

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Expressão transitória da glicoproteína S1
recombinante do vírus da bronquite infecciosa
em células de mamíferos**

Lívia Silveira Munhoz

Pelotas, 2014

LÍVIA SILVEIRA MUNHOZ

**Expressão transitória da glicoproteína S1 recombinante do vírus da
bronquite infecciosa em células de mamíferos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Veterinária da Universidade Federal
de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Ciências (área de conhecimento:
Veterinária Preventiva).

Orientadora: Silvia de Oliveira Hübner

Co-orientador: Paulo Augusto Esteves

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M966e

Munhoz, Livia Silveira

Expressão transitória da glicoproteína S1 recombinante do vírus da bronquite infecciosa em células de mamíferos / Livia Silveira Munhoz. – 40f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Capão do Leão, 2014. – Orientador Silvia de Oliveira Hübner ; co-orientador Paulo Augusto Esteves.

1.Expressão transitória. 2.Glicoproteína S1. 3.HEK. 4.HeLa. 5.Bronquite infecciosa. I.Hübner, Silvia de Oliveira. II.Esteves, Paulo Augusto. III.Título.

CDD: 636.08962

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Marcelo de Lima (Universidade Federal de Pelotas)

Prof^a. Dra. Silvia de Oliveira Hübner (Universidade Federal de Pelotas)

Agradecimentos

Agradeço à família pelo apoio e estímulo incondicional.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Virologia e da Universidade Federal de Pelotas que ajudaram direta ou indiretamente para a concretização desta etapa.

À equipe de Virologia de Aves da Embrapa Suínos e Aves pelo tempo dedicado a me ajudar, pelas palavras de estímulo, aprendizados e conforto.

Ao convênio Capes/Embrapa pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho.

Resumo

MUNHOZ, Livia Silveira. **Expressão transitória da glicoproteína S1 recombinante do vírus da bronquite infecciosa em células de mamíferos.** 2014. 40f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A infecção pelo vírus da bronquite infecciosa (IBV) tem sido causa de importantes perdas econômicas na avicultura mundial. O IBV possui diversos genótipos e sorotipos que diferem amplamente em sua patogenicidade, e destes, algumas cepas possuem distribuição mundial. Dentre as proteínas que compõem o IBV a glicoproteína S (subdividida em S1 e S2) destaca-se por ser altamente glicosilada. A subunidade S1 é a principal indutora de anticorpos neutralizantes e resposta imune protetora, além de ser responsável pela adsorção do vírus aos receptores das células hospedeiras, por determinar o sorotipo de IBV, e por ser um dos principais determinantes do tropismo celular. Devido à complexidade dos processos que ocorrem durante a síntese da glicoproteína S1, o sistema de expressão em células de mamíferos é o que detém características, como as modificações pós-traducionais incluindo glicosilação, que o torna indicado para a síntese desta proteína. O presente estudo teve como objetivo clonar e expressar de forma transitória o gene sintético da glicoproteína do S1 do IBV elaborado a partir do consenso das sequências de amostras de campo brasileiras e internacionais, em células HEK 293 (Human embryonic kidney) e HeLa (Human cervical cancer). O gene foi clonado no vetor de expressão em células de mamíferos e transfectado nos cultivos celulares. Após 96 horas foi coletado o sobrenadante das células e o lisado celular. A expressão e purificação da glicoproteína S1 recombinante (rS1-IBV) foram verificadas a partir da técnica de SDS-PAGE e posteriormente caracterizada através do *Western blotting* utilizando soro hiperimune anti-IBV. Houve a detecção da rS1-IBV a partir do sobrenadante das células. Não houve detecção da proteína recombinante a partir do lisado celular de ambas as células. O estudo demonstrou que é possível expressar a glicoproteína S1 recombinante em células de mamíferos.

Palavras-chave: Expressão transitória. Glicoproteína S1. HEK. HeLa.

Abstract

MUNHOZ, Livia Silveira. **Expressão transitória da glicoproteína S1 recombinante do vírus da bronquite infecciosa em células de mamíferos.** 2014. 40f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The infection with infectious bronchitis virus (IBV) has been the cause of significant economic losses in the poultry world. The IBV has several genotypes and serotypes that differ widely in their pathogenicity. Some strains have a worldwide distribution. Among the proteins that make up the IBV, the S glycoprotein (subdivided into S1 and S2) stands out for being highly glycosylated. The S1 subunit is the major inducer of neutralizing antibodies and protective immune response. It's responsible for adsorption of the virus to receptors on host cells, to determine the serotype of IBV, and for being a major determinant of cell tropism. Due to the complexity of the processes that occurs during the synthesis of the glycoprotein S1, the expression system in mammalian cell has characteristics such as post-translational modifications, like glycosylation, which makes it more attractive for the synthesis of this protein. The present study aimed to clone and express transiently the synthetic gene S1 glycoprotein of IBV produced from consensus sequences of brazilian and international samples. It had been used HEK 293 (Human embrionary kidney) and HeLa (Human cervical cancer). The gene was cloned into mammalian expression vector and transfected in cell culture. After 96 hours the supernatant cell and the lysed cell were collected. Expression and purification of recombinant S1 glycoprotein (rS1-IBV) were verified using the technique of SDS-PAGE and subsequently characterized by Western blotting using hyperimmune serum anti-IBV. It had been detected rS1-IBV from the cell supernatant. There was no detection of the recombinant protein from cell lysed of both cell. The study proved that it is possible to express recombinant S1 glycoprotein in mammalian cells.

Keywords: Transient expression. S1 glycoprotein. HEK. HeLa.

Lista de Figuras

Figura 1. SDS-PAGE do sobrenadante das células HEK 293 e HeLa.....	20
Figura 2. <i>Western blotting</i> do sobrenadante das células HEK 293 e HeLa. ...	21

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC – American Type Culture Collection

BIG – Bronquite infecciosa das galinhas

CHO – Chinese Hamster Ovary

E. coli – *Escherichia coli*

EGT – Expressão gênica transitória

EGE – Expressão gênica estável

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

HEK – Human embryonic kidney

HeLa – Human cervical cancer

IBV – Vírus da Bronquite Infecciosa

kDa – Kilodaltons

µg - micrograma

µm - micrometro

M – molar

mA – miliamperes

mL – mililitro

mM – milimolar

NP-40 – Nonidet P-40

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial de Saúde

rS1 – glicoproteína S1 recombinante

SFB – Soro fetal bovino

V - Volts

Sumário

1 Introdução.....	9
2 Objetivos	13
3 Artigo	14
4 Conclusões.....	28
5 Referências	29
ANEXO	32

1 INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (IBV) é o agente etiológico da Bronquite infecciosa das galinhas (BIG), enfermidade aguda, altamente contagiosa, que acomete aves, predominantemente da espécie *Gallus gallus*, e de grande relevância na avicultura mundial (JACKWOOD, 2012). O IBV possui diversos genótipos e sorotipos que diferem amplamente em sua patogenicidade, sendo que algumas estirpes possuem distribuição mundial enquanto outras permanecem restritas a uma determinada região (COOK, 2012). No Brasil, a BIG está amplamente disseminada entre as criações avícolas comerciais e é uma das enfermidades virais que mais têm causado perdas econômicas.

O vírus replica primeiramente nas células epiteliais do trato respiratório, podendo acometer também o trato reprodutivo. Algumas cepas têm ainda predileção por rins de frangos jovens. A BIG destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários para o plantel avícola, estando diretamente relacionado às perdas decorrentes de doença respiratória e/ou renal grave, mortalidade, infecções secundárias, queda severa na produção de ovos, deterioração da casca e ovos com baixa qualidade (CAVANAGH & NAQI, 2003; BRITTON & CAVANAGH, 2007; COOK, 2012). A enfermidade está incluída nas listas da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), FAO (Organização para a Agricultura e Alimentação) e OMS (Organização Mundial de Saúde), como doença transmissível de notificação anual, possuindo, portanto, importância socioeconômica e implicações sanitárias (CAVANAGH, 2007).

As lesões respiratórias se manifestam clinicamente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares. Na dependência da estirpe viral, podem ser induzidas conjuntivite, sinusite, nefrite, nefrose, e inflamação do trato reprodutivo de fêmeas, com sinais clínicos, associados a “cabeça inchada”, uremia e redução da fertilidade e da produção de ovos (CAVANAGH, 2007).

O IBV pertence ao gênero *Gammacoronavirus*, subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae*, e ordem *Nidovirales* (ADAMS & CARSTENS, 2012), possui envelope e uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com 27,6 Kilobases, que codifica

quatro proteínas estruturais, identificadas como a glicoproteína de superfície (S), a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de membrana (E) e a proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 2007).

A glicoproteína S destaca-se por ser altamente glicosilada e durante a sua síntese, no hospedeiro, é clivada em duas proteínas de subunidade, a S1 e S2 (CAVANAGH, 1983; IGNJATOVIC & GALLI, 1994). Os principais determinantes antigênicos do IBV encontram-se nas regiões das glicoproteínas S1 e S2, sendo por isso, a glicoproteína S um alvo antigênico importante para a indução de imunidade e como antígeno a ser utilizado no imunodiagnóstico (COOK, 2012).

A subunidade S1 é responsável pela adsorção do vírus com os receptores das células hospedeiras, por determinar o sorotipo de IBV, e por ser um dos principais determinantes do tropismo celular em cultivos (CAVANAGH et al., 1986; MOORE et al., 1997; CASAIS et al., 2003). Além disso, o domínio S1 é o principal indutor de anticorpos neutralizantes e resposta imune protetora, embora exibindo um alto nível de variação (5 a 50%) entre as estirpes de IBV (CAVANAGH et al., 1986; KOCH et al. 1990; IGNJATOVIC & GALLI, 1994; SONG et al. 1998; JOHNSON et al. 2003; CAVANAGH, 2007). A subunidade S2 é responsável pela fusão vírus-célula (CAVANAGH, 2007).

Acúmulo de mutações pontuais, deleções, inserções e eventos de recombinação decorrentes de infecções naturais, têm sido observados em diversos genes estruturais de estirpes de IBV, especialmente no S1 o que têm contribuído para a evolução viral, diversidade genética, e consequentemente, para a existência de diversos sorotipos (CAVANAGH, 2007).

