

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM GALINHAS

Marco Cesar Cunegundes Guimarães

Doutor em Imunologia Aplicada, Universidade Federal do Espírito Santo
Centro Biomédico, Dept. de Morfologia
marco.cunegundes@gmail.com

Vitor Guimarães Correia

Mestre em Biociências, Universidade Salgado de Oliveira

Reubes Valério da Gama Filho

Doutor em Fisiologia, Universidade Salgado de Oliveira

RESUMO

Anticorpos, também chamados de imunoglobulinas, são proteínas produzidas por células especializadas do sistema imune para auxiliar o organismo a destruir os microrganismos invasores. Por causa da versatilidade dos anticorpos, terapias baseadas no uso de imunoglobulinas podem, em teoria, ser desenvolvidas contra qualquer patógeno existente. A terapia contra doenças infecciosas baseada na utilização de anticorpos foi desenvolvida primeiramente em 1890. A partir de então foi largamente utilizada até por volta do ano de 1935, quando surgiram os antimicrobianos. Nas décadas seguintes ocorreu um declínio em relação a sua produção e muitos pesquisadores pararam de publicar trabalhos. Após o desenvolvimento de técnicas celulares e moleculares a indústria e os centros de pesquisa retomaram o interesse sob os anticorpos. Recentemente, muitos avanços têm sido feitos em técnicas usadas para gerar anticorpos, humanizar anticorpos e extrair anticorpos específicos na gema de ovo de galinhas imunizadas. Por isso, o uso terapêutico de anticorpos constitui uma importante alternativa contra novos agentes emergentes. A produção de anticorpos (Abs) em galinhas e a extração de anticorpos específicos na gema do ovo são incrivelmente atrativas e interessantes para a comunidade científica.

Palavras-chave: anticorpos policlonais, anticorpos IgY e terapia de anticorpos.

ABSTRACT

Antibodies, also known as immunoglobulins are proteins that are used by the immune system to identify and neutralize foreign structures, such as bacteria and viruses. Because of the versatility of antibodies, antibody based therapies may be developed against any pathogen. The serum therapy was first described in 1890. In the next years, it was largely produced and used to control a wide range of infectious diseases. However, when antimicrobial chemotherapy was discovered around 1935, serum therapy for bacterial disease was rapidly abandoned. After the development of some cellular and molecular techniques the industry and research centers returned the interest about the antibodies. Recently, major advances have been made in the techniques used to generate human antibodies, humanize murine MAbs and chicken egg yolk antibody. For this, the therapeutic use of antibodies is an important alternative against new emerging pathogens. Due to some features the use of chicken egg yolk antibodies are incredibly attractive and interesting to the scientific community.

Keywords: Polyclonal antibodies, IgY antibodies and serum therapy.

INTRODUÇÃO

Anticorpos são proteínas encontradas no plasma e fluidos extracelulares e compreendem um dos principais efetores do sistema imune adaptativo ⁽¹⁾. São produzidos em resposta a moléculas e organismos, a qual é capaz de neutralizar e/ou eliminar ^(1,2). A habilidade do anticorpo de se fixar a um antígeno com alto grau de afinidade e especificidade o conduziu para o seu uso ubíquo ⁽³⁾. Seu uso em ensaios em diagnóstico e terapia tem provocado um profundo impacto na melhoria da saúde e no bem-estar de humanos e animais ⁽³⁾.

A soroterapia teve início em 1890 quando von Bhering e Kitasato descobriram a anti-toxina diftérica. Com o passar do tempo, anticorpos específicos foram utilizados para o tratamento de infecções, tais como a raiva e o tétano. A especificidade e avidéz dos anticorpos são a base para a promoção da terapia de administração de anticorpos. Nos últimos 10 anos, os avanços na engenharia genética têm possibilitado o aumento da especificidade de anticorpos a sítios combinados, melhorando assim a sua utilidade terapêutica ⁽⁴⁾.

A introdução de anticorpos no tratamento de imunodeficiências e doenças infecciosas foi um significativo avanço na medicina. O anti-soro animal e humano são usados *in vivo* para destruir bactérias e neutralizar vírus no sangue de indivíduos infectados ^(5,6). Possivelmente a mais importante aplicação foi o uso de anticorpos para o antígeno Rh de eritrócitos, evitando o desenvolvimento da doença hemolítica do recém-nascido ⁽⁷⁾. O tratamento com anticorpos policlonais é associado com muitos efeitos colaterais não desejados. Doença do soro, anafilaxia e a natureza desses anticorpos são considerados fatores limitantes ^(8,9). Isto tem motivado pesquisadores a produzirem anticorpos bem definidos em relação a sua qualidade e especificidade ⁽¹⁰⁾.

