



## Tecnologia IgY: eficiente alternativa aos anticorpos convencionais de mamífero<sup>1</sup>

Jeniffer Clorives Lopes Batista<sup>2</sup>, Aline Rubens de Souza<sup>3</sup>, Paula Taquita Serra<sup>4</sup>, Daniele Souza de Farias<sup>5</sup>, Késsia Caroline Souza Alves<sup>6</sup>, Maria Edilene Martins de Almeida<sup>7</sup>, Juliane Correa Glória<sup>8</sup>, Diogo Pereira de Castro<sup>9</sup>, Luís André Morais Mariúba<sup>10</sup>

### Resumo

Os anticorpos policlonais aviários representam uma alternativa eficiente em relação aos anticorpos policlonais de mamífero, devido as vantagens que proporcionam, como método de obtenção de anticorpos menos invasivo, mais econômico e de alto rendimento. Isto impulsionou a comunidade científica a direcionar diversos estudos para explorá-los quanto a produção contra patógenos bacterianos, parasitários e virais, o que gerou a propostas de diversos mecanismos de ação para a atividade biológica de IgY; como a aglutinação de bactérias, inibição da adesão bacteriana, opsonização, mediação da atividade de fagócitos, neutralização de toxinas e até indução de apoptose.

**Palavras-Chave:** Imunoglobulina Y, anticorpo de aves; biotecnologia;

**IgY technology: efficient alternative to conventional mammalian antibodies.** Avian polyclonal antibodies represent an efficient alternative to mammalian polyclonal antibodies because of the advantages they provide as a less invasive, more economical and high yielding antibody method. This encouraged the scientific community to direct several studies to explore them regarding the production against bacterial, parasitic and viral pathogens, which led to proposals of several mechanisms of action for the biological activity of IgY; such as agglutination of bacteria, inhibition of bacterial adhesion, opsonization, mediation of phagocyte activity, neutralization of toxins and even induction of apoptosis.

**Key-words:** Avian immunoglobulin; egg yolk antibody; biotechnology;

---

<sup>1</sup> Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor em Biotecnologia/UFAM

<sup>2</sup> Mestranda em Biotecnologia/UFAM, Manaus-AM. E-mail: [jeniffer.clorives@gmail.com](mailto:jeniffer.clorives@gmail.com)

<sup>3</sup> Mestre em Biotecnologia, ILMD/ Fiocruz Amazônia, Manaus-AM, E-mail: [alineerubens@gmail.com](mailto:alineerubens@gmail.com)

<sup>4</sup> Doutoranda em Biologia Celular e Molecular IOC/ILMD. Rio de Janeiro, RJ. E-mail: [paulatakita@hotmail.com](mailto:paulatakita@hotmail.com)

<sup>5</sup> Bolsista LMD/Fiocruz Amazônia. Email: [dandan.farias@gmail.com](mailto:dandan.farias@gmail.com)

<sup>6</sup> Doutoranda em Biotecnologia UFAM, Manaus-AM, Brasil. E-mail: [kessiafenty@gmail.com](mailto:kessiafenty@gmail.com)

<sup>7</sup> Doutoranda em Biologia Celular e Molecular IOC/ILMD, Rio de Janeiro, RJ, E-mail: [edilene\\_martins19@hotmail.com](mailto:edilene_martins19@hotmail.com)

<sup>8</sup> Doutoranda em Biotecnologia UFAM, Manaus, AM, E-mail: [juliane.correa.biotec@gmail.com](mailto:juliane.correa.biotec@gmail.com)

<sup>9</sup> Dr. em Biotecnologia, ILMD/ Fiocruz Amazônia, Manaus, AM, E-mail: [diogocastrop@gmail.com](mailto:diogocastrop@gmail.com)

<sup>10</sup> Biotecnologista, ILMD/Fiocruz Amazônia, Manaus, AM, E-mail: [lamariuba@hotmail.com](mailto:lamariuba@hotmail.com)



## 1. Introdução

Imunoglobulinas são glicoproteínas conhecidas como anticorpos produzidas em resposta a uma exposição antigênica, sendo também denominadas imunoglobulinas (Igs), são encontradas principalmente no sangue e fluidos teciduais (AMRO et al., 2018; MUNHOZ et al., 2014). Os anticorpos funcionam como mediadores moleculares que facilitam a eliminação de antígenos por meio de opsonização, neutralização e ativação do complemento (LEE et al., 2017). Devido ao papel biológico que desempenham, os anticorpos foram aplicados no campo de imunodiagnóstico e imunoterapia contra o câncer, doenças infecciosas como a raiva e o tétano, promovendo grande impacto em medicina humana e veterinária (BARATI et al., 2018; GUIMARÃES, 2008). Os anticorpos são considerados ferramentas biotecnológicas de alto valor, sendo o segmento de maior crescimento no mercado de produtos biológicos alcançando atualmente US\$40 bilhões no mercado farmacêutico, US\$ 8 bilhões no mercado de diagnóstico de doenças e US\$ 2 bilhões no mercado de pesquisas científicas (CONROY et al., 2017).

Os anticorpos monoclonais possuem elevada atividade neutralizante, um alto custo produtivo e meia vida que varia de dois dias a um mês *in vivo*, necessitando de repetidas dosagens, além de necessitar de mão de obra qualificada para a administração, requerendo novas abordagens de entrega para uma efetiva intervenção (YAMAZAKI et al., 2018; MEJIAS et al., 2017; DEAL et al., 2015). Em contraste, os anticorpos policlonais convencionais de mamíferos possuem baixo custo produtivo, porém é um método bastante invasivo que geralmente requer sangria do animal para a obtenção de anticorpos em grandes quantidades (BARATI et al., 2018; MUNHOZ et al., 2014).

Os anticorpos monoclonais e policlonais de mamíferos são frequentemente utilizados em áreas de pesquisa de diagnóstico, mas recentemente os anticorpos policlonais encontrados em aves, tem sido utilizado como alternativa aos anticorpos de mamíferos por apresentarem diversas vantagens como baixo custo produtivo, método de obtenção não invasivo (através de gema de ovo) e atividade biológica funcional semelhante à de anticorpos de mamíferos (KHAN et al., 2017). Diversos trabalhos tem evidenciado o potencial dos anticorpos IgY

como uma alternativa eficiente na proteção contra agentes infecciosos como *Vírus Dengue II*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosas*, tendo também ação contra peçonhas de serpentes e escorpiônicas. (SHENG et al., 2015; BARATI et al., 2018).