O controle da BIG está principalmente alicerçado no uso de vacinas formuladas com estirpes "vivas" e atenuadas do IBV, ou ainda com estirpes inativadas associadas a adjuvantes oleosos (CAVANAGH & NAQI, 1997). No Brasil, bem como outras partes do mundo, as únicas vacinas vivas atenuadas licenciadas são do sorotipo Massachussets (DE WIT et al., 2011). O uso de vacinas vivas está diretamente relacionado ao aparecimento de novos sorotipos ou variantes do IBV, as quais são genética e antigenicamente distintas das estirpes selvagens e vacinais. Em decorrência disso, é crescente a identificação de variantes genéticas e antigênicas do IBV, o que torna difícil o controle da infecção e consequentemente da enfermidade por esse vírus (MENDONÇA et al., 2009; DE WIT et al., 2011). Existe a necessidade do desenvolvimento de testes sensíveis, específicos, rápidos e de

baixo custo, que possam contribuir no imunodiagnóstico precoce e imunoprofilaxia da BIG na avicultura brasileira, bem como determinar o status imunitário das aves para o ideal controle do IBV (COOK, 2012; LIN et al. 2012). A glicoproteína S1 do IBV, reúne um número significativo de atributos para ser o antígeno de eleição no desenvolvimento de ensaios sorológicos a serem empregados na detecção/mensuração de anticorpos anti-IBV.

Técnicas moleculares de clonagem e expressão de proteínas heterólogas em sistemas de procariotos e eucariotos são alternativas para a produção de antígenos isolados e ainda podem contribuir na diminuição dos custos de produção dos imunoenaios (NDIFUNA et al., 1998, LOA et al., 2004). Cerca de 60 a 70% de biofármacos e proteínas com interesse comercial são produzidos em células de mamífero (WURM, 2004; ZHU, 2012). Isso porque as células de mamífero têm características fisiológicas similares às de humanos e outros vertebrados em comparação com células de leveduras ou de *Escherichia coli*. Desse modo, a existência de processos como glicosilação de proteínas, fosforilação, formação de pontes de dissulfeto e outras modificações pós-traducionais tornam a produção de proteínas recombinantes mais viável em células de mamífero do que em outros tipos celulares (WURM, 2004).

Abordagens rápidas para a produção de proteínas recombinantes são indicadas quando há a necessidade de avaliar rapidamente muitas proteínas ou quando diversas variantes de uma única proteína precisam ser estudadas para determinar seu potencial biológico. A expressão gênica transitória (EGT) é adequada para preencher essa necessidade. Em contraste com a expressão gênica estável (EGE), que consome tempo considerável e recursos significativos, a EGT envolve a produção de proteínas recombinantes em um curto prazo de tempo, normalmente até 10 dias pós-transfecção e sem necessidade de seleção gênica do DNA plasmidial (BALDI et al., 2006; PHAM et al., 2006). Além disso, serve para aprimorar estratégias na expressão em termos de design e construção de proteínas recombinantes antes de dar início a EGE (ZHANG et al., 2009). Um dos principais obstáculos para a EGT é a baixa produção da proteína recombinante comparando-se com outros sistemas de expressão, como leveduras, *E.coli* e até mesmo EGE (MORROW, 2008). Porém, para isso, vem se estudando métodos para melhorar os níveis de produção de biofármacos. Alguns métodos já descritos são: avanços no controle do processo como temperatura de cultivo das células, pH e osmolaridade

(SHI et al, 2005; GAGNON et al., 2011), otimização do meio de cultura e aditivos (ZHU, 2012) e a engenharia de vetores de expressão (SETH et al., 2006).

Cada linhagem de célula de mamífero dispõe de um conjunto característico de requisitos para uma ótima introdução de DNA plasmidial (AUSUBEL et al., 2003). Várias linhagens celulares podem ser utilizadas para a expressão transitória de proteínas recombinantes, porém, apenas algumas delas possuem vantagens como alta transfectabilidade com métodos comuns, fácil adaptação dos cultivos em condições isentas de soro, escalabilidade e custo-benefício. As linhagens celulares HEK 293 e CHO têm sido as mais utilizadas para transfecções transitórias em larga escala (CACHIANES et al., 1993; PHAM et al., 2006; SUN et al., 2008; GEISSE & FUX, 2009).

Devido os avanços tecnológicos crescentes constatados no campo da EGT (AGRAWAL & BAL, 2012; ZHU, 2012) e com base em trabalhos de expressão gênica com a glicoproteína S1 (WANG et al., 2002, GONÇALVES et al., 2010; WICKRAMASINGHE et al., 2011), o presente estudo teve como objetivo expressar de forma transitória, em células de mamíferos, o gene sintético da glicoproteína do S1 elaborado a partir do consenso das sequências de amostras de campo nacionais e internacionais do IBV e caracterizar através de soro hiperimune anti-IBV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Expressar e caracterizar em células HEK 293 (Human embryonic kidney 293) e HeLa (Human cervical cancer), a glicoproteína recombinante S1 do vírus da bronquite infecciosa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um gene consenso a partir de sequências de amostras de campo nacionais e internacionais;
- Clonar o gene sintético da glicoproteína S1 no vetor de expressão em células de mamíferos;
- Expressar, caracterizar e purificar a glicoproteína S1 recombinante em células de mamíferos HEK 293 e HeLa;

3 ARTIGO

Expressão transitória da glicoproteína S1 recombinante do vírus da bronquite infecciosa em células HEK e HeLa

L.S. Munhoz; P.F. Finger; G.A. Ritterbusch; M. de Lima; G. Fischer; G.D. Vargas; P.A. Esteves; F.R.
Conceição; S. O. Hübner

Artigo científico a ser submetido para o periódico: Arquivo Brasileiro de
Medicina Veterinária e Zootecnia

Expressão transitória da glicoproteína S1 recombinante do vírus da bronquite infecciosa em células HEK e HeLa

[Transient expression of recombinant S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in HEK and HeLa cells]

L.S. Munhoz¹; P.F. Finger¹; G.A. Ritterbusch¹; M. de Lima¹; G. Fischer¹; G.D. Vargas¹; P.A. Esteves²; F.R. Conceição³; S. O. Hübner¹

¹ Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Pelotas, RS

² Embrapa Suínos e Aves (CNPQA) – Concórdia, SC

³ Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia – UFPel – Pelotas, RS

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo clonar e expressar de forma transitória o gene sintético da glicoproteína do S1 do vírus da bronquite infecciosa elaborado a partir do consenso de amostras de campo brasileiras e internacionais, em células HEK 293 (Human embrionary kidney) e HeLa (Human cervical cancer). O gene foi clonado no vetor de expressão em células de mamíferos. O clone recombinante foi transfectado nos cultivos celulares e após 96 horas coletado o sobrenadante das células e o lisado celular. A expressão e caracterização da proteína S1 recombinante (rS1-IBV) foram verificadas a partir da técnica de SDS-PAGE, seguida de *Western blotting* utilizando um soro anti-IBV. Houve a detecção da rS1-IBV no sobrenadante das células, indicando expressão e excreção da proteína. O estudo demonstra que é possível expressar a glicoproteína S1 recombinante em células de mamíferos.

Palavras-chave: HEK, HeLa, Transfecção, Expressão recombinante

ABSTRACT

The present study aimed to clone and express transiently the synthetic S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis virus prepared from the consensus of brazilian and international field samples, in HEK 293 (Human embrionary kidney) and HeLa (Human cervical cancer) cells. The gene was cloned into the mammalian expression vector. The

1 recombinant clone was transfected in cell culture. After 96 hours the supernatant and
2 lysate from cells were collected. Expression and characterization of recombinant S1
3 protein (rS1-IBV) were observed using the technique of SDS-PAGE followed by
4 Western blotting with an anti-IBV serum. It had been detected rS1-IBV in the cell
5 supernatant, indicating expression and excretion of the protein. The study proved that it
6 is possible to express recombinant S1 glycoprotein in mammalian cells.

7 **Keywords:** HEK, HeLa, Transfection, Recombinant expression

9 INTRODUÇÃO

10 O vírus da bronquite infecciosa (IBV) é o agente etiológico da Bronquite
11 infecciosa das galinhas (BIG), enfermidade aguda, altamente contagiosa, e de grande
12 relevância na avicultura mundial (Jackwood, 2012). A BIG acomete aves
13 predominantemente da espécie *Gallus gallus*, de todas as idades, causando doença
14 respiratória, reprodutiva e renal (Cavanagh, 2007).

15 O IBV possui diversos genótipos e sorotipos que diferem amplamente em sua
16 patogenicidade, sendo que algumas estirpes possuem distribuição mundial enquanto
17 outras permanecem localizadas a uma determinada região (Cook, 2012). No Brasil, a
18 BIG está amplamente disseminada entre as criações avícolas comerciais e é uma das
19 enfermidades virais que mais têm causado perdas econômicas. O controle ideal do IBV
20 baseia-se em vacinação, diagnóstico precoce e determinação do status imunitário das
21 aves (Cook, 2012; Lin et al., 2012). No Brasil, é notável a necessidade de
22 desenvolvimento de testes sensíveis, específicos, rápidos e de baixo custo, que possam
23 conferir a imunidade das aves quanto a vacinação e/ou estirpes de campo, e auxiliar
24 para a manutenção de um adequado status sanitário.

25 O IBV pertence ao gênero *Gammacoronavirus* e família *Coronaviridae*,
26 (Adams e Carstens, 2012). É composto por uma fita simples de RNA de polaridade
27 positiva, que codifica quatro proteínas estruturais, identificadas como a glicoproteína de
28 superfície (S), a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de
29 membrana (E) e a proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (Cavanagh, 2007). A
30 glicoproteína S do IBV destaca-se por ser altamente glicosilada e durante a sua síntese,
31 no hospedeiro, é clivada em duas proteínas de subunidade, a S1 e S2 (Ignjatovic e Galli,
32 1994; Cavanagh, 2007). A subunidade S1 está relacionada a resposta imune protetora, é

responsável pela adsorção do vírus com os receptores das células hospedeiras, pela indução de anticorpos neutralizantes, por determinar o sorotipo, e é um dos principais determinantes do tropismo celular (Casais et al., 2003; Cavanagh et al., 1986; Moore et al., 1997; Cavanagh, 2007). Tendo em vista as características da glicoproteína S1, esta é considerada o principal antígeno para a elaboração de ensaios de imunodiagnóstico.