Apesar dos problemas e dificuldades envolvidos, existem diversas vantagens para a utilização de anticorpos policlonais ou monoclonais na medicina humana e animal ⁽¹⁰⁾. O maior estímulo para o desenvolvimento de pesquisas nessa área é rápido desenvolvimento de resistência de muitos microrganismos a agentes microbianos, principalmente aos antibióticos. O aumento do número de mortes causadas por superbactérias na última década fez com que alguns grupos de pesquisa repensassem o uso de anticorpos como importante alternativa ao uso de antibióticos ⁽¹¹⁾.

No entanto, apesar de todas as vantagens observadas, o desenvolvimento de anticorpos para uso comercial envolve sérias implicações éticas associadas ao bem-estar animal. Os anticorpos monoclonais são constantemente avaliados para pesquisa, diagnóstico e terapias. O uso destes anticorpos encarece a pesquisa clínica e causa sacrifícios dos animais envolvidos ⁽¹²⁾. Portanto, o desenvolvimento alternativo de anticorpos que possam ser utilizados no diagnóstico e terapia das doenças se faz necessário ⁽¹³⁾. O uso de galinhas como fonte para imunização traz um grande número de vantagens para a produção de anticorpos policlonais, como, por exemplo, o método de coleta de anticorpos não invasivo e a maior quantidade de anticorpos que podem ser encontrados na gema do ovo de galinha ⁽¹⁴⁾. Estes anticorpos são chamados de imunoglobulina Y (IgY) ⁽¹⁵⁾.

Este artigo fornece uma revisão sobre a estrutura, função, formas de obtenção e utilização da imunoglobulina Y, obtida na gema do ovo de galinha. Além de relacionar algumas diferenças entre a IgY de aves e a IgG de mamíferos.

Anticorpos da gema do ovo de galinha

Em 1893, Klemperer descreveu um experimento na qual ele demonstrou que a imunização de uma galinha resulta na transferência de anticorpos específicos para a gema do ovo ⁽¹⁵⁾.

Inicialmente, anticorpos IgY foram descritos como semelhantes a IgG de mamíferos, entretanto agora são considerados evolutivamente um ancestral comum para IgG e IgE de mamíferos ⁽¹⁶⁾.

A IgY é exclusivamente transferida para a gema do ovo por um processo mediado por receptor ^(17,18). A quantidade de IgY transferida é dependente da concentração sérica, e parece que toda a população de IgY é transferida ⁽¹⁸⁾.

A passagem transovariana da IgY leva aproximadamente 5 dias ⁽¹⁷⁾. A meia-vida da IgY circulante em aves adultas é aproximadamente de 36 a 65 horas ⁽¹⁹⁾. A quantidade de IgY transferida parece ser independente do tamanho do ovo ^(20,21).

Por um longo período não existiu aplicação científica para esse conhecimento, mas quando o bem-estar animal se tornou uma séria questão de preocupação ética para a comunidade científica, os resultados de Klemperer ganharam interesse. A partir de 1959 vários trabalhos começaram a ser publicados ^(22,23,24,25,26) relacionando o uso da IgY como anticorpo secundário para kits de diagnóstico. Na década de 1990, a tecnologia de IgY teve reconhecimento internacional ⁽²⁷⁾ e foi oficialmente aprovado pela comunidade europeia como método alternativo para o bem-estar animal. Enquanto isso, inúmeras publicações têm reportado muitos aspectos desta tecnologia.

Características da IgY de aves

Existem diversos motivos para que os anticorpos extraídos da gema do ovo de galinha possam ser utilizados ao invés dos anticorpos de mamíferos.

As vantagens do uso de IgY vem sendo publicadas por diversos autores ao longo dos anos ^(28 e 29), as quais algumas são descritas na tabela 1.