Neste contexto, esta revisão descreve características estruturais e funcionais da imunoglobulina aviária relacionando suas propriedades para utilização em imunodiagnóstico, imunoterapia e imunoprofilaxia, além de também relacionar algumas particularidades entre a imunoglobulina aviária e a IgG de mamíferos.

## 2. Metodologia

A revisão da literatura sobre Imunoglobulinas Y e suas principais aplicações na área da saúde foi realizado por meio de busca de publicações de pesquisas sobre características gerais, métodos de produção, isolamento e aplicações, disponíveis em banco de dados eletrônicos, PUBMED e Periódico Capes, NCBI e Derwent Innovations Index. O período das publicações foi de 1999 a 2018, cujas palavras-chave foram: “anticorpos aviários”, “imunoglobulina de gema de ovo”, “tecnologia IgY” e “gema hiperimune pulverizada”.

## 3. Imunoglobulina Y

Os anticorpos IgY foram descritos pela primeira vez em 1893 por Klemperer, o qual verificou que a imunização de uma galinha resultava na transferência de anticorpos do soro da ave para a gema de ovo. O conhecimento não teve aplicação científica para a época e somente despertou interesse quando o bem-estar animal se tornou uma questão ética para a comunidade científica, recebendo reconhecimento internacional como método alternativo de produção de anticorpos policlonais na década de 1990 (GHAFFARIAN et al., 2016). IgY (do inglês *yolk* = gema) é o termo utilizado para identificar o isotipo de anticorpo mais abundante em aves e possui homologia funcional semelhante a IgG de mamífero (XU et al., 2019; HONG et al., 2018; CONROY et al., 2017;). Os anticorpos IgY comumente encontrados no plasma de aves e na gema de ovo, uma rica fonte de anticorpos policlonais (SHENG 2017), também são o isotipo sérico predominante de outros animais vivíparos como anfíbios, répteis e peixes pulmonados (RAHMAN et al., 2014; ABAAS et al., 2018).



### 3.1. Características estruturais, físico-químicas e funcionais

IgY apresenta uma estrutura molecular básica de qualquer imunoglobulina, como uma macromolécula contendo duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas leves unidas entre si por pontes dissulfeto, ambas contendo uma parte constante e outra variável. A região N-terminal das cadeias leves e pesadas são chamadas de Fab e são as responsáveis pelo reconhecimento e ligação do antígeno, enquanto a região C-terminal da cadeia pesada é chamada Fc, responsável pela atividade biológica funcional. A região constante da cadeia pesada apresenta um domínio Ig em sua estrutura, conferindo à molécula massa molecular superior à de IgG de mamífero (MINE et al. 2008). A imunoglobulina aviária possui peso molecular de 180 KDa e uma região de dobradiça mais curta, relacionada a menor flexibilidade da molécula comparada a IgG, que possui 160 KDa e região de dobradiça mais longa. Assim como em IgG, a região Fc de IgY é o sítio de maior atividade biológica da estrutura, contendo duas cadeias de carboidratos laterais, enquanto IgG possui somente uma cadeia (SUDJARWO et al., 2017; MULLER et al., 2015).

Em comparação a IgG de mamífero, a IgY aviária é mais sensível a desnaturação ácida e sofre perda rápida de atividade quando fora da faixa de pH 4-11 pois pode sofrer mudanças conformacionais por distorção no sítio de ligação ao antígeno (SANTOS et al., 2012; ABBAS et al., 2018). Ainda assim, se necessário, a estabilidade a condições de extrema acidez e de alta pressão pode contornada com uso de reagentes estabilizadores como sorbitol, sacarose, manitol ou polietilenoglicol (KOLBERG et al., 2015; PAULY et al., 2011). Segundo Hegemann e colaboradores (2017), a atividade da IgY não é afetada em decorrência de congelamento e descongelamento, possuindo boa estabilidade ao calor em temperatura de até 65°C em condições aquosas, podendo um ovo ser armazenado a 4°C por até seis meses, a -20°C por até 12 meses sem que haja perda da atividade biológica de IgY (SANTOS et al. 2012). No entanto, segundo Abbas e colaboradores (2018) uma das características úteis de IgY é a sua estabilidade durante etapas de processamento e sob condições fisiológicas após a administração. Segundo o mesmo, os anticorpos podem ser armazenados a 4°C de cinco a dez anos sem perda significativa de sua atividade, a

temperatura ambiente por até seis meses e a 37°C por um mês.

Apesar de ambas imunoglobulinas, IgY e IgG, desempenham atividade biológica semelhante, a sequência de DNA de genes codificantes de IgY indicam que há uma maior similaridade com IgE e IgA quando comparada a IgG, indicando que IgY pode ser o precursor filogenético de IgE, IgA e IgG de mamíferos devido a capacidade de IgY em mediar reações anafiláticas. (GUIMARÃES et al., 2008). Segundo Larsson e colaboradores (1993), a distância filogenética ave-mamífero tornou possível a produção de anticorpos IgY contra proteínas altamente conservadas de mamíferos, possibilitando uma capacidade superior de reconhecimento e ligações a epítomos em um antígeno. Característica como essas são vantajosas para aplicações em diferentes áreas biomédicas por colaborar com a redução de interferências em imunoenaios, como reações cruzadas. Isto se deve a incapacidade de reagir com fatores reumatóides (Rfs), impossibilidade de ligação às proteínas estafilocócica (A) e estreptocócica (G) devido à ausência de sítios Fc correspondentes, na incapacidade de ativar proteínas do Sistema Complemento de mamíferos juntamente com a baixa reatividade cruzada com IgG de mamífero (HONG et al., 2018; MUNHOZ et al., 2014).

Segundo Abbas e colaboradores (2018), a imunogenicidade de IgY já foi testada em suínos e murinos e em ambos os modelos animais, foi demonstrado que administração dos anticorpos por vias locais e sistêmicas induziram uma resposta de anticorpos anti-IgY, principalmente da classe IgG. Embora todas as propriedades bioquímicas de IgY não colaborem para uma ligação considerável a receptores Fc em mamíferos, a imunoglobulina aviária é antigênica e isto sugere que a administração de anticorpos em grandes quantidades pode desencadear a doença do soro.