Devido a complexidade dos processos que ocorrem durante a síntese da glicoproteína S1, o sistema de expressão em células de mamíferos é o que detém características, como as modificações pós-traducionais, incluindo glicosilação, que o torna mais atrativo (Wurm, 2004). Este sistema de expressão pode ser utilizado para produção de proteínas a partir do processo de transfecção transitória ou expressão a partir do desenvolvimento de linhagens celulares estáveis (Nettleship, 2010).

O presente estudo teve como objetivo expressar de forma transitória o gene sintético da glicoproteína do S1 do IBV elaborado a partir do consenso de sequências de amostras de campo brasileiras e internacionais em células HEK (Human embryonic kidney) e HeLa (Human cervical cancer) e caracterizar através do soro hiperimune anti-IBV.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a expressão em células de mamíferos, foi sintetizado um gene da glicoproteína S1 do IBV baseado em sequências de amostras de campo nacionais isoladas pela Embrapa Suínos e Aves e internacionais, depositadas no GenBank. As sequências foram alinhadas no programa Vector NTI (Invitrogen®) e a partir da análise foi gerado o gene consenso dentre as amostras comparadas. Foi adicionado ao gene, sítios de restrição para a enzima EcoRI, visando a clonagem no vetor de expressão em células de mamíferos pCI-neo (Promega), com caudas de histidinas (6xHis) na região C-terminal para purificação por coluna cromatográfica e um peptídeo sinal para o envio da proteína recombinante para o sobrenadante. O gene foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs (USA).

Para o processo de clonagem o gene sintético inserido no vetor pUC18, foi previamente digerido com EcoRI (New England BioLabs® Inc.) para liberação do fragmento de interesse e purificado do gel de agarose com Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification kit (GE Healthcare). O vetor pCI-neo foi linearizado através da

enzima EcoRI a 37°C durante 1 hora, purificado e desfosforilado com a enzima Antarctic Phosphatase (New England BioLabs® Inc.) a 24°C por 1 hora. A ligação do inserto purificado no vetor de expressão pCI-neo foi realizada com a enzima T4 DNA-ligase (Invitrogen) conforme orientações do fabricante. O produto resultante da ligação foi transformado por choque térmico conforme Sambrook et al. (2001) utilizando células competentes E.coli One shot DH5α (Invitrogen). Os transformantes foram selecionados a partir de colônias resistentes a ampicilina (100µg/mL) em placas de meio Luria Bertani (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 2% Agar). A correta orientação do inserto foi confirmada a partir da clivagem com enzima de restrição KpnI (New England BioLabs® Inc.), conforme recomendações do fabricante. O clone recombinante foi expandido e seu DNA plasmidial extraído com Qiagen Plasmid Plus Midi Kits (Qiagen) conforme orientação do fabricante e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Para a expressão transitória foram utilizadas células da linhagem HEK293 (Human embryonary kidney) e HeLa (Human cervical cancer), ambas depositadas no American Type Culture Collection (ATCC) sob o número de acesso CRL-1573 e CCL-2.1, respectivamente. As células eram cultivadas com meio RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

As células foram transferidas para placas de 6 orifícios 24 horas antes da transfecção, na concentração de 4×10^5 células/orifício para a HEK e 2×10^5 células/orifício para a HeLa, estando com cerca de 60 a 80 % de confluência no momento da transfecção.

Para análise da expressão transitória, o DNA plasmidial super-enrolado foi introduzido nas células HEK 293 e HeLa, a partir do método de lipofecção, sendo que o reagente de transfecção Polyfect (Qiagen) e as concentrações de DNA foram utilizadas conforme recomendações do fabricante. O sobrenadante e as células foram coletados após 96 horas da transfecção. Para coleta do lisado de célula foi utilizado o tampão de lise celular (150 mM de NaCl, 1% de NP-40 e 100mM TE ph 7.4) conforme descrito por Hong (2010). Para a obtenção do controle negativo, células não transfectadas foram mantidas sob as mesmas condições das células transfectadas e as coletas realizadas da mesma forma.

1 A purificação por cromatografia de afinidade foi realizada com a amostra do
2 sobrenadante das células HEK 293 através da coluna Histrap FF (GE Healthcare). A
3 coluna foi carregada com 7 volumes do meio de cultivo celular coletado 96 horas após a
4 transfecção, previamente filtrado e em seguida, 15 volumes do tampão de ligação. A
5 eluição foi obtida através do gradiente linear de 0 a 500 mM de imidazol (Sigma-
6 Aldrich) no tampão de eluição. Frações de 2mL de cada eluição foram coletadas e
7 posteriormente analisadas em SDS-PAGE e *Western blotting*. As frações de eluição
8 foram armazenadas a -20°C.

9 A expressão e purificação da proteína rS1-IBV foi verificada a partir da técnica
10 de SDS-PAGE conforme descrito por Laemmli (1970). O gel foi eletrotransferido para
11 membrana de nitrocelulose 0,45µm (BioRad) utilizando Mini Protean III (BioRad) a
12 30V e 200mA por aproximadamente 2 horas. A membrana foi bloqueada com PBS-T
13 (0.02M Fosfato, 0.15M NaCl e 0.05% Tween 20) contendo 5% de leite em pó
14 desnatado por 16 horas a 4°C. Posteriormente, foi lavada 3 vezes com PBS-T e incubada
15 por uma hora a temperatura ambiente com o soro hiperimune obtido em coelho
16 imunizado com a cepa Beaudette do IBV, diluído 1:5. Em seguida o anticorpo
17 secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição 1:1000
18 foi adicionado, incubado a temperatura ambiente por 1 hora e após lavagens repetidas
19 com PBS-T a revelação foi realizada usando DAB Fast Sigma (Sigma-Aldrich). A
20 reação foi parada com a adição de água destilada.

22 RESULTADOS

23 O gene sintético foi clivado do vetor pUC18 e ligado no vetor pCI-neo com
24 êxito, obtendo-se, a partir da transformação em *E. coli* DH5α, colônias transformantes.
25 Destas, foi selecionado uma colônia recombinante mediante a verificação da presença
26 do gene de interesse e sua correta orientação no vetor e realizado a extração do DNA
27 plasmidial.

28 As células HEK e HeLa apresentando confluência em torno de 60% - 80%
29 foram transfectadas em quadruplicata com o vetor pCI-neo contendo o gene
30 recombinante (pCI-neo/rS1). De 24 a 96 horas foram acompanhados os aspectos da
31 cultura celular por visualização ao microscópio óptico. Os cultivos de HEK e HeLa
32 apresentaram, após 24 horas de transfecção, uma menor confluência comparado ao

momento da transfecção e aos controles de células não transfectadas, provavelmente devido a mortalidade celular ocasionada pela técnica. Contudo, às 96 horas pós-transfecção observou-se total confluência e viabilidade celular.

As proteínas contidas no sobrenadante das células HEK 293 e HeLa foram visualizadas em SDS-PAGE, após 96 horas da transfecção. Foi observada uma banda espessa, sugestiva de grande concentração de proteínas com aproximadamente 58 kDa, o tamanho esperado da S1 recombinante (rS1-IBV). Os controles negativos de ambas as células apresentaram bandas nesta proximidade, porém em menor concentração (Fig. 1). A partir das amostras coletadas da lise celular das células HEK e HeLa transfectadas não foram detectadas concentrações de proteínas com aproximadamente 58 kDa no SDS-PAGE.

As mesmas amostras do SDS-PAGE oriundas do sobrenadante e da lise celular foram transferidas para membranas de nitrocelulose a fim de realizar a técnica de *Western blotting*, usando o soro hiperimune anti-IBV. A partir do sobrenadante de ambas as células foi detectada reatividade frente ao anticorpo utilizado (Fig. 2), indicando que as células transfectadas expressaram a rS1-IBV. A reação foi comparada com o sobrenadante de células HEK e HeLa não transfectadas, utilizadas como controle negativo.

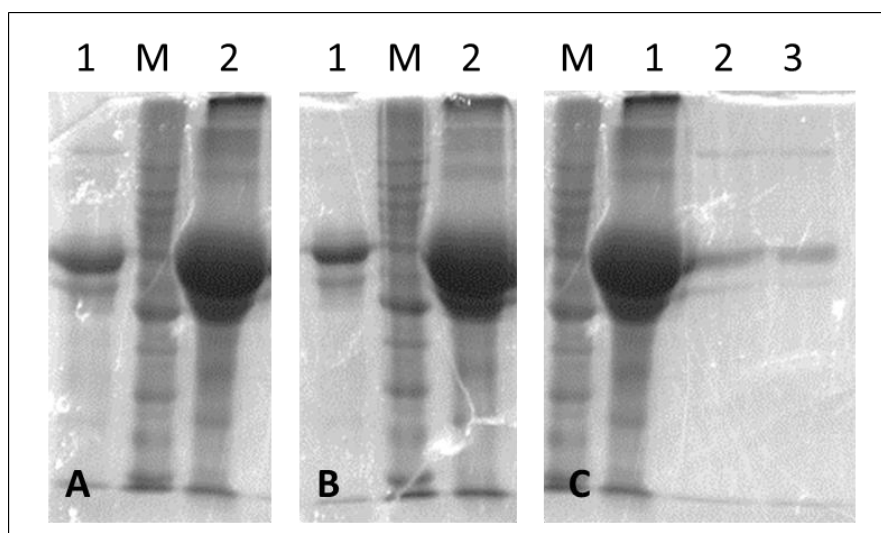


Figura 1. SDS-PAGE do sobrenadante das células HEK 293 e HeLa. A – 1. Controle Negativo HEK 293; M. Marcador Benchmark Protein ladder; 2. HEK+rS1. B – 1. Controle Negativo HeLa; M. Marcador Benchmark Protein ladder; 2. HeLa+rS1. C – M. Marcador Benchmark Protein ladder; 1. HEK+rS1 não purificado; 2. HEK+rS1 purificada 10%; 3. HEK+rS1 purificada 20%.