A obtenção de anticorpos IgY em galinhas é menos onerosa do que o similar em outras espécies animais, além de ser mais adequada aos padrões de bem-estar animal. A produção de anticorpos de uma galinha corresponde a de um animal de grande porte. Desta maneira, uma elevada quantidade de anticorpos pode ser produzidas em uma galinha, aproximadamente 17 a 35 g de IgY total/galinha/ano, dos quais 1-10% pode ser específico para o antígeno ⁽³⁰⁾.

A proteína C-reativa (CRP) pertence ao chamado grupo das proteínas de fase aguda, a qual pode aumentar mais de cem vezes o processo inflamatório. O resultado de um teste de ELISA, por exemplo, pode ser inexato devido a presença de fatores reumatóides (RFs), a qual são capazes de se fixar a imunoglobulinas de mamíferos. Uma substancial vantagem do uso de IgY é a inabilidade para reações cruzadas com RFs, por causa da ausência dos sítios de ligação no Fc correspondente ⁽¹⁶⁾.

Anticorpos humanos “anti-mouse” (HAMAs) podem ser produzidos em pacientes que receberam imunoterapia com anticorpos monoclonais de camundongo (Mabs). Estes anticorpos podem neutralizar a ação do Mabs e gerar uma interferência em ensaios imunológicos. Anticorpos de galinha podem ser usados como alternativa nestes ensaios ⁽¹⁶⁾.

Anticorpos de galinha não são capazes de ativar o sistema complemento de mamíferos, portanto podem ser usados para reduzir a interferência pela ativação do complemento ⁽³¹⁾.

A proteína A estafilocócica e a proteína G estreptocócica são muito utilizadas pela sua habilidade para fixar IgG. O *Staphylococcus* e *Streptococcus* são freqüentemente encontrados em amostras bacterianas. Quando presentes, eles podem se ligar a anticorpos específicos para outras bactérias causando assim um resultado falso positivo. Anticorpos de galinha não se fixam a proteína A ou G e podem ser usados para reduzir estas interferências ⁽³²⁾.

Formas de obtenção da IgY

O desenvolvimento e a produção de anticorpos como um resultado de imunização não são muito previsíveis.

Galinhas podem ser usadas para a produção de anticorpos a partir do momento em que entram em postura. Animais que são usados para a produção de anticorpos por mais de três meses precisam receber várias imunizações com os antígenos a cada mês para assegurar o alto nível de produção. Galinhas podem produzir anticorpos com alta avidéz logo após a primeira imunização. Porém, este resultado depende de algumas variáveis, as quais incluem o tipo de antígeno (dose e peso molecular), o adjuvante, a via de administração, a genética do animal e o tipo de criação. A concentração do antígeno pode variar entre 0.10-1.0 mg, em casos especiais 10 µg, variando com o tipo de adjuvante a ser utilizado. O volume das injeções varia entre 0.5-1.0 ml e a via usual de aplicação é a intramuscular, preferencialmente no peito

das aves. O intervalo pode ser de 4-8 semanas e o número de imunizações dependente do interesse da produção de anticorpos ⁽¹⁶⁾.

Após o primeiro inoculo as aves iniciam a produção de anticorpos e dentro de poucos dias os mesmos já podem ser encontrados na gema do ovo das galinhas.

Vários processos são avaliados para isolar IgY da gema de ovos, e podem ser usados em combinação, de acordo com a quantidade, pureza e atividade biológica desejada ⁽³³⁾. O incômodo e os custos envolvidos são fatores relevantes. Dado o alto nível de atividade de anticorpos, um processo de isolamento ocasiona uma escolha entre a quantidade e pureza, desde que vários estágios de purificação principalmente envolvem uma quantidade baixa de IgY na gema. Todo processo de extração se inicia pela separação da gema e da clara ⁽³⁴⁾.

Em geral, estes métodos podem ser divididos em três grupos principais:

1. Métodos de precipitação: Envolvendo sulfato de amônio e sódio ^(35 e 36), polietilenoglicol (PEG) ^(37 e 38), ácido caprílico ⁽³⁹⁾ e carrageenan ^(40 e 41);
2. Métodos cromatográficos: Cromatografia de afinidade ⁽⁴²⁾, cromatografia de troca iônica ⁽³³⁾, cromatografia de interação hidrofóbica ⁽³⁴⁾, cromatografia de interação tiofílica ⁽⁴³⁾ e cromatografia de gel filtração ⁽³³⁾;
3. Ultrafiltração ⁽⁴⁴⁾.