### 3.2 Produção de anticorpos policlonais em aves

Animais utilizados na produção de imunoglobulinas por período superior a três meses, geralmente necessitam dose reforço para manter elevada titulação de anticorpos (MUNHOZ et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2008). Aves galiformes (galinhas poedeiras), podem ser utilizadas na produção de anticorpos logo que entram em período de postura de ovos, e em apenas um mês a produção de anticorpos aviários pode



alcançar com facilidade uma elevada titulação, equivalente a um ano de produção em mamíferos leporídeos (KOUSTED et al., 2017). Amro e colaboradores (2018) recomendam imunizar as aves antes do período de postura de ovos, já que o estresse induzido pelo manuseio da ave pode promover efeito adverso a produção dos ovos, assim também como a natureza do adjuvante e antígeno. A produção de anticorpos policlonais em grande quantidade em aves a partir da gema de ovo é simples e não requer sangria do animal para a obtenção, pois apenas uma gema de ovo contém de 70-150 mg de anticorpos IgY, sendo que 2% a 10% do rendimento são específicos ao antígeno utilizado na imunização (LEE et al; 2017; SUDJARWO et al. 2017).

Em cerca de seis dias após a primeira imunização, já é possível a obtenção de anticorpos com alta avidéz, mas no vigésimo oitavo dia após a imunização é que se encontra uma titulação mais elevada, podendo ave produzir IgY específico por cerca de 200 dias (SUDJARWO et al. 2017; ANDRADE et al., 2013; ALMEIDA et al., 1998). Isto pode variar, dependendo do tipo, massa molecular e dose do antígeno, em conjunto com o tipo de adjuvante, via de administração e linhagem genética da ave. As vias de administração mais utilizada na imunização de aves são a intramuscular no músculo peitoral, e a via subcutânea, mas a intramuscular também é bastante utilizada e independente da via determinada, os intervalos variam de duas a oito semanas, dependendo do objetivo que se pretende alcançar (MUNHOZ et al., 2014). Nos estudos de Sudjarwo e colaboradores (2017), a concentração de anticorpos na gema de ovo aumentou durante as imunizações até a sexta semana, onde começou a elevar significativamente em duas semanas após a primeira imunização, atingindo um platô na quarta semana e diminuindo gradativamente após a sexta semana.

Amro e colaboradores (2018), desenvolveram um estudo de otimização de produção e purificação de anticorpos IgY de gema de ovo de galinha para alcance de alto rendimento tanto para a pesquisa quanto para fins comerciais. Foi constatado que a pureza e o rendimento de IgY podem variar bastante de método para método e requerem otimização para cada experimento. A produção de anticorpos IgY se deu em duas diferentes raças de galinhas, Leghorns Whit e a Rhode Island Red, as quais resultaram em 3,66 mg/gema e

8,37mg/gema, evidenciando que a última raça desenvolveu uma melhor resposta imunológica. A extração de IgY da gema também foi realizada a partir de dois diferentes métodos, o de precipitação com polietilenoglicol 6000 e cromatografia de filtração em gel, um método não desnaturante, resultando num melhor resultado quando combinado os dois métodos (AMRO et al.,2018).

### 3.3. Isolamento de IgY

Diversos métodos relativamente simples, baratos e eficazes foram desenvolvidos para o isolamento e purificação de IgY da gema de ovo, como precipitação com polietilenoglicol, sulfato de amônio, ácido caprílico ou carragena, diluição em água, ultrafiltração, filtração em gel, cromatografia em gel tiofílico ou cromatografia de troca iônica (KHAN et al., 2017; SUDJARWO et a., 2017; TAN et al., 2012; PAULY et al., 2011). Esses métodos proporcionam uma IgY biologicamente ativa, com 80% de pureza e com baixo custo, um atrativo para utilização em laboratórios de pesquisa e também em escala industrial. Várias dessas técnicas podem ser realizadas para retirada de impurezas, após a etapa de extração (MUNHOZ et al., 2014).

Alguns estudiosos como Akita e Nakai (1993), sugeriram a diluição em condição aquosa ácida para um procedimento mais econômico e eficiente para produção de anticorpos em alta escala comparado aos métodos de polietilenoglicol, em termos de rendimento, pureza e atividade biológica de IgY. Apesar de existirem diversos métodos de isolamento de IgY, a maioria dos trabalhos atuais utilizam o polietilenoglicol como PEG6000 para a precipitação se sobrenadantes, que geralmente resultam em impurezas proteicas (AMRO et al. 2018). Há também kits comerciais disponíveis que não utilizam solventes orgânicos e que envolvem os mesmos princípios, que resultam em uma IgY com pureza de 70% a 90% (TAN et al., 2012).

Embora superiores aos anticorpos de mamíferos, os anticorpos IgY ficaram sob uma aplicação prática limitada devido procedimentos de purificação complexos ou demorados. Apesar de vários métodos de purificação terem sido desenvolvidos, todos esses métodos possuem a desvantagem de proporcionar graus de pureza inferior ou igual a 80%. A proteína G estreptocócica (SPG) é a proteína de ligação a Ig muito utilizada para purificação de anticorpos de mamíferos e inviável para purificação de IgY. Xuemei e colaboradores (2016) relatara em seus



estudos uma coluna cromatográfica de afinidade baseada em proteína M, uma proteína transmembranar de micoplasma humano pôde se ligar a IgY e possibilitar uma purificação cerca de 125 vezes mais elevada que o método de precipitação com polietilenoglicol. No entanto, a purificação baseada em proteínas bacterianas requer atenção para prevenir contaminação com endotoxinas, pois o micoplasma é altamente tóxico e antigênico, gerando grande possibilidade de contaminação durante os processos de purificação em larga escala (KHAN et al., 2017). Nos estudos de Zhang e colaboradores (2017), o domínio C2 da proteína estreptocócica G (SPG), que possui afinidade com IgY, foi expressa em *Escherichia coli* como uma proteína de fusão de polipeptídeo tipo elastina (ELP), que resultou no desenvolvimento de um novo método de purificação de IgY, fornecendo um grau de pureza de 96,3% e rendimento de 64% graus significativamente mais elevados que todos os métodos tradicionais. Em contraste com o método de precipitação por sulfato de amônio, que pode ser realizado em 3,3 horas e o fracionamento com etanol em 4,3 horas, o método de captura de IgY a partir do domínio C2-ELP pode ser realizado em até três horas; o que o promove como método eficiente, simples e com bom apreciável custo benefício para purificação de IgY (ZHANG et al., 2017). Khan e colaboradores (2017) desenvolveram peptídeos sintéticos, expressos em fago T7, com alta especificidade de ligação à região Fc de IgY, que podem ser utilizados como ligantes de alta afinidade na purificação de imunoglobulinas Y.