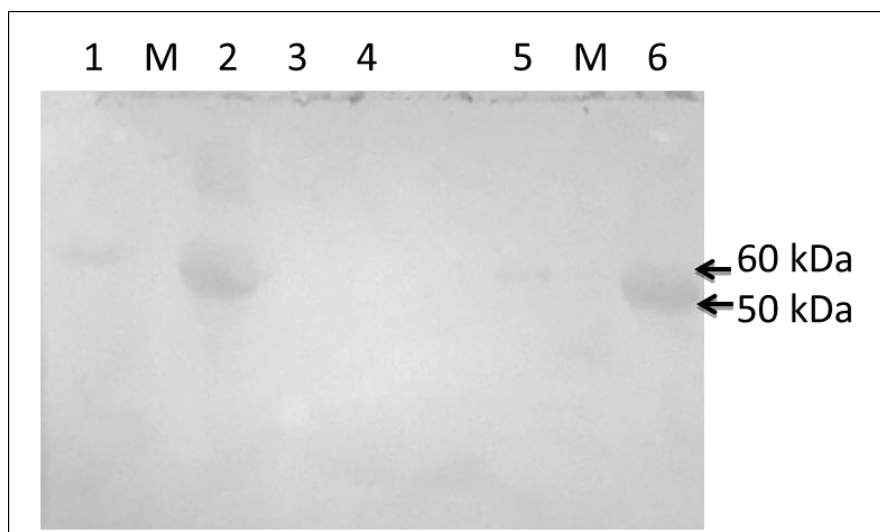


Figura 2. Western blotting do sobrenadante das células HEK 293 e HeLa. 1. Controle Negativo HEK 293; M. Marcador Benchmark Protein ladder; 2. HEK+rS1 não purificado; 3. HEK+rS1 purificada 10%; 4. HEK+rS1 purificada 20%; 5. Controle Negativo HeLa; M. Marcador Benchmark Protein ladder; 6. HeLa+rS1 não purificada.

A amostra coletada após 96 horas do sobrenadante das células HEK 293 foi purificada, sendo em seguida submetida ao SDS-PAGE, onde foi constatada uma pequena concentração de proteínas de aproximadamente 58 kDa. Contudo, quando realizado o *Western blotting* não houve visualização de sinal com o soro hiperimune anti-IBV.

DISCUSSÃO

Atualmente, os kits comerciais disponíveis para diagnóstico de IBV utilizam, na sua maioria, o vírus inteiro e a elaboração consiste de um processo complexo, trabalhoso e de alto custo (Lin et al., 2012). Proteínas virais recombinantes produzidas em sistema procarioto e eucarioto têm sido desenvolvidas como alternativa viável para a utilização como antígenos (Ito et al., 1996; Wang et al., 2002; Donofrio et al., 2006; Gonçalves et al., 2010). A proteína S1 do IBV é a principal indutora da resposta imune protetora contra a infecção e, por isso, é um dos principais antígenos alvo estudados no desenvolvimento de testes para imunodiagnóstico (Koch et al., 1990). Preparações recombinantes da proteína S1 utilizando batatas transgênicas (Zhou et al., 2003), adenovírus (Johnson et al., 2003), baculovírus (Song et al., 1998), *E.coli* (Wang et al., 2002), *Pichia pastoris* (Gonçalves et al., 2010) já foram descritas. Recentemente foi

descrita a expressão de regiões da glicoproteína S1 em células de mamíferos HEK 293T para serem utilizadas em estudos de tropismo e patogenicidade de diferentes cepas (Wickramasinghe et al., 2011).

Dentre os diversos sistemas de produção de proteínas recombinantes a expressão em células de mamíferos, de forma transitória ou estável, destaca-se pela capacidade de desempenhar modificações pós-traducionais de proteínas, especialmente a glicosilação (Walsh e Jefferis, 2006), permitindo com que as proteínas recombinantes expressas neste sistema possam manter a conformação nativa, antigenicidade e imunogenicidade (Du et al., 2009). Outros sistemas como leveduras, cultivos de células de insetos e de plantas são capazes de realizar a glicosilação em proteínas, porém esta reação difere da observada nas células de mamíferos (Walsh e Jefferis, 2006). Por isso, apesar da expressão em célula de mamífero ser considerado um processo dispendioso e mais trabalhoso, quando comparado a outros sistemas de expressão, é indicado para o desenvolvimento de diversas proteínas.

No presente trabalho, o método de expressão transitória em célula de mamífero foi escolhido para produção da glicoproteína S1 do IBV, visando, principalmente, posterior desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico. A tecnologia de expressão transitória é muitas vezes escolhida para determinar o potencial biológico de proteínas de interesse, aprimorar estratégias na expressão em termos de design e construção de proteínas recombinantes, antes de dar início a expressão estável (Zhang et al., 2009).

Com a metodologia utilizada foi possível detectar a expressão transitória da proteína S1 do IBV em células HEK e HeLa. Contudo, observou-se que as células após serem transfectadas apresentaram uma confluência bem menor do que no momento da transfecção, indicando uma alta taxa de morte celular. Isso pode ser reflexo de uma possível suscetibilidade das HEK e HeLa a um efeito citotóxico ao reagente de transfecção. Estudos apontam uma relativa toxicidade de lipídeos catiônicos (Dass, 2004; Patil et al., 2005) que varia de acordo com o tipo celular e com a quantidade de lipídeos utilizada na relação lipídeo:DNA para a formação dos complexos. Sendo que, quanto maior a quantidade de lipídeos em relação à quantidade de DNA, maior é o efeito citotóxico. A toxicidade é atribuída ao excesso de cargas positivas, uma vez que ao se utilizar de formulações contendo maiores quantidades de lipídeos com cargas

1 neutras/negativas, a toxicidade do complexo mostra-se menor (Dass, 2004; Patil et al.,
2 2005). É possível que a quantidade de reagente de transfecção ou a proporção de
3 lipídeo:DNA utilizada neste estudo com as células HEK e HeLa tenha sido tóxica.
4 Considerando esta possibilidade e, ao fato de que um dos principais obstáculos para a
5 expressão transitória é a baixa produção da proteína recombinante comparando-se com
6 outros sistemas de expressão, como leveduras, *E.coli* e até mesmo expressão estável
7 (Wurm, 2004; Butler, 2005), seria interessante avaliar quantidades menores da
8 formulação lipídica e/ou otimização das proporções utilizadas entre lipídeo e DNA.

9 As células transfectadas foram mantidas com soro fetal até o momento da
10 coleta, fator que veio a influenciar no momento da realização do SDS-PAGE, *Western*
11 *blotting* e purificação (Llames et al., 2000). Estudos (Rasmussen et al., 2005; Donofrio
12 et al., 2006) relatam a interferência das proteínas bem como possíveis contaminantes
13 contidos no SFB e sugerem a remoção do mesmo no período de expressão da proteína a
14 fim de minimizar a ação do SFB sobre as proteínas expressas. Atualmente, o SFB vem
15 sendo substituído por diversos meios enriquecidos ou aditivos no meio de cultura
16 minimizando possíveis reações inespecíficas, contaminações e interferências tanto no
17 processo de expressão quanto na purificação das proteínas (Butler, 2005).

18 A recuperação de proteína a partir de sobrenadantes de células exige um passo
19 de cromatografia altamente específico e eficiente. As proteínas secretadas para os
20 sobrenadantes de células de mamífero são normalmente encontradas em baixa
21 concentração e pureza devido às limitações do sistema de expressão ou a presença de
22 grande quantidade de proteínas contaminantes do meio celular (Ordoño et al., 2006).
23 Optou-se pela purificação por cromatografia de afinidade com histidina a fim de
24 recuperar adequadamente a proteína. A literatura (Lichty et al., 2005; Ordoño et al.,
25 2006) destaca este como sendo um dos métodos de maior rendimento e pureza porém,
26 no sistema utilizado, não houve a recuperação da proteína de interesse durante a etapa
27 de purificação. O rendimento relativamente baixo da proteína S1, no *Western blotting*,
28 nos leva a crer na necessidade de uma coluna cromatográfica específica para o sistema
29 de expressão utilizado ou adição e otimização de processos de diálise das amostras
30 como sugerido na literatura (Asaoka et al., 2012) e pelos fabricantes para as colunas,
31 que não são específicas para tal sistema.

O *Western blotting* é muito empregado para a detecção de proteínas recombinantes uma vez que é um método de alta sensibilidade (Gravel, 2002). Contudo a associação com outros métodos imunológicos tais como ELISA, imunocitoquímica e imunofluorescência poderiam auxiliar e complementar a detecção e antigenicidade. Além disso, poderia contribuir na detecção da proteína S1 a utilização de anticorpo monoclonal contra S1 e/ou anticorpo monoclonal contra cauda de histidina específico para expressão em célula eucariótica.

As células transfectadas com o vetor deste trabalho são tipicamente colhidas de 24 a 96 horas pós-transfecção para estudos destinados a expressão gênica transitória, porém o intervalo de tempo ideal varia conforme as células utilizadas, objetivos da pesquisa e características do gene a ser expresso (Promega, 2014). Sendo assim, seria interessante a coleta e análise do sobrenadante das células por um período anterior e superior às 96 horas, utilizadas no presente estudo, podendo talvez detectar com melhor exatidão o pico de expressão da rS1-IBV. Alguns estudos de expressão gênica transitória detectaram variação entre 24 a 180 horas com relação ao período de secreção das proteínas recombinantes no meio de cultivo após a transfecção (Ito et al., 1996; Donofrio et al., 2006).

CONCLUSÃO

O estudo demonstra que é possível expressar e caracterizar, através do soro hiperimune anti-IBV, a glicoproteína S1 recombinante em células HEK e HeLa.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 157, p.1411–1422, 2012.
- ASAOKA, Y. et al., Efficient expression of recombinant soluble human FcγRI in mammalian cells and its characterization. **Protein expression and purification**, v. 82, p.155-161, 2012.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals; **Applied Microbiology and Biotechnology** v.68, p. 283–291, 2005.
- CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p.281-297, 2007.