Utilização da IgY

As aplicações de IgY tem alcançado relativo sucesso na última década e, vem sendo utilizadas em uma variedade de pesquisas ⁽²³⁾. O sucesso no desenvolvimento destes anticorpos está relacionado às diferenças bioquímicas com a IgG de mamíferos, tornando-a vantajosa sob vários aspectos, permitindo assim a sua utilização em centros de pesquisa voltados para pesquisa básica e aplicada, além de serem explorados pela indústria farmacêutica na implementação de kits diagnósticos, terapias e mais recentemente em produtos de higiene pessoal, cosméticos e como aditivo de alimentos funcionais ^(45 e 46).

O uso da IgY em imunoterapias é mais recente. O seu desenvolvimento para ingestão oral de humanos e animais vem se tornando muito comum. A administração oral de IgY específica pode prevenir infecções com *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística ⁽⁴⁷⁾, a formação de placas bacterianas por *Streptococcus mutans* ⁽⁴⁸⁾, o desenvolvimento de úlcera gástricas por *Helicobacter pylori* ⁽¹³⁾, enterites por *Escherichia coli* em leitões ⁽⁴⁹⁾ e rotavírus humano ⁽³¹⁾. Além disso, o efeito protetor de IgY anti-veneno de cobra e escorpião tem sido mostrado em camundongos ⁽⁵⁰⁾. Almeida ⁽⁵¹⁾ encontrou resultados similares, produzindo IgY contra veneno de *Bothrops* e *Crotalus*.

O desenvolvimento de algumas biotécnicas moleculares tem colaborado com a produção de IgY com maior especificidade e sem muita variação na concentração de anticorpos específicos entre as amostras de mesmo lote. Em 1991, Nishinaka ⁽⁵²⁾ produziu o primeiro anticorpo monoclonal de galinhas (chmAB). Sincronicamente, outras possibilidades surgiram, tais como os anticorpos de galinhas recombinantes oriundos da técnica de phage display ⁽⁵³⁾ e a expressão de anticorpos em gema do ovo de galinhas produzidos por engenharia genética ⁽¹⁸⁾.

Anticorpos IgY foram produzidos contra uma grande variedade de antígenos e, conseqüentemente foram aplicados em diferentes métodos com diferentes propósitos. No Brasil, recentemente, o professor Wilmar Dias tem utilizado galinhas para a produção de antiveneno específico para venenos de cobras africanas ⁽⁵⁴⁾.

Nos últimos cinco anos a IgY foi desenvolvida com sucesso para ser usada como imunizante passivo contra patógenos intestinais humanos e animais, como imunoterapêutico para bactérias que são de difícil controle com antibióticos e como ferramenta para investigação oncológica.

	IgG de coelho	IgY de galinhas
Método de coleta	Invasivo	Não invasivo
Quantidade de anticorpo	200mg/40ml de sangue	5-100mg/ovo; 5-7 ovos/semana
Quantidade de anticorpo por mês	200mg	Aproximadamente 1000-2800mg
Interferência com imunoglobulinas de mamíferos (fator reumatóide)	Sim	Não
Interferência com HAMA*	Sim	Não
Interferência com complemento de mamífero	Sim	Não
Ligação com proteína A ou G	Sim	Não

Tabela 1. Características de anticorpos IgG de mamíferos comparados com a IgY de galinhas, adaptado de Schade *et al*, 2005.

*HAMA, anticorpos anti-mouse humanos.

CONCLUSÃO

A produção de IgY na gema do ovo de galinhas é um eficiente e econômico método para obtenção de anticorpos policlonais, no qual o sangramento dos animais não é necessário e a purificação do anticorpo é relativamente simples.

Uma quantidade substancial de informação indica a facilidade e a viabilidade de utilizar IgY para fins de diagnóstico e como poderoso terapêutico na imunologia clínica.

Apesar de todos os trabalhos e da ampla utilização da IgY, o seu uso como terapêutico precisa ser explorado.

A IgY pode ser facilmente obtida e não causa muito estresse animal para ser extraída, no entanto, a obtenção pode ser dificultada pelo alto custo e aumento das etapas para extração da gema.

Uma das grandes aplicações deste anticorpo pode estar relacionada ao controle de infecções bacterianas, pois a partir de janeiro de 2007, através de uma recomendação da “FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS”, a utilização de antibióticos em ração animal será proibida, fazendo com que alternativas sejam rapidamente desenvolvidas.