#### 4. Versáteis aplicações

A imunoglobulina aviária tem sido bastante explorada nas últimas décadas, e isto se deve as propriedades bioquímicas distintas em relação à IgG de mamífero. Tais propriedades a tornaram vantajosa em vários aspectos possibilitando a exploração e introdução não só na pesquisa básica e aplicada como também na indústria farmacêutica (XU et al., 2019).

##### 4.1 Neutralização

A tecnologia IgY tem se mostrado uma alternativa eficiente para os acidentes ofídicos e escorpionicos. Em recente estudo *in vivo* realizado por Araújo e colaboradores (2010) foi demonstrada a capacidade de IgY em neutralizar a dose letal de

um *poll* de cinco peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. O estudo realizado por Andrade e colaboradores (2013) verificou-se que os anticorpos de alta avidéz produzidos contra o veneno de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* proporcionaram alta atividade neutralizante *in vitro* sobre a maioria dos antígenos presente nos venenos.

Além disso verificou-se que a IgY aviária é um anti-veneno mais potente que o antiofídico convencional de mamífero, o que pode ser a base para a terapia direcionada a acidentes ofídicos e precisam, portanto, ser aprofundados para confirmar a segurança e eficácia como antídoto de uso animal e humano (DUAN et al., 2016). Alvarez e colaboradores (2013) produziram anticorpos IgY contra o veneno do escorpionídeo *Tityus caraptensis* e verificaram que, os anticorpos foram capazes de neutralizar (*in vitro*) não só veneno da espécie alvo como os de outras espécies do gênero *Tityus*. Os mesmos anticorpos não reconheceram os antígenos presentes no veneno de espécies de outros gêneros. Dessa maneira, sugeriram que a tecnologia IgY pode ser aplicada em alternativa ao antiescorpionico equino no país. No contexto de toxinas, Barati e colaboradores (2018) foram desenvolvidos contra toxina de *Vibrio cholera*, utilizando uma proteína recombinante como imunógeno, para obtenção de IgY. Os anticorpos purificados foram analisados por técnicas imunológicas *Western Blot* e *ELISA*, demonstrando ser eficientes no reconhecimento da recombinante. Esses anticorpos também foram avaliados quanto ao efeito protetor em camundongos neonatais desafiados por via oral com *Vibrio cholera*. A administração dos anticorpos purificados promoveu um aumento da taxa de sobrevivência dos animais, o que sugere a possibilidade de uso como método de imunidade passiva para tratamento da infecção.

Em um estudo sobre toxina Shiga, que gerou a patente CN101570574-A, os inventores Bao e colaboradores (2009) desenvolveram anticorpos IgY contra a toxinas Shiga tipo I recombinante, extraindo e purificando pelos métodos de diluição em água e por cromatografia em Dietilaminoetil (DEAE), respectivamente. Os achados de Bao demonstraram que o IgY produzido, devido ao efeito neutralizante, pode atuar como antitoxina oral para prevenção e tratamento de doenças causadas por bactérias produtoras de toxinas Shiga. Arimitsu e colaboradores (2014), afim de avaliar



uma possível aplicação clínica da tecnologia IgY, produziram anticorpos IgY contra a toxina Shiga 2e, uma das principais causas de Edema Suíno (ED).

A especificidade dos anticorpos foi analisada por *western blot*, através do qual foi verificado que IgY reagiu com as duas subunidades A e B da toxina Shiga2, tendo uma reação fraca com a subunidade A e B da toxina Shiga2 e a subunidade B de Shiga1de testes comerciais (controle). Avaliações de neutralização *in vitro* e *in vivo* foram realizadas para verificar a capacidade de IgY frente a dose letal da toxina. No ensaio *in vivo*, IgY foi avaliado quanto ao efeito protetor em murinos fêmea de cinco dias de idade, ao ser inoculado via intraperitoneal em conjunto com a toxina em doses aumenta em 10,5 e 2,5 vezes, tendo os animais sobrevivência monitorada por sete dias. Verificou-se que, os animais que receberam o inóculo de IgY foram resistentes a DL50 da toxina (aumentada 2,5 e 5 vezes) aplicada simultaneamente, em comparação com os animais que não resistiram ao receber DL50 aumentada 10 vezes. Desta maneira, a gema pulveriza contendo IgY específicos pode ser adequado como alimento funcional para prevenir ED em suínos, enquanto o IgY purificado pode ser utilizado em um kit de diagnóstico econômico para a doença.

Um sistema de detecção elétrica direta que utiliza a imunoglobulina aviária como elemento de reconhecimento biológico foi desenvolvido por Figueiredo e colaboradores (2015). Os anticorpos IgY foram produzidos contra a proteína NS1 (proteína não estrutural do vírus Dengue tipo II) e imobilizados em eletrodos de Au, que foram caracterizados por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (VC). O IgY anti-NS1 apresentou alta especificidade para a proteína NS1, que foi detectada em amostras-padrão (soro de infectados voluntários) na faixa de concentração de 0,1 a 10 µg/mL com um limite de detecção de 0,09 µg/mL. Os anticorpos IgY são alternativas eficientes em relação aos anticorpos de mamíferos e considerando que os testes convencionais ELISA e PCR (Reação em cadeia da Polimerase) são métodos onerosos, o imunossensor proposto pode ser uma alternativa promissora para o diagnóstico precoce da Dengue, ainda que em casos de leve infecção.

Fink e colaboradores (2017) produziram anticorpos IgY contra partículas inativas do vírus Dengue tipo II, que tiveram a atividade

neutralizante determinada por ELISA, também foi determinada por teste de inibição da invasão em monócitos humanos. Camundongos com seis semanas de vida foram desafiados com dose letal do vírus por via intravenosa, tratados com IgY por via intraperitoneal após 24 horas de infecção e acompanhados durante 10 dias. Verificou-se que os animais tratados com IgY não sucumbiram a doença, em relação aos animais tratados com anticorpo monoclonal e em contraste com os animais infectados e não tratados, demonstrando que a IgY foi eficaz na neutralização viral *in vitro* e *in vivo*. A quantidade de IgY necessária para proteger o animal foi maior que a quantidade de anticorpo monoclonal necessária, e provavelmente a IgY induza a respostas imunológicas, apesar dos receptores Fc serem ausentes nos anticorpos policlonais aviários. Sem dúvida, a exploração de IgY é uma potente alternativa na ausência de vacina eficaz, no entanto, estudos precisam elucidar a antigenicidade e alergenicidade de IgY em modelos animais mais relevantes.