- 1 CAVANAGH, D. et al., Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolyptide S2
2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination inhibiting
3 antibody, or induce chicken tracheal protection. **Journal of General Virology**, v. 67,
4 p.435–1442, 1986.
- 5 CASAIS, R. et al., Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a
6 heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell
7 tropism. *Journal of Virology*, v.77, p. 9084–9089, 2003.
- 8 COOK, J.K.A. et al., The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian*
9 *Pathology*, v.41, n.3, p. 239-250, 2012.
- 10 DASS, C.R. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo
11 transfection. **Journal of Molecular Medicine**, v.82, p.579-591, 2004.
- 12 DONOFRIO, G. et al., Expression of bovine viral diarrhea virus glycoprotein e2 as a
13 soluble secreted form in a mammalian cell line. **Clinical and Vaccine Immunology**,
14 v.13, n.6, p. 698–701, 2006.
- 15 DU, L. et al., Antigenicity and immunogenicity of SARS-CoV S protein receptor-
16 binding domain stably expressed in CHO cells. **Biochemical and Biophysical**
17 **Research Communications**, v. 384, n.4, p. 486–490, 2009.
- 18 GONÇALVES, M.C.M. et al., Clonagem e expressão do gene da glicoproteína s1 do
19 vírus da bronquite infecciosa das galinhas em *Pichia pastoris*. **Arquivos do Instituto**
20 **Biológico**, v.77, n.4, p.609-615, 2010.
- 21 GRAVEL, P. Protein Blotting by the Semidry Method In: WALKER, J. **The protein**
22 **Handbook**, 2 ed. New Jersey: Humana Press Inc. 2002, p.321.
- 23 HONG, J. Lysis of Cultured Cells for Immunoprecipitation. **Cold Spring Harbor**
24 **Protocols**, 2010.
- 25 IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian
26 infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Archives of**
27 **Virology** , v. 139, p. 117-134, 1994.
- 28 ITO, H. et al., Expression of the major inner capsid protein, VP6, of avian rotavirus in
29 mammalian cells. **Veterinary Microbiology**, v.49, p.257-265, 1996.
- 30 JACKWOOD, M.W. Review of infectious bronchitis virus around the world. **Avian**
31 **Disease**, v. 56, p. 634–641, 2012.
- 32 JOHNSON, M. A. et al., A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of
33 infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus.
34 **Vaccine**, v.21, p. 2730– 2736, 2003.
- 35 KOCH, G. et al., Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious
36 bronchitis virus: correlation with biological functions. **Journal of General Virology**,
37 v.71, p.1929–1935, 1990.

- 1 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T4
2 bacteriophage. *Nature*, v. 227, p. 680-681, 1970.
- 3 LLAMES, L. et al., Analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
4 electrophoresis and western blot of nonspecific and specific viral proteins frequently
5 detected in different antigen preparations of bovine leukemia virus. **Journal of**
6 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p.337-344, 2000.
- 7 LICHTY, J. et al., Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein**
8 **Expression and purification**, v 41, p. 98-105, 2005.
- 9 LIN, K.H. et al., Application of purified recombinant antigenic spike fragments to the
10 diagnosis of avian infectious bronchitis virus infection. **Applied Microbiology and**
11 **Biotechnology**, v.95, n.1, p. 233, 2012.
- 12 MOORE, K. M. et al., Identification of amino acids involved in a serotype and
13 neutralization specific epitope within the S1 subunit of avian infectious bronchitis virus.
14 **Archives of Virology**, v. 142, p. 2249–2256, 1997.
- 15 NETTLESHIP, J.E. et al., Recent advances in the production of proteins in insect and
16 mammalian cells for structural biology. **Journal of Structural Biology**, v.172, p. 55-
17 65, 2010.
- 18 ORDOÑO, D. et al., Methods for preparation of low abundance glycoproteins from
19 mammalian cell supernatants. **International Journal of Biological Macromolecules**,
20 v. 39, p.151-156, 2006.
- 21 PATIL, S.D.; RHODES, D.G.; BURGESS, D.J. Biophysical characterization of anionic
22 lipoplexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1117, p. 1-11, 2005.
- 23 PROMEGA, Protocols and Applications Guide. Disponível em:
24 <[http://www.promega.com.br/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-](http://www.promega.com.br/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/)
25 [applications-guide/transfection/](http://www.promega.com.br/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/)>. Acessado em: 05 fev. 2014.
- 26 RASMUSSEN, L.K. et al., Characterization of different cell culture media for
27 expression of recombinant antibodies in mammalian cells: Presence of contaminating
28 bovine antibodies. **Protein Expression and Purification**, v.41, n.2, p. 373-377, 2005.
- 29 SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory**
30 **manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, 957 p.
- 31 SONG, C. S. et al., Induction of protective immunity in chickens vaccinated with
32 infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus.
33 **Journal of General Virology**, v.79, p.719–723, 1998.
- 34 WANG, C.H. et al., An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using
35 an S1 spike polypeptide. **Veterinary Microbiology**, v.85, p.333-342, 2002.
- 36 WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of
37 therapeutic proteins. **Nature biotechnology**, v.24, p. 1241-1252, 2006.

- 1 WICKRAMASINGHE, I.N. et al., Binding of avian coronavirus spike proteins to host
2 factors reflects virus tropism and pathogenicity. **Journal of Virology**, v.85, p. 8903–
3 8912, 2011.
- 4 WURM, F. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian
5 cells. **Nature biotechnology**, v.22, n.11, 2004.
- 6 ZHANG, J. et al., Transient expression and purification of chimeric heavy chain
7 antibodies. **Protein Expression and Purification**, n. 65, p.77-82, 2009.
- 8 ZHOU, J. et al., Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis
9 virus in transgenic potatoes. **Journal of Virology**, v.77, n.16, p. 9090-9093, 2003.

4 CONCLUSÕES

- Foi possível estabelecer o gene sintético a partir do consenso de sequências de amostras de campo nacionais e internacionais.
- O gene sintético da glicoproteína S1 recombinante foi clonado corretamente no vetor de expressão em célula de mamífero;
- A rS1-IBV foi expressa em células HEK e HeLa e caracterizada através do soro hiperimune anti-IBV.

5 REFERÊNCIAS

ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 157, p.1411–1422, 2012.

AGRAWAL, V.; BAL, M. Strategies for rapid production of therapeutic proteins in mammalian cells. **Bioprocess International**, v.10, n.4, 2012.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Introduction of DNA into mammalian cells. **Current Protocols in Molecular Biology**, Supplement 48, 2003.

BALDI, L.; HACKER, D.L.; ADAM, M.; WURM, F.M. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 677-684, 2006.

BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Avian coronavirus diseases and infectious bronchitis vaccine development. In: **Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology**. Norfolk, UK: Caister Academic Press., 2007, p. 161–181.

CACHIANES, G.; HO, C.; WEBER, R.F.; WILLIAMS S.R.; GOEDDEL, D.V.; LEUNG D.W. Epstein-Barr virus-derived vectors for transient and stable expression of recombinant proteins. **Biotechniques**, v.15, n.2, p.255–259, 1993.

CASAI, R.; DOVE, B.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *Journal of Virology*, v.77, p. 9084–9089, 2003.

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: structure characterization of the spike protein. **Journal of General Virology**, v. 64, p.2577-2583, 1983.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p.281-297, 2007.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. Infectious bronchitis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; GLISSON, J.R.; FADLY, A.M.; MCDOUGALD, L.R. **Diseases of Poultry**, 11 ed., Ameslowa: Iowa State University Press, 2003, p. 101–119.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; DARBYSHIRE J. H.; PETERS R. W. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or hamagglutination inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. **Journal of General Virology**, v. 67, p.435–1442, 1986.

COOK, J.K.A.; JACKWOOD M.; JONES R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**, v.41, n.3, p. 239-250, 2012.

DE WIT, J.J.; COOK, J.K., HAROLD, H.M.; Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian Pathology**, v. 40, n.3, p. 223–235, 2011.

GANGNON, M.; HILLER, G.; LUAN, Y-T; KITTREDGE, A.; DEFELICE, J.; DRAPEAU, D. High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation un CHO fed-batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, p. 1328-1337, 2011.

GONÇALVES, M.C.M.; GIBERTONI, A.M.; MONTASSIER, M.F.S.; FERNANDES, C.C.; MONTASSIER, H.J. Clonagem e expressão do gene da glicoproteína s1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em *Pichia pastoris*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.4, p.609-615, 2010.

GEISSE, S.; FUX, C. Recombinant protein production by transient gene transfer into mammalian cells. **Methods in Enzymology**, v.463, p. 223–238, 2009.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Archives of Virology** , v. 139, p. 117-134, 1994.

JACKWOOD, M.W. Review of infectious bronchitis virus around the world. **Avian Disease**, v. 56, p. 634–641, 2012.

JOHNSON, M. A.; POOLEY C.; IGNJATOVIC, J.; TYACK, S. G. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. **Vaccine**, v.21, p. 2730– 2736, 2003.

KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A.; VAN ROOZELAAR, D. J. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. **Journal of General Virology**, v.71, p.1929–1935, 1990.

LIN, K.H; LIN, C.F; CHIOU S.S.; HSU, A.P.; LEE, M.S.; CHANG, C.C.; CHANG, T.J; SHIEN, J.H.; HSU, W.L. Application of purified recombinant antigenic spike fragments to the diagnosis of avian infectious bronchitis virus infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, n.1, p. 233, 2012.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli* . **Journal of Virological Methods**, v. 116, n. 2, p. 161-167, 2004.

MOORE, K. M.; JACKWOOD, M. W.; HILT, D. A. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralization specific epitope within the S1 subunit of avian infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**, v. 142, p. 2249–2256, 1997.

MORROW, K.J. Optimizing transient gene expression. Applications expected to move beyond discovery and the preclinic to clinical real. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, v.28, n.5, 2008.

MENDONÇA, J.F.P.; MARTINS, N.R.S; CARVALHO, L.B.; SÁ, M.E.P.; MELO, C.B. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2559-2566, 2009.

NDIFUNA, A.; WATERS, A. K.; ZHOU M.; COLLISSE E. W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. **Journal of Virological Methods**, v. 70, n. 1, p. 37-44, 1998.

PHAM, P.L.; KAMEN, A.; DUROCHER, Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. **Molecular biotechnology** v. 34, n.2, p.225-237, 2006.

SETH, G.; HOSSLER, P.; YEE, J. C.; HU, W. S. Engineering cells for cell culture bioprocessing-physiological fundamentals. **Advances in Biochemical Engineering**, v.101, p.119-164, 2006.

SHI, C.; SHIN, Y.O.; HANSON J. Purification and characterization of a recombinant G-protein-coupled receptor, *Saccharomyces cerevisiae*_Step, transiently expressed in HEK293 EBNA1 cells. **Biochemistry**, v. 44, n.48, p.15705-15714, 2005.

SONG, C. S.; LEE, Y.J.; LEE, C.W.; SUNG, H.W.; KIM, J.H.; MO, I.P.; IZUMIYA, Y.; JANG, H.K.; MIKAMI, T. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. **Journal of General Virology**, v.79, p.719–723, 1998.

SUN, X.; HIA, H.C.; GOH, P.E.; YAO, M.G. High density transient gene expression in suspension-adapted 293 EBNA1 cells. **Biotechnology Bioengineering**, v.99, n. 1, p. 108 – 116, 2008.

