunology**, v. 13, p. 275-288, 2001.
- MONTENEGRO et al. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 491-494, 2002.
- MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2ª ed. Roca, 370p. 2017.
- MORRISON, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 619-625, 2001.
- MULLER, S.; SCHUBERT, A.; ZAJAC, J.; DYCK, T.; OELKRUG, C. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutr J**. v.14 p. 109. 2015.
- MULVEY, G. L. et al. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1181-1187, 2011.
- MUNHOZ, L. S. et al. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, p. 153-160, 2014.
- MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. **Advances in Pharmacology**, v. 26, p. 19-33, 1994.
- NARAT, M. Production of Antibodies in Chickens. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 259-267, 2003.

NETO, A. V. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. Tratamento específico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, p. 63-64, 1999.

OMS. World Health Organization. Chagas disease. **WHO**, 2013._____. Control of Chagas disease: second report of the WHO Expert Committee. Geneva: **WHO, Technical Report Series**, v. 905, 2002.

ORTIZ-ORTIZ, L. et al. Enhanced mononuclear phagocytosis activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 50, p. 232-242, 1976.

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.

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.

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

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 92-100, 2001.

RAMIREZ, M. J. et al. 5-HT₂ receptor regulation of acetylcholine release induced by dopaminergic stimulation in rat striatal slices. **Brain Research**, v. 757, p. 17-23, 1997.

RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RASSI, A.; RASSI Jr. A.; RASSI, G. G. Fase aguda. In: ANDRADE, Z. A.; BRENER, Z.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RASSI, A.; RASSI JR., A. Doença de Chagas. In: AMATO-NETO, V.; GRYSCHKEK, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. (Eds.). **Parasitologia: uma abordagem clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 127-138, 2008.

ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T.; PEREIRA, M. E. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 53, p. 431-431, 1993.

ROSA, T. P. da. **Estudo das proteínas HSP70, SOD e catalase de *Angiostrongylus cantonensis* em hospedeiros habituais e acidentais**. 2014. 47p. Dissertação (Mestre em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2014.

ROSE, M. E.; ORLANS, E.; BUTTRES, N. Immunoglobulin classes in the hens' egg, their segregation in yolk and white. **Eur. J. Immunol.** v. 4, p. 521-523, 1974.

- ROTTENBERG, M. E. et al. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. **Eur J Immunol.**, v. 26, p. 3203-3213, 1996.
- SAMPAIO, L. C. L. et al. Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 96-103, 2014a.
- SAMPAIO, L. C. L. **Imunoterapia com IgY aviária em ratos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi***. 2014. 113p. Tese (Doutora em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2014b.
- SANTOS, F. N. **Implementação da tecnologia de IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2012. 113p. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública) Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, 2012.
- SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, v. 33, p. 1-26. 2005.
- SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106, p. 255-261, 1993.
- SILVA A. S. **Atividade da adenosina desaminase, concentração de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina em ratos infectados com *Trypanosoma evansi***. 2011. 137p. Tese (Doutora em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2014.
- SILVA, J. S. et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 111-115, 1998.
- SILVEIRA, J. F. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: ***Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro, p. 127-147, 2000.
- SOARES, P. M. **Produção e utilização de anticorpos IgY para o diagnóstico da brucelose**. 2013. 109 p. Dissertação (Mestre em Ciências veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2013.
- SOUZA V. C. G. **Influência do metabolismo do ATP extracelular na sinalização purinérgica em linfócitos e plaquetas de pacientes com a forma indeterminada da Doença de Chagas**. 2011. 129p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2011.
- STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 25-32, 2008.
- STOPPANI, A. O. The chemotherapy of Chagas disease. **Medicina (B Aires)**, v. 59, p. 147-65, 1999.

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

SVS. Secretária de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico. In: **Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013**. v. 46, n. 21, 2015.

TAN, S. H. et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **Journal of Immunological Methods**, v. 380, p. 73-76, 2012.

TARLETON, R. L. et al. Depletion of Tcellsubpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas disease. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1820-1829, 1994.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol.**, v. 19, p. 430-434, 2007.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. In: SIEGEL, G. J. et al (Eds.) **Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 213-242, 1999.

TELLERIA, J. et al. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 279- 288, 2006.

TESAR, D. B.; CHEUNG, E. J.; BJORKMAN, P. J. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 19, p. 1587-1593, 2008.

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

TONIN, A. A. **Componentes dos sistemas purinérgico e colinérgico nos processos inflamatórios e neurológicos em roedores infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii***. 2014. 179p. Tese (Doutora em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2014.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 418-428, 2009.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 853-859, 2002.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 495-501, 2003.

VASCONCELOS, G. A. L. B. M. de. **Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível aplicação em diagnóstico do vírus no fígado**. 2010. 104 p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, 2010.

VEGA, C. et al. Egg yolk IgY antibodies: A therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. **Res Vet Sci**. v. 103, p. 1-10, 2015.

- VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect Immun.** v. 62, p. 5177- 5182, 1994.
- VIOTTI, R. et al. The Impact of Socioeconomic Conditions on Chronic Chagas Disease Progression. **Rev Esp Cardiol.**, v. 62, p. 1224-32, 2009.
- WAGHABI, M. C. et al. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. **Cell. Microbiol.** v. 7, p. 511-517, 2005.
- 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.
- WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, p. 392-398, 1995.
- WILLIAMS, G. D. et al. Natural occurring Trypanosomiasis (Chaga's disease) in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, p. 171-177, 1977.
- WILMS, L. C. et al. 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.**, v. 582, p. 155-162, 2005.
- WOOLEY, J. A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukine-6 (I-L6) 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**, v. 13, p. 983-991, 2012.
- YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673-694, 2008.
- ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, v. 84, p. 203- 213, 1996.
- ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 364-371, 2003.
- ZINGALES, B. et al. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, Suppl 1, p. 159-164, 1999.
- ZULANTAY, I. et al. Enfermedad de Chagas crônica. Ausencia de Triatoma infestans intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. **Parasitol. Latinoam.**, n. 59, p. 93-98, 2004.