#### 4.2 Inibição de Crescimento Bacteriano

As propriedades imunológicas da IgY contra *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* foram investigadas por Lee e colaboradores (2002) utilizando vários métodos de avaliação *in vitro*, como ELISA, ensaio de inibição do crescimento e microscopia. A observação através de microscopia revelou alterações estruturais na superfície de bactérias ligadas a IgY e inibição do crescimento bacteriano, como consequência; demonstrando uma ligação específica de IgY e sugerindo o comprometimento de componentes da superfície bacteriana. Estudos semelhantes, envolvendo *Pseudomonas aeruginosa*, bastante comum em infecções em pacientes com fibrose cística não crônica, demonstraram por imunofluorescência a capacidade de IgY específico em mediar a ação de fagócitos (neutrófilos e monócitos) e reduzir a viabilidade celular bacteriana de 70 a 89%. Foi observado *in vitro* que a IgY opsonizou o patógeno e promoveu o aumento da explosão respiratória dos neutrófilos com subsequente morte bacteriana. Thonsen e colaboradores (2016) sugeriram que a profilaxia oral com a IgY aviária pode colaborar com a imunidade inata por facilitar a depuração bacteriana. Em estudos de Shi e colaboradores (2017), murinos Balb/c induzidos a pneumonia aguda receberam IgY específico administrado por



via intraperitoneal, o qual reduziu a mortalidade e inflamação no tecido pulmonar causada por cepas *Acinetobacter baumannii*, resistentes a drogas pan-clínicas; o que sugeriu a potencial utilização da IgY como nova abordagem terapêutica no tratamento de infecções causadas pela bactéria. (SHI et al., 2017).

Devido ao amplo espectro de aplicação, a tecnologia IgY também tem sido explorada para o desenvolvimento de produtos de cuidados com pele, como os utilizados para o tratamento de acne que induzam menos efeitos colaterais, alimentos funcionais e produtos de higiene pessoal. Revath e colaboradores (2014) produziram IgY contra *Propionibacterium acnes*, e avaliaram *in vitro* a capacidade dos anticorpos quanto a capacidade de ligação específica, capacidade de inibição de crescimento bacteriano e inibição da Após a primeira dose reforço, a titulação de 0,323 foi determinada através de ELISA indireto. O teste de inibição do crescimento revelou que as Bactérias *P. acnes* ativas incubadas juntamente com IgY por 48 horas, tiveram uma redução significativa do número de colônias, em relação ao controle. O teste de inibição de aderência em tubo demonstrou redução significativa da aderência bacteriana. No entanto, mais estudos devem ser realizados para comprovar a eficiência *in vivo*, já que a tecnologia demonstra ser uma promissora alternativa para a terapia antimicrobiana convencional para o tratamento antimicrobiano contra acne.

Horie e colaboradores (2004), produziram anticorpos IgY altamente específicos contra a enzima urease, o principal fator para colonização de *Helicobacter pylori* na mucosa gastroduodenal. Um iogurte comercial foi suplementado com 1% de gema de ovo contendo IgY, mantendo estabilidade no produto por até sete dias, e perdendo 85% de atividade biológica após três semanas de armazenamento. O estudo clínico foi realizado para determinar a eficácia do iogurte funcional na supressão de infecção por *H. pylori* 42 pessoas voluntárias positivos para o patógeno. Um grupo de pessoas recebeu 450 mL de iogurte suplementado e outro grupo recebeu iogurte sem IgY, ambos grupos recebendo doses de 150mL três vezes ao dia, durante quatro semanas, com posterior avaliação. Após este período, verificou-se que os valores do teste respiratório da urease diminuíram significativamente no grupo teste comparado com o grupo controle, o que indica que a supressão da infecção causada por *H. pylori* em

humanos pôde ser alcançada pelo consumo de iogurte funcional baseado em tecnologia IgY anti-urease; produto este, já disponível no mercado. Em um estudo semelhante Nadji e colaboradores (2016) desenvolveram um modelo de infecção por *H. pylori* para tratamento de gastrite a partir de anticorpos IgY. Camundongos imunizados passivamente com IgY anti-*H. pylori* apresentaram grau de infecção significativamente menor comparado aos animais que não imunizados, o que sugere a alternativa eficiente que pode ser utilizada como terapia complementar combinada com a antibioticoterapia convencional. Hong e colaboradores (2018), desenvolveram anticorpos IgY contra a citotoxina vacuolante A (VacA), que está dentre as proteínas tóxicas de múltiplos efeitos liberada por *H. pylori* e que permite sua persistência no estômago. As imunoglobulinas Y produzidas contra diferentes proteínas recombinantes VcA purificadas foram adicionadas a água de camundongos C57BL/6 duas semanas antes e quatro semanas após a inoculação com o patógeno. O grupo tratado com IgY anti-VcA apresentou significativa redução de *H. pylori* nos tecidos gástricos e infiltração de eosinófilos em comparação ao grupo não tratado. Logo, a administração oral de IgY anti-VcA está relacionada a um efeito protetor contra a colonização bacteriana de *Helicobacter pylori* e apresenta grande potencial como candidato a fármaco para tratamento de infecções dessa natureza.

No estudo de Guimarães e colaboradores (2005), anticorpos IgY foram produzidos contra *Staphylococcus aureus*. Os anticorpos foram capazes de reduzir o crescimento bacteriano para sete unidades formadoras de colônia (U.F.C) em comparação com 45 U.F.C, sem a presença IgY, ambos analisados após 12 horas. A atividade de IgY pode estar relacionada com a habilidade de neutralizar sítios de comunicação celular, impedindo a reprodução bacteriana, o que demonstra o potencial profilático e até terapêutico para infecções, não somente como método de diagnóstico. Outro estudo envolvendo *Streptococcus mutans*, a partir de isolados de pacientes com cárie dentária, demonstrou que o IgY além de inibir a formação de biofilme dos isolados, alterou o perfil proteico bacteriano. Dessa maneira, Bachiar e colaboradores (2016) sugeriram a IgY aviária como estratégia promissora para



fornecer um nível de proteção contra cárie causada por *S. mutans*.

Xu e colaboradores (2018) avaliaram os efeitos clínicos de anticorpos IgY produzidos contra *Porphyromonas gingivalis* como método de tratamento de periodontite crônica moderada a grave. O estudo envolveu 60 pacientes que foram tratados com enxaguante bucal contendo IgY avaliados, sendo acompanhados por quatro semanas. Apesar de não ter apresentado diferença significativa em comparação com o grupo placebo, os anticorpos melhoraram o aspecto clínico da doença, podendo dentro de limitações, serem utilizados em métodos de imunidade passiva para tratamento da doença.