WANG, C.H.; HONG, C.C; SEAK, J.C.H An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using an S1 spike polypeptide. **Veterinary Microbiology**, v.85, p.333-342, 2002.

WICKRAMASINGHE, I.N.; DE VRIES, R.P.; GRONE, A.; DE HAAN, C.A.; VERHEIJE, M.H. Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. **Journal of Virology**, v.85, p. 8903–8912, 2011.

WURM, F. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature biotechnology**, v.22, n.11, 2004.

ZHANG, J.; LIU, X.; BELL, A.; TO, R.; BARAL, T.N.; AZIZI, A.; LI, J.; CASS, B.; DUROCHER, Y. Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. **Protein Expression and Purification**, n. 65, p.77-82, 2009.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v.30, p. 1158-1170, 2012.

ANEXO

Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic

Anticorpos IgY aviário: características e aplicações em imunodiagnóstico

Lívia Silveira Munhoz^I Gilberto D'Ávila Vargas^I Geferson Fischer^I Marcelo de Lima^I
Paulo Augusto Esteves^{II} Silvia de Oliveira Hübner^{I*}

- REVIEW -

ABSTRACT

Immunoglobulin Y (IgY) is the major antibody isotype in birds, reptiles, amphibia, and lungfish, playing a similar biological role as mammal IgG. Due to its phylogenetic distance, immune diversification and presence in the egg yolk, IgY provide a number of advantages in immunodiagnostic compared to IgG from mammals. Moreover, IgY production is in agreement with international efforts to reduce, refine and if possible, to replace animals in experimentation, contributing substantially in favor of animal welfare. This article presents an overview about structural and functional features, production and applications of IgY in immunodiagnostic, as well as the advantages of chicken antibodies use.

Key words: egg yolk antibody, immunodiagnostics, immunoglobulin Y, polyclonal antibodies.

RESUMO

A imunoglobulina Y (IgY) é a classe de anticorpos de maior importância em aves, répteis, anfíbios e peixes pulmonados, desempenhando um papel semelhante a IgG de mamíferos. Devido a sua distância filogenética, mecanismos de diversificação imune e presença na gema do ovo, IgY proporciona uma série de vantagens em imunodiagnóstico, quando comparada a IgG de mamíferos. Além disso, esse método alternativo de produção de anticorpo está de acordo com os esforços internacionais para reduzir, refinar e, se possível, substituir animais em experimentação, contribuindo substancialmente a favor do bem-estar animal. Este artigo apresenta uma revisão sobre as características estruturais e funcionais da IgY, bem como os métodos de produção, vantagens e aplicações em imunodiagnóstico, além das vantagens da sua utilização.

Palavras-chave: anticorpo da gema do ovo, imunodiagnóstico, imunoglobulina Y, anticorpo policlonal.

INTRODUCTION

Immunoglobulins (glycoproteins also called antibody) are secreted by plasma cells in response to antigens exposure and consist in a major effector product of humoral immunity (TIZARD, 2002). These immunoglobulins are also widely used in the field of diagnostics and scientific research being employed either for detection or quantification of antibodies and specific antigens associated with various diseases by several techniques such as immunodiffusion, ELISA, and Western blotting. Historically, the animal species chosen for antibody production to be used for diagnostic purposes have been of mammalian origin. These antibodies are obtained from blood collected either by repeated bleeding or heart puncture which may frequently result in distress or even death of the animal. The production of IgY antibodies from immunized chicken eggs is an excellent alternative to the traditional methods. This review will describe the structural and functional characteristics of avian IgY, focusing on its potential as an important tool for immunodiagnosis.

The IgY

Immunoglobulin Y (IgY) is the major antibody in birds, reptiles, and lungfish (WARR et al., 1995). In birds, the IgY is found mainly in blood and in the fluid fraction of the egg providing protection to newly hatched chick (SCHADE et al., 2005).

^ILaboratório de Virologia e Imunologia Animal, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, 96010-900, CP 354, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: sohübner@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II}Grupo de Pesquisa em Sanidade de Aves, EMBRAPA Suínos e Aves, Vila Tamanduá, Concórdia, SC, Brasil.

The antibodies transfer from serum to eggs was first demonstrated by KLEMPERER (1893), however this discovery remained for a long period with no scientific applications. When animal welfare became more relevant in scientific studies, researchers began to seek alternatives to reduce the indiscriminate use of animals for research and diagnostic purposes. Although IgY and IgG are sometimes used as synonyms in the scientific literature, the term IgY has become universally accepted based on its unique features (LESLIE & CLEM, 1969; SCHADE et al., 1996; TIZARD, 2002).

Structural and functional features of IgY

Like IgG, IgY contains two heavy and two light polypeptide chains, shaped in the Y characteristics and presents two binding sites for the antigen. IgY and IgG are eluted from diethylaminoethyl cellulose with low ionic strength buffers (WARR et al., 1995). However there are striking differences that must be considered: there is little or no immunological cross-reactivity between IgY and mammalian IgG. IgY has a higher molecular weight (~180kDa and ~160kDa to IgG) due to an extra constant domain in its heavy chain (H), lacks a well-defined hinge region and has an unique oligosaccharide in its structure. It has been proposed that the extra domain (CH2) may be the evolutionary precursor to the mammalian IgG hinge region (WARR et al., 1995). IgY is also capable of mediate anaphylactic reactions, a function attributed to IgE in mammals (CARLANDER, 2002). In fact, other similarities between IgY and IgE, including a similar intra chain disulphide bond in their extra heavy chain domain, lead to suggest that IgY is the ancestral molecule to both IgG and IgE, and molecular genetic studies have confirmed these findings (WARR et al., 1995). Fc region of IgY mediates most biological effector functions, such as complement fixation, anaphylactic reactions and opsonization, whereas the Fab region contains the antigen binding sites (DAVISON et al., 2008). The H chain (Mw 65,105kDa) of IgY, called *upsilon* ("v" capital letter H) has one variable (V) and four constant (C) regions whereas the light chain (Mw 18,660kDa) is composed of one V and one C region. The light chain is lighter than its mammalian counterpart and has restricted mobility of the hinge region (Cu2) (CARLANDER, 2002). IgY is stable at pH 4-9 and up to 65°C in aqueous condition. However, high salt conditions or the addition of stabilizing reagents increase its resistance to heat, acid extreme pH and high pressure (SHIMIZU et al., 1992).

It has been identified in some anseriform birds and reptiles the truncated form of IgY, with

evolutionary origins still unknown (OTA et al., 2003). This truncated IgY have low molecular weight (~120kDa) and contain only two constant domains without two terminal domains of the heavy chain (TIZARD, 2002). This truncated isoform of IgY is produced as a result of alternative splicing of heavy chain messenger RNA, being called IgY (Δ Fc). However, LI et al. (2012) have demonstrated that IgY and IgY(Δ Fc) are codified in different genes in some species, like in the red-eared turtle. As the truncated isoform lacks a functional Fc region, it cannot undertake the usual immunoglobulin effector functions such as complement activation or Fc receptor binding (TIZARD, 2002). The immunoglobulin Y, full-sized and truncated, can be found in the same individual as in some ducks and geese, or only one form, like in *Gallus domesticus* where only the whole IgY is present (LIU & HIGGINS, 1990; KITAGUCHI et al., 2008).

Previous studies have shown the presence of three immunoglobulin classes in birds (IgA, IgM and IgY), but IgY is found in higher concentration (5 to 15mg/mL) than IgM (1 to 3mg/mL) and IgA (0.3 to 0.5mg/mL) in serum (ROSE et al., 1974; KOWALCZYK et al., 1985). As for mammals, the IgM is the predominant isotype produced in the avian primary humoral response while IgY is the predominant form in the secondary response (DAVISON et al., 2008).

Chicken IgY is predominantly systemic rather than a secretory antibody but can be also found in duodenal contents, tracheal washings and seminal plasma (LESLIE & CLEM, 1969), besides the egg yolk. The IgY plays a similar biological role as mammalian IgG, being considered the major immunoglobulin providing defense against infectious agents. Additionally, hatched chickens acquire an effective humoral immunity against common avian pathogens when absorb IgY from the egg yolk, until the complete maturation of the immune system (SCHADE et al., 2005).

Transport of IgY from the serum to egg yolk

There is a delay of five to six days since the appearance of IgY in serum until it is found in the yolk (DAVISON et al., 2008). The amount of IgY transferred across the follicular epithelium into the yolk is proportional to the IgY concentrations in serum (HAMAL et al., 2006). However, the concentration of IgY in egg yolk varies greatly between different bird species and even between chicken lines (CARLANDER, 2002). Yolk IgY concentrations were reported to be in the range of 7.9mg/ml to 20-25mg/

ml (ROSE et al., 1974; KOWALCZYK et al., 1985), depending on the analytical method used. About 100-200mg of total IgY can be extracted from a single egg with 2-10% being antigen specific (SCHADE et al., 1994; CARLANDER, 2002). IgM and IgA can reach concentrations of 0.15 and 0.7mg/ml into the white eggs, respectively (ROSE et al., 1974). While low amounts of the IgM and IgA isotypes can be detected in the yolk, higher concentrations can be detected in the albumen (CARLANDER, 2002).

Studies performed in chickens have demonstrated that ovarian IgY incorporation happens through a specific receptor-mediated endocytosis and require the Fc region of the intact immunoglobulin for its binding and transport (KITAGUCHI et al., 2008). While both IgY and IgY(Δ Fc) can be incorporated into the egg yolk, the full-length form (IgY) is preferentially incorporated (LIU & HIGGINS, 1990). KITAGUCHI et al. (2008) speculate that IgY fragments lacking in the Fc region, Fab and F(ab')₂ fragments, can be incorporated by fluid-phase endocytosis without binding to the receptor or carrier protein after passing through the filtration gate.

IgY production

Chickens can be used for antibody production throughout their egg laying period. Different routes and various protocols have been reported so far but it is often difficult to compare the different methods described. For practical and economic reasons, chickens kept under field conditions are usually vaccinated intramuscularly in the breast muscle but subcutaneous immunization has also been used (SCHADE et al., 1996; CARLANDER et al., 2002). Injection of the antigen by intramuscular route frequently results in higher antibody levels by day 28th after immunization (WOOLEY & LANDON, 1995). Chickens immunized by the intramuscular route continue producing specific antibodies during more than 200 days or can be used for the entire laying period depending basically on the antibody titres induced (HORTON et al., 1984; SCHADE et al., 1996).