#### 4.5 Citotoxicidade

Atualmente, estudos envolvendo diferentes tipos de anticorpos produzidos contra as proteínas DR4 e DR5 (receptores de membrana associados a apoptose em células saudáveis) estão em fase de estudos clínicos, embora todos sejam ineficientes sozinhos, precisando estar associados a tratamentos quimioterápicos. Nos estudos de Amirjavid e colaboradores (2016), anticorpos IgY específicos foram produzidos contra um pequeno domínio extracelular da proteína DR5, no intuito de mimetizar um indutor de apoptose. Nessa investigação, verificou-se através de citometria de fluxo, que IgY induziu células cancerosas de cancro de mama a apoptose em contraste com o efeito não apoptótico em hepatócitos, que tiveram proliferação celular normal na presença do anticorpo. A especificidade de IgY na indução de apoptose em células cancerosas demonstrou o direcionamento específico, demonstrando potencial para aplicação terapêutica, com efeitos colaterais reduzidos por via apoptótica.

Vários pesquisadores já demonstraram que a utilização da imunoglobulina aviária específica pode ser útil na prevenção e tratamento de doenças infecciosas e parasitárias. Baseado nessas evidências, Grandó e colaboradores (2017) realizaram um estudo sobre o efeito citotóxico de anticorpos IgY produzidos contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, frente a células saudáveis, visto que não há vacina licenciada, tão pouco um tratamento efetivo. Através do ensaio de proliferação celular, verificou-se que os anticorpos IgY não tiveram atividade citotóxica sobre a proliferação de células VERO (célula renal) nem sobre as células mononucleares. Além disso, foi

demonstrado por *Western blot* que IgY (produzidos contra forma promastigota do parasita) reagiu com proteínas da espécie *Trypanosoma evansi*, além da espécie *T. cruzi*, não podendo ser utilizado para diagnóstico específico.

#### 4.6. Dietético contra patógenos intestinais: parasitas, bactérias e vírus

Xu e colaboradores (2013) produziram e avaliaram anticorpos IgY contra o parasita *Eimeria tenella*, os quais foram obtidos através de imunização oral com cinco espécies do parasita. A titulação de IgY alcançou 1:163840, com média de 9,2mg/mL de gema e isolamento com 98% de pureza. O anticorpo liofilizado foi administrado por via oral em aves neonatais desde o primeiro dia de vida, como suplemento alimentar em várias dosagens (0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,10%, 0,5% e 1,0%) por um período de 18 dias. As aves foram desafiadas oralmente com oocistos esporulados do parasita e sofreram eutanásia oito dias após o desafio, para avaliação do efeito profilático. Todas as dosagens de IgY promoveram a redução da mortalidade das aves, ganho de peso corporal e redução da lesão tecidual cecal, quando comparadas ao controle. Porém, a concentração de 0,05% de IgY foi a que reduziu significativamente a lesão tecidual nas aves, não tendo diferença significativa entre dosagens 0,5% e 1,0%. Esses dados evidenciam que a suplementação alimentar com IgY específico representa uma estratégia promissora na prevenção contra coccidiose aviária.

Em um estudo semelhante, Kumaran e colaboradores (2018) produziram IgY contra uma cepa virulenta de *Vibrio harvey*, uma bactéria oportunista comum em crustáceos que são cultivados para comércio. Para verificar a capacidade de resistência ao trato gastrointestinal do crustáceo, a IgY anti-vibrio foi testada por ELISA após exposição à ação de diferentes enzimas digestivas como pepsina e quimiotripsina, e posteriormente, a IgY aviária foi incorporada à dieta de *Fenneropenaeus indicus*. Isto impulsionou o sistema imunológico dos crustáceos desafiados, que em decorrência da aglutinação da bactéria promoveu a redução da proliferação celular do patógeno no intestino; o que foi confirmado por meio da análise de alterações hematológicas e imunológicas do crustáceo. Esses dados demonstram a potencial aplicação da IgY aviária como método profilático contra bactérias que colonizam o intestino e, sugerem um conceito de





anticorpos comestível em alternativa aos antibióticos convencionais.

Estudos recentes de Vegas e colaboradores (2015) produziram IgY específico contra rotavírus do grupo A (RVA), a principal causa de gastroenterite em neonatos animal e humano. Bovídeos neonatos com 36 horas de vida foram separados para sete dias de tratamento em três grupos: com IgY específico (G1), sem IgY (G2) e outro privado de colostro e IgY (G3). Todos os animais foram inoculados por via oral com uma linhagem indiana de rotavírus bovino, desenvolvendo gastroenterite dentro de duas horas, consequentemente. Em comparação com grupos controles, o grupo de bovinos submetidos ao tratamento com IgY específico por via oral, duas vezes ao dia, durante uma semana teve a severidade da doença reduzida. Verificaram que o grupo tratado com IgY, teve redução da diarreia e eliminação da infecção viral antes do grupo controle; redução da liberação de vírus nas fezes e de alguns sintomas como hipertermia, anorexia e desidratação, presente nos grupos G2 e principalmente no grupo G3.

Provavelmente, houve a modulação positiva da resposta imune humoral local promovida pela IgY aviária, observada ao final do experimento em todos os animais ao se constatar por ELISA a presença de IgG1 e IgA nas fezes dos animais. Vegas e colaboradores (2015) relacionaram a imunoterapia passiva oral a respostas GALT, e verificaram que no grupo G1 tais respostas foram significativamente superiores às respostas dos grupos controle G2 e G3. E baseado nestes achados seria fundamental desenvolver uma gema pulverizada polivalente dirigido a vários patógenos relacionados com a diarreia neonatal de bovinos, como estratégia preventiva e terapêutica, o que pode ajudar a superar o problema com a resistência microbiana aos antibióticos. Posteriormente, Vegas e colaboradores (2015) por meio de ELISA, verificaram a estabilidade da IgY de gema de ovo pulverizada produzidas contra a estirpe de rotavírus mantidas em diferentes condições de armazenagem por dois anos, em embalagens de alumínio trilaminar. Os anticorpos anti-rotavírus mantidos a temperatura ambiente e a 4°C reagiram com a estirpe indiana, enquanto os mantidos a 30°C, 40°C e 70°C perderam atividade ao longo do tempo, tendo estado microbiológico aceitável até 360 dias se mantidas a temperatura ambiente e 720 dias a 4°C, e por isso é recomendável mais estudos

para determinar a segurança e viabilidade comercial de produtos baseados em anticorpos IgY.