The total number of immunization required will depend upon the type and dose of the antigen, as well as on the particular adjuvant employed. Whether the antibody titres begin to decrease, booster immunizations can be applied during the laying period. A primary vaccination and a booster should be given preferentially before the laying period, with an interval of 6 weeks for emulsion-type adjuvants and 4 weeks for lipopeptide adjuvants (SCHADE et al., 1996).

According to SCHADE et al. (1996), conventional housing should be used for scientific purpose, when antibodies are used for therapeutic and human purposes the use of specific pathogens free chickens is compulsory. It is also possible to increase yolk antibody production by using a high producing chicken line and by genetic selection within the same line (CARLANDER, 2002).

Chicken IgY exhibits high avidity (10^9 L/mol) even after the first immunization. In order to reach similar avidity values (10^{10} L/mol), a sheep, for example, must receive four boosters (WOOLEY & LANDON, 1995). LARSSON et al. (1998), studied the immune response in chickens using small amounts of mammalian antigens, and observed a good immune response obtained with the use of 0.1-1.0 μ g of bovine serum albumin. It was suggested that various concentrations of the antigen should be combined with the adjuvant. However, 25-100 μ g of antigen per immunization are usually used, although it is possible to obtain a good immune response with only 1 μ g per immunization (CARLANDER, 2002).

Isolation and purification of IgY

Currently, there are several methods of isolation and purification of functionally active chicken IgY from egg yolk described, even for large-scale purification. Nevertheless, purity and yield vary greatly from method to method and require intense optimization for each experiment (CARLANDER, 2002). The choice of a specific method depends on the yield and purity desired, final application of the IgY as well as material cost, technology, labor skills and scale of extraction.

Formerly, widespread adoption of the use of IgY-based protocols have suffered from limitations due to existing IgY purification protocols, especially those concerning the high lipid content of egg yolk which is known to interfere with affinity-based purification steps (HANSEN et al., 1998). For this, all IgY purification methods require an initial delipidation step to extract insoluble lipids and lipoproteins (KO & UHN, 2007; TAN et al., 2012) and then a subsequent step of separation. Among the currently accepted commercial and laboratory delipidation techniques, the most commonly used, involve either the use of water dilution under acidic conditions (AKITA & NAKAI, 1993), chloroform-PEG (POLSON, 1990), polyanionic polysaccharides such as xanthan (HATTA & KIM, 1990), dextran sulphate or other natural gums such as pectin (JENSENIUS et al., 1981; CHANG et al., 2000), solvents such as acetone, detergents such as SDS

(SRIRAM & YGEESWARAN, 1999), carrageenan (HATTA & KIM, 1990), aqueous 2-phase system with phosphate and triton X-100 (STALBERG & LARSSON, 2001) or simple freeze and slow thaw cycling (SVENDSEN et al., 1995). These various IgY crude extraction methods give different results considering recovery and purity of levels obtained.

After the extraction step, three types of separation can be applied to eliminate the contaminants: precipitation with ammonium sulfate (KO & UHN, 2007), or sodium sulfate (WOOLEY & LANDON, 1995), or caprylic acid-ammonium sulfate (McLAREN et al., 1994), chromatography (HANSEN, 1998) and filtration (HERNÁNDEZ-CAMPOS et al. 2010). Several of these techniques could be included in one total clean-up procedure. Among these methods, AKITA & NAKAI (1993) suggested the water dilution method under acidic conditions as the most efficient and economical procedure for large-scale production of IgY from egg yolk when compared with polyethylene glycol and dextran sulphate methods in terms of yield, purity and activity of IgY.

Ultrafiltration is one of the best methods of reduce the volume of egg yolk extract, and the efficacy of this methodology is greatly influenced by the presence of lipids or lipoproteins in the solution (KO & UHN, 2007). Therefore, complete removal of lipids or lipoproteins from extract of egg yolk is required. Changes of pH value in egg yolk solution influence the extent of interactions between polysaccharides and proteins, the precipitation of polysaccharide-lipoprotein complexes, and the recovery of immunoactivity (SAMANT et al., 1993). CHANG et al. (2000) reported that addition of 0.1% of λ -carrageenan was effective in removing lipoproteins from the water extract of egg yolk at pH 5. TAN et al. (2012), have demonstrated an alternative methodology to isolate IgY from chicken egg yolks by using a mix of κ -carrageenan, pectin and CaCl_2 as delipidation agent with use of ammonium sulphate $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ as an IgY precipitation reagent. This method also allowed the isolation of immunologically active IgY which can be used for further downstream immunotechnological processes.

Purity level of IgY from the ammonium sulfate method is higher than the cation exchange chromatography. The chromatography could handle only a small amount of samples, unlike the ammonium sulfate precipitation. Besides, the ammonium sulfate precipitation would be more efficient and useful purification method than cation exchange chromatography for the large-scale preparation of

IgY (KO & UHN, 2007). After IgY precipitation by NaCl, column chromatography (JENSENIUS et al., 1981) is frequently used in the final purification step. However, chromatography columns are generally expensive and impractical for the large-scale production of antibodies (KO & UHN, 2007).

IgY in immunodiagnostic

Immunoglobulin Y has distinctive properties which can be exploited in various fields of research, diagnostics and therapy. Since the 1970's, studies were performed in order to elucidate the functional and morphological characteristics of the poorly known immunoglobulin Y. Thereafter, there was an increase in the availability of research regarding IgY reagents (purification kits, standards, and labelled antibodies specifically against IgY), and studies related with IgY production enabling the expansion of applications in immunodiagnostic techniques. In 1995, the production came to be called "IgY Technology" (WARR et al., 1995), which is the internationally accepted term for describing the production and use of this antibody. Furthermore, the "European Centre for the Validation of Alternative Methods" (ECVAM) strongly recommends that yolk antibodies should be used as an alternative to mammalian antibodies for the animal welfare (SCHADE et al., 1996).

The IgY can be harvested from the egg yolk instead of serum, thus making blood sampling obsolete. The antibody productivity of an egg-laying hen is greater than a similar sized mammal (HAU & HENDRIKSEN, 2005) and the IgY concentration in the serum of adult hens can reach approximately 5-7mg/ml. As a laying hen produces approximately 20 eggs per month, over 2 grams of IgY can be isolated during this period corresponding approximately the IgY content of 300ml of serum or 600ml of blood. Only larger mammals can produce equal amounts of serum antibodies. Chicken antibodies, therefore, constitute a much less expensive vehicle for use in diagnostic purposes (CARLANDER, 2002).

The use of IgY can also be advantageous in immunological tests where the interference caused by IgG antibodies can be problematic, particularly, the sensitivity of the assay increases. One example is the rheumatoid factor (RF) that reacts with IgG from different mammalian species and also with mouse monoclonal antibodies (CARLANDER, 2002). RF is usually found in serum samples from patients with rheumatoid arthritis, but can also be found in patients with other diseases and even in 3-5% of healthy individuals. Interference by anti-IgG antibodies and

antibody-binding substances have been demonstrated in approximately 40% of serum samples from healthy individuals in an immunoradiometric assay (CARLANDER, 2002). Another fact is the increasing number of patients treated *in vivo* with mouse monoclonal antibodies. This treatment often evokes an antibody response in the patient resulting in production of human anti-mouse IgG antibodies (HAMA). HAMA may also be found in serum from patients who have not been treated with antibodies. The problem of RF and HAMA interference will increase as the sensitivity of the assay increases. Chicken IgY does not react with RF or HAMA and can be used to avoid interference due to these factors (LARSSON et al., 1992).

Chicken antibodies can also be used to reduce interference caused by mammalian complement activation in immunological assays. The complement cascade can be triggered after adding a fresh and undiluted serum sample to an assay, with subsequent binding of complement components to mammalian antibodies blocking the antigen-binding sites (LARSSON et al., 1992). The controls and standards used for immunological assays generally contain inactivated complement, whereas the complement activity in patient samples might differ, not only among patients but also between samples from the same patient. This difference in activity between the standards and the clinical samples might cause an analytical error (LARSSON et al., 1992; CARLANDER, 2002).

Whenever there is a risk of false positive results due to reactions between Fc region of mammalian antibodies and staphylococcal protein A or streptococcal protein G, chicken antibodies could be a tool to circumvent these problems. Unlike IgG, IgY antibodies do not bind to bacterial Fc receptors, such as staphylococcal protein A or streptococcal protein G (JENSENIUS et al., 1981). However, one disadvantage is that neither protein A nor protein G can be used for the purification of chicken IgY (SCHADE et al., 1996).

Another important advantage arises from the phylogenetic distance and genetic background that distinguishes birds from mammals improving the likelihood that an immune response will be elicited against antigens or epitopes that may be non-immunogenic in mammals (SPILLNER et al., 2012). Due to the evolutionary distance between chicken and mammalian immunoglobulins, IgY recognizes more epitopes when the immunogen used is a mammalian protein highly conserved. This feature can result in amplification of the signal, emphasizing

the advantages of using IgY over IgG as the first antibody in some types of immunological reactions (CARLANDER, 2002). It is a well-known concept that a stronger immune response is elicited when the distance between the antigen source and the immune system increases. It has also been shown that chicken antibodies have 3-5 times more affinity to antibodies of pigs than the rabbit IgG for signal amplification in immunological test (HORTON et al., 1984; OLOVSSON & LARSSON, 1993).

The limited flexibility of the avian IgY may account for the inability to precipitate antigens at physiological salt concentrations (WARR et al., 1995). IgY and IgY(Δ Fc) both possess two antigen-binding sites and should, in principle, precipitate or agglutinate multivalent antigens but this does not always occur. Most chicken antibodies bind antigen strongly but display precipitating properties only at raised salt concentrations. Duck antibodies generally fail to exhibit efficient precipitation or agglutination reactions (HIGGINS et al., 1988). The non-precipitating duck antibodies do not acquire the ability to precipitate antigen at raised salt concentrations (WARR et al., 1995).

More recently, chicken antibodies libraries have attracted scientific interest with increased reports on the isolation of chicken-derived antibody fragments. Such interest might, at least partially, be attributed to the genetic diversification which is achieved differently in chickens compared with the complexity of the mammalian mechanisms. In other words, avian species utilize a unique mode of DNA recombination, named gene conversion, resulting in a large and diverse antibody repertoire upon antigen priming (SPILLNER et al., 2012). This could be exemplified by the development of a humanized chicken monoclonal anti-IL12 antibody (NISHIBORI et al., 2006). It is also important to keep in mind that recombinant technologies currently available can generate monoclonal IgY or IgY-like antibodies from combinatorial libraries, sometimes without animal immunization (SPILLNER et al., 2012).