Xu e colaboradores (2019) também investigaram o efeito profilático de IgY contra *Shewanella marisflavi AP629*, o agente causador da síndrome da úlcera cutânea em pepinos-do-mar. A IgY específica produzida inibiu significativamente o crescimento do patógeno em meio líquido de maneira dose-dependente, reduzindo a viabilidade celular bacteriana através da aglutinação na superfície da membrana celular, observados através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de varredura a laser confocal. Os pepinos-do-mar foram distribuídos em diferentes grupos, correspondentes a dieta com adição de 10%, 5% e 1% de gema pulverizada, promovendo uma taxa de sobrevivência ao desafio de 57%, 52% e 30%, respectivamente. O estudo demonstrou que a atividade fagocítica foram estimuladas após o tratamento com IgY, funcionando como um imunomodulador positivo.

#### 4.7 Desafios atuais

Em alguns estudos, os efeitos benéficos da utilização de IgY por via oral para o controle de crescimento microbiano nem sempre foram consistentes e isto se deve a degradação que sofre durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Já há trabalhos relatando que IgY é bastante resistente a ação de proteases intestinais, apesar da atividade diminuir em condições de pH de 3,5 e perder atividade em condições de pH 3 pela presença de pepsina no intestino animal (Li et al. 2015). E sendo o intestino delgado o principal alvo para entrega de IgY, este precisa ser resistente a passagem gástrica. Em contraste com essa possibilidade, técnicas de microencapsulação tem sido desenvolvida no intuito de proteger o anticorpo da inativação gástrica.

Nos estudos de Bellingeri e colaboradores (2015) verificou-se que partículas de hidrogel de acrilamida podem eficientemente incorporar e proteger a IgY de condições gástricas simuladas. No entanto, não conseguiram mostrar a liberação completa de IgY, provavelmente devido a interações hidrofóbicas com a rede polimérica do hidrogel; precisando ser mais estudados para aplicação comercial. Em estudos semelhantes, Ghaffarian e colaboradores (2016) investigaram anticorpos revestidos em nanopartículas para proteção das condições gástricas e tratamento de



patologias gastrointestinais. Foi constatado que devido a proteção fornecida pelas cápsulas de alginato-quitosana houve pouca liberação de IgY (10%) em pH gástrico, tendo liberação de 75-85% em pH intestinal, fornecendo 38-65% anticorpos no trato gastrointestinal e proteção três a quatro vezes maior comparadas aos anticorpos não encapsulados. Logo, a microencapsulação de anticorpos específicos pode possibilitar um direcionamento efetivo no contexto de administração oral de anticorpos.

Em contexto semelhante, Ehsani e colaboradores (2018) avaliaram o efeito das propriedades antimicrobianas de IgY revestidas com quitosana em filé de Truta Arco-íris durante o resfriamento. Nesse estudo, filés de peixe fresco foram recobertos com solução de quitosana contendo anticorpos IgY com diferentes especificidades a 60mg/mL, que foram refrigerados por 16 dias e analisados quanto à qualidade sanitária. Houve crescimento microbiano em todas as amostras durante o período de armazenamento, porém as amostras revestidas com quitosana contendo IgY tiveram retardo significativo de crescimento bacteriano tendo qualidade sanitária prolongada por cerca de quatro dias, comparado as amostras revestidas somente com quitosana. Logo, o revestimento de quitosana contendo IgY prolonga a qualidade de polpa de peixe armazenadas a 4°C e pode ser um candidato promissor a aditivos naturais.

## 5. Considerações Finais

A tecnologia IgY não necessita de amostragem de sangue do animal para produção de anticorpos, somente os ovos são necessários para a obtenção destes após a imunização, além disso são necessárias baixas quantidades de antígenos para obter alto título de anticorpos e de longa duração, o que consolida a tecnologia como alternativa altamente eficiente para produção de anticorpos policlonais.

O surgimento de bactérias resistentes a antibióticos e a relação entre o alto custo produtivo dos anticorpos monoclonais, colaboraram para o reconhecimento da tecnologia IgY como uma promissora alternativa produtiva econômica em relação aos anticorpos de mamíferos; não só para utilização em imunodiagnóstico como também para uso em imunoprofilaxia e imunoterapia. Apesar disso, ainda são necessárias pesquisas contínuas para o desenvolvimento de melhorias

nos aspectos de produção como, protocolos de imunização e adjuvantes recomendados, técnicas de extração e eficientes métodos de purificação; pois permanecem bem menos caracterizados em relação aos seus equivalentes mamíferos. Os possíveis efeitos específicos da aplicação em saúde animal e humana, a curto e longo prazo também devem ser explorados e mais elucidados através de estudos clínicos exaustivos, apesar da tecnologia IgY já estar presente em alguns alimentos funcionais disponíveis no mercado. Outros campos de pesquisa têm sido abertos como a combinação das vantagens dos anticorpos monoclonais e anticorpos aviários, bem como produção de alimentos saudáveis modernos através do designer de ovos hiperimune e por isso espera-se que os benefícios da tecnologia IgY se expandam e desempenhe efetivo papel em pesquisa, diagnóstico e terapia futuramente.

## Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

## Referências

- ABBAS A.T. et al. IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
- AMRO et al. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2018, v. 16, p. 99-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>
- AKITA, EM; NAKAI, S. Produção e purificação de fragmentos Fab 'de imunoglobulina de gema de ovo de galinha Y (IgY). **Journal of Immunological Methods**, 1993, v.162, n.2, p.155-164.
- ALVAREZ, A. et al. IgY antibodies against Tityus caripitensis venom: Purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, 2013, v. 74, p. 208-214.



- ARAÚJO, A. S. et al. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon**, 2010, v. 55, n. 4, p. 739–744.
- BACHTIAR, E. W. et al. Biological and Immunogenicity Property of IgY Anti ComD. **The Open Dentistry Journal**, 2016, v. 10, n. 1, p. 308–314.
- BARATI, B. et al. Production of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Against Recombinant Cholera Toxin B Subunit and Evaluation of Its Prophylaxis Potency in Mice. **Iran. J. Immunol.** 2018, v.15, n.
- BELLINGERI, R. V. et al. pH-responsive hydrogels to protect IgY from gastric conditions: in vitro evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, 2015, v. 52, n. 5, p. 3117–3122.
- CONROY, P. J. et al. Antibodies: From novel repertoires to defining and refining the structure of biologically important targets. **Methods**, 2017, v. 116, p. 12–22.
- ANDRADE, F. G. et al. The production and characterization of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. **Toxicon**, 2013, v. 66, p. 18–24.
- DEAL, C. E. et al. Engineering humoral immunity as prophylaxis or therapy. **Current opinion in immunology**, 2015, v. 35, p. 113–22. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.014>
- DIRAVIYAM, T. et al. Effect of Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) against Diarrhea in Domesticated Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, 2014, v. 9, n. 5, p. e97716.
- EHSANI A. et al. Extraction of Specific Egg Yolk Antibodies and Application in Chitosan Coating: Effect on Microbial and Sensory Properties of Rainbow Trout Fillet During Chilled Storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9442>
- FIGUEIREDO, A. et al. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. **Scientific Reports**, 2015.
- FINK, A. L. et al. Dengue virus specific IgY provides protection following lethal dengue virus challenge and is neutralizing in the absence of inducing antibody dependent enhancement. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017.
- GHAFFARIAN R. et al. Chitosan–Alginate Microcapsules Provide Gastric Protection and Intestinal Release of ICAM-1-Targeting Nanocarriers, Enabling GI Targeting In Vivo. **Advanced Functional Materials**, 2016, v.26, n. 20, p. 3382-3393. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201600084>
- GUIMARAES, M. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas Online**, 2008, v. 2, n. 7, p. 122–129.
- GRANDO, T.H. et al. Avian antibodies (IgY) against Trypanosoma cruzi: Purification and characterization studies. **Journal of Immunological Methods**, 2017, v. 449, p. 56–61. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.002>
- HORIE, K. et al. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on Helicobacter pylori in humans. **Journal of dairy science**, 2004, v. 87, n. 12, p. 4073–9.
- HONG K.S. ET AL. Preventive effect of anti-VacA egg yolk immunoglobulin (IgY) on elicobacter pylori-infected mice. **Vaccine**, 2018, v. 36, n. 3, p. 371-380. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.082>
- KHAN K.H. et al. IgY-binding peptide screened from a random peptide library as a ligand for IgY purification. **Jounal of Peptide Science**, 2017, v. 23, p. 790-797. Doi <http://dx.doi.org/10.1002/psc.3027>
- KLEMPERER, F. Ueber natürliche immunität und ihre verwerthung für die immunisirungstherapie. **Archiv fur die Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, 1893, v.31, p.356-382.
- KOUSTED, T. M. et al. Exploring the antigenic response to multiplexed immunizations in a chicken model of antibody production. **Heliyon**, 2017, v. 3, n. 3, p. e00267.
- KUMARAN, T. et al. Physicochemical properties of anti Vibrio harveyi egg yolk antibody (IgY) and its immunological influence in Indian white shrimp Fenneropenaeus indicus. **Fish and Shellfish Immunology**. 2018.
- LEE, W. et al. Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, 2017, v. 447, p. 71–85.
- LI, X. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in



swine production: A review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 2015, v. 6, n. 1, p. 1–10.

MEJIAS, A. et al. Development and clinical applications of novel antibodies for prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. **Vaccine**, 2016, v. 35, p. 3. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.026>

MIAN, I. et al. Function and properties of antibody binding sites. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; v. 217, n. 1, p. 133-51.

MÜLLER, S. et al. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutrition Journal**, 2015, v. 14, n. 1, p. 1–7.

MUNHOZ, L. S. et al. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, 2014, v. 44, n. 1, p. 153–160.

PAULY, D. et al. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, 2011, v. i, n. 51, p. 2–7.

REVATHY, J. et al. In vitro evaluation of the efficacy of chicken egg yolk antibodies (IgY) generated against *Propionibacterium acnes*. **International Journal of Cosmetic Science**, 2014, v. 36, n. 1, p. 68–73.

SHENG, Y. et al. Production of chicken yolk IgY to sulfamethazine: comparison with rabbit antiserum IgG. **Food and Agricultural Immunology**, 2015 v. 26, n. 3, p. 305–316, <http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2014.914468>

SHI, H. et al. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017, v. 95, p. 1734–1742.

SUDJARWO, S.A. ET AL. Potencial da imunoglobulina de gema de ovo de galinha (IgY) específica como imunoterapia à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. **J Adv Pharm Technol Res**. 2017, v.8, p. 91-96. Doi: [http://dx.doi.org/10.4103/japtr.JAPTR\\_167\\_16](http://dx.doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_167_16)

TAN, S. H. et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **Journal of Immunological Methods**, 2012, v. 380, n. 1–2, p. 73–76.

YAMAZAKI, T. et al. Neutralizing Antibodies Induced by Gene-Based Hydrodynamic Injection Have a Therapeutic Effect in Lethal Influenza Infection. **Frontiers in Immunology**. 2018, v. 9. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/Fimmu.2018.00047>

VEGA, C. et al. Egg Yolk IgY Antibodies: a Therapeutic Intervention Against Group A Rotavirus in Calves. **HHS Public Access Author manuscript**, 2015, v. 344, n. 6188, p. 1173–1178.

THOMSEN, K. et al. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, 2016, v. 12, n. 7, p. 1690–1699.

WILLER, E. DA M.; LIMA, R. DE L.; GIUGLIANO, L. G. In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. **BMC microbiology**, 2004, v. 4, p. 18-28.

XU, J. J. et al. Protection efficacy of multivalent egg yolk immunoglobulin against *Eimeria tenella* infection in Chickens. **Iranian Journal of Parasitology**, 2013, v. 8, n. 3, p. 449–458.

XU Y, Selerio-Poely T, Ye X. Efeitos clínicos e microbiológicos do anticorpo da gema de ovo contra *Porphyromonas gingivalis* como adjuvante no tratamento da periodontite crônica moderada a grave: um ensaio clínico randomizado controlado por placebo. **J Periodontal Implant Sci**. 2018. <https://doi.org/10.5051/jpis.2018.48.1.47>

XU, L. et al. Immunomodulatory effects of chicken egg yolk antibodies (IgY) against experimental *Shewanella marisflavi* AP629 infections in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). **Fish and Shellfish Immunology**, 2019, v. 84, p. 108-119. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.073>

XUEMEI, J. et al. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) using a human mycoplasma protein, **Journal of Chromatography B**, 2016, v. 1012–1013, p. 37-41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.012> .

ZHANG, X. et al. IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biological Reviews*. 2019, v. 92, n. 4, p. 2144-2156. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12325>