Taking together, all these characteristics clearly show substantial advantages of IgY technology in many medical areas, especially for diagnosis. Specific chicken antibodies have been successfully raised against a wide variety of antigens including proteins, peptides, lipid hormones and carbohydrate components from viruses, bacteria, fungi, plants and animals (SCHADE et al., 1994). Several studies have also shown promising results in the development of techniques for immunodiagnostic using IgY, such as immunoassays tests to detect circulating antigen

of *Schistosoma japonicum* (CAI et al., 2012), development of IgY antibodies against proteins of *Pythium insidiosum* (RANGEL et al., 2010), use in antigen capture-ELISA (JULIARENA et al. 2007; VEERASAMI et al., 2008), among others.

CONCLUSION

IgY antibodies have many advantages over IgG antibodies such as strong avidity, scalable productivity, low assay background, and applicability to many immunoassays providing a strategy for improvement of assay performance and accuracy. Other advantageous features of IgY include a broader antigen-binding host range, absence of activation of the mammalian complement cascade and interaction with rheumatoid factors, or bacterial and human Fc receptors, certainly helping to reduce the costs of clinical and research immunological tests. Finally, the use of IgY represents an alternative method to utilization of mammal IgG and it is in agreement with international efforts, which aim to reduce or even replace animals in scientific experimentation not to mention other desirable characteristics and applications for immunodiagnostic.

REFERENCES

- AKITA, E.M.; NAKAI, S. Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). **Journal of Immunological Methods**, v.162, n.2, p.155-164, 1993. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002217599390380P#>>. Accessed: May 28, 2013. doi: 10.1016/0022-1759(93)90380-P.
- CAI, Y.-C. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, v.61, n.3, p.385-390, 2012. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576912000098>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/j.parint.2012.01.008.
- CARLANDER, D. **Avian IgY antibody: in vitro and in vivo**. 2002. 53f. Phd Thesis - University of Uppsala, Faculty of Medicine (Sweden). Available from: <<http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:161296/FULLTEXT01.pdf>>. Accessed: May 28, 2013.
- CHANG, H.M. et al. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.995, 2000. Available from: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990539k>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1021/jf990539k.
- DAVISON, F. et al. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: DAVISON F. et al. **Avian immunology**. Amsterdam: Elsevier, 2008. Cap.6, p.107-127.
- HANSEN, P. et al. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v.215, n.1, p.1-7, 1998. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175998000507>>. Accessed: May 28, 2013. doi: 10.1016/S0022-1759(98)00050-7.
- HAMAL, K.R. et al. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. **Poultry Science**, v.85, p.1364-1372, 2006. Available from: <<http://ps.fass.org/content/85/8/1364.long>>. Accessed: Dec. 2, 2012.
- HATTA, H.; KIM, M. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". **Agriculture and Biological Chemistry**, v.54, p.2531-2535, 1990. Available from: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1961/54/10/54_10_2531/_article>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1271/bbb1961.54.2531.
- HAU, J.; HENDRIKSEN, C.F.M. Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. **Institute for Laboratory Research Journal**, v.46, p.294-299, 2005. Available from: <http://dels-old.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/46_3/pdfs/v4603Hau.pdf>. Accessed: Dec. 2, 2012.
- HERNÁNDEZ-CAMPOS, S.J. et al. Purification of egg yolk immunoglobulin (IgY) by ultrafiltration: effect of ph, ionic strength, and membrane properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.58, p.187-193, 2010. Available from: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf902964s>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1021/jf902964s.
- HIGGINS, D.A. et al. Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*). II. Antibody response in influenza A virus infections. **Immunology**, v.62, p.499-504, 1988. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1454141/>>. Accessed: Dec. 2, 2012.
- HORTON, J. et al. Exploitation of phylogenetic distance in cell surface immune labeling: studies with Beta₂-microglobulin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.85, p.96-99, 1984. Available from: <<http://www.nature.com/jid/journal/v84/n2/abs/5614667a.html>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1111/1523-1747.ep12274979.
- JENSENIUS, J.C. et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. **Journal of Immunological Methods**, v.46, n.1, p.63-68, 1981. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175981903331>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/0022-1759(81)90333-1.
- JULIARENA, M. et al. Chicken antibodies: a useful tool for antigen capture ELISA to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies. **Veterinary Research Communications**, v.31, p.43-51, 2007. Available from: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11259-006-3422-1>>. Accessed: May 28, 2013. doi: 10.1007/s11259-006-3422-1.
- KITAGUCHI, K. et al. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.121, p.290-299, 2008. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242707003649>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.10.006.
- 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. Available from: <<http://poultsci.highwire.org/content/86/2/400.full.pdf+html>>. Accessed: Dec. 2, 2012.

- KLEMPERER, F. Ueber natürliche immunität und ihre verwertung für die immunisierungstherapie. **Archiv für die Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.31, p.356-382, 1893. Available from: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01832882>>. Accessed: May 28, 2013.
- KOWALCZYK, K. et al. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. **Immunology**, v.54, n.4, p.755-762, 1985. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1453552/pdf/immunology00197-0143.pdf>>. Accessed: May, 28, 2013.
- LARSSON, A. et al. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, v.10, p.29-36, 1998. Available from: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09540109809354966#preview>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1080/09540109809354966.
- LARSSON, A. et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v.156, p.79-83, 1992. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002217599290013J>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/0022-1759(92)90013-J.
- LESLIE, G.A.; CLEM, L.W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. **Journal of Experimental Medicine**, v.130, n.6, p.1337-1352, 1969. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2138693/pdf/1337.pdf>>. Accessed: May 28, 2013.
- LI, L. et al. Extensive diversification of IgD-, IgY- and truncated IgY(Δ Fc)-encoding genes in the red-eared turtle (*Trachemys scripta elegans*). **Journal of Immunology**, v.189, n.8, p.3995-4004, 2012. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972932>>. Accessed: May 20, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1200188.
- LIU, S.S.; HIGGINS, D.A. Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas platyrhynchos*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v.97, n.4, p.637-644, 1990. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305049190901008>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/0305-0491(90)90100-8.
- McLAREN, R. D. et al. The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chicken immunized with ovine α -lactalbumin. **Journal of Immunological Methods**, v.177, p.175-184, 1994. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175994901546>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/0022-1759(94)90154-6.
- NISHIBORI, N. et al. Humanization of chicken monoclonal antibody using phage-display system. **Molecular Immunology**, v.43, p.634-642, 2006. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589005001318>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/j.molimm.2005.04.002.
- OLOVSSON, M.; LARSSON, A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.16, n.2, p.145-152, 1993. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014795719390007R>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/0147-9571(93)90007-R.
- OTA, T. et al. Lineage-restricted retention of a primitive immunoglobulin heavy chain isotype within the Dipnoi reveals an evolutionary paradox. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.5, p.2501-2506, 2003. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151370/>>. Accessed: May, 28, 2013. doi: 10.1073/pnas.0538029100.
- POLSON, A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. **Immunological Investigate**, v.19, p.253, 1990. Available from: <<http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/08820139009041840>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.3109/08820139009041840.
- RANGEL, M.F.N. et al. Development of IgY antibodies in chickens and IgG in rabbits immunized against proteins of *Phytium insidiosum* isolated from horses in the state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.87-93, 2010. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000100014>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1590/S0100-736X2010000100014.
- ROSE, M.E. et al. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. **European Journal of Immunology**, v.4, p.521-523, 1974. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830040715/pdf>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1002/eji.1830040715.
- SAMANT, S.K. et al. Protein-polysaccharide interaction: A new approach in food formulations. **International Journal of Food Science and Technology**, v.28, p.547-562, 1993. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1993.tb01306.x/pdf>>. Accessed: May 28, 2013. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb01306.x.
- SCHADE, R. et al. Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. **Alternativen zu Tierexperimenten**, v.11, p.75-84, 1994. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11178370#>>. Accessed: Dec. 2, 2012.
- SCHADE, R. et al. The production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.24, p.925-934, 1996. Available from: <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/archive-publications/publication/WorkshopReport21.pdf>. Accessed: May 28, 2013.
- 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**, v.33, p.129-154, 2005. Available from: <http://www.frame.org.uk/atla_issue.php?iss_id=13>. Accessed: May 28, 2013.
- SHIMIZU, M. et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.56 n.2, p.270-274, 1992. Available from: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1992/56/2/56_2_270/_article>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1271/bbb.56.270.
- SPILLNER, E. et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v.40, n.5, p.313-322, 2012. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105612000759>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.05.003.

- SRIRAM, V.; YGEESWARAN, G. Improved recovery of immunoglobulin fraction from egg yolk of chicken immunized with AsialoGM1. **Russian Journal of Immunology**, v.4, p.131-140, 1999. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12687120>>. Accessed: Dec. 2, 2012.
- STALBERG, J.; LARSSON, A. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v.106, p.99-110, 2001. Available from: <<http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/2000-1967-162>>. Accessed: Dec. 2, 2012.
- SVENDSEN, B.L. et al. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Laboratory Animal Science**, v.45, n.1, p.89-93, 1995. Available from: <<http://europepmc.org/abstract/MED/7752622>>. Accessed: Dec. 2, 2012.
- TAN, S.H. et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **Journal of Immunological Methods**, v.380, n.1-2, p.73-76, 2012. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175912000804>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/j.jim.2012.03.003.
- TIZARD, I. The avian antibody response. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.11, n.1, p.2-14, 2002. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055937X0280010X>>. Accessed: May 28, 2013. doi: 10.1053/saep.2002.28216.
- VEERASAMI, M. et al. Serotyping of foot-and-mouth disease virus by antigen capture-ELISA using monoclonal antibodies and chicken IgY. **New Microbiologica**, v.31, p.549-554, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19123312>>. Accessed: May 28, 2013.
- WARR, G.W. et al. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v.16, n.8, p.392-398, 1995. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167569995800085>>. Accessed: May 28, 2013. doi: 10.1016/0167-5699(95)80008-5.
- 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. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002217599400263V>>. Accessed: Dec. 2, 2012. doi: 10.1016/0022-1759(94)00263-V.