Outra proposta de desenvolvimento se dá através do aumento do conceito de “comida funcional” na última década, onde a IgY pode ser administrada como aditivo alimentar, sem necessariamente ser purificada.

REFERÊNCIAS

- Litman GW, Rast JP, Shamblott MJ. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 1993; 10 (1): 60–72.
- Parker D. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11:331-60.
- Mian I, Bradwell A, Olson A. Structure, function and properties of antibody binding sites. *J Mol Biol.* 1991; 217(1):133-51.
- Casadevall A. Antibody-Based Therapies for Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases.* 1996; Vol.2, No.3, 200-208.
- Dowling HF, Abernethy TJ. The treatment of pneumococcus pneumonia: a comparison of the results obtained with specific serum and sulfapyridine. *Am J Med Sci.* 1940;199:55-62 apud Casadevall A. Antibody-Based Therapies for Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases.* 1996; Vol.2, No.3, 200-208.
- Cory CW, Abbot CE, Truszkowski EG. Treatment of meningococcal meningitis and septicemia. *J Pediatr.* 1944; 25:35-48 apud Casadevall A. Antibody-Based Therapies for Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases.* 1996; Vol.2, No.3, 200-208.

- Fung Kee Fung K, Eason E, Grane J, Armson A, De La Ronde S, Farine D, et al. Prevention of Rh alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can.* 2003; 25 (9): 765-73.
- Rackermann FM. Allergy: serum reactions, with particular reference to the prevention and treatment of tetanus. *JAMA* 1942; 226:726-33 apud Casadevall A. *Antibody-Based Therapies for Emerging Infectious Diseases.* Emerging Infectious Diseases. 1996; Vol.2, No.3, 200-208.
- Feinberg SM. The therapy of (horse) serum reactions. general rules in the administration of therapeutic serums. *JAMA* 1936;107:1717-9 apud Casadevall A. *Antibody-Based Therapies for Emerging Infectious Diseases.* Emerging Infectious Diseases. 1996; Vol.2, No.3, 200-208.
- Wright A, Shin S-U, Morrison SL. Genetically engineered antibodies: progress and prospects. *Crit Rev Immunol.* 1992; 12:125-68.
- Berghman LR, Abi-Ghanem D, Waghela SD, Ricke SC. Antibodies: an alternative for antibiotics? *Poultry Science.* 2005; Vol 84, Issue 4, 660-666.
- Shin JH, Yang M, Nam SW, Kiro JT, Myung NH, Bang WG et al. Use of egg yolk derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology.* 2002; 9, 1061-1066.
- Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe LH. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to *H. pylori*-specific egg-yolk immunoglobulin. *Journal of Medical Microbiology.* 2003; 52, 217-222.
- Schade R, P fisher C, Halatsch R, Henklein P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk: an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbit. *ATLA.* 1991; 19, 403-419.
- Klemperer F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1893; 31, 356-382 apud Narat M. Production of antibodies in chickens. *Food Technol. Biotechnol.* 2003; 41(3), 259-267.
- Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HT. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *ATLA.* 2005; 33, 1-26.
- MS Mohammed, SL Morrison, LA Willis, R Trinh, Willderman AG, Bonselaar J, et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology.* 1998; 4,115-125.
- SL Morrison, MS Mohammed, LA Wills, R Trinch, R Etches. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology.* 2002; 38,619-625.
- Patterson R, Younger JS, Weigle WO, Dixon FJ. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *Journal of Immunology.* 1962; 89, 272-278.
- Dohms JE, Saif YM, Bacon WL. Studies on metabolism and concentration of immunoglobulin G in the newly hatched turkey poult. *American Journal of Veterinary Research.* 1978; 39, 1466-1471.
- Bollen LS, Hau J. Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. *In Vivo* 1997; 11, 395-398.
- Russel WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique.* 1959; 238 pp. London, UK: Methuen.
- Ben L, Hommel U, Oertel M, Hauschild S. Kinetics of IgY formation after immunisation of hens with different protein antigens. *ALTEX.* 1969; 18, Suppl. 1, 18-21.
- RoseME, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology.* 1974; 4, 521-523.
- Yamamoto H, Watanabe H, Sato G, Mikami T. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Japanese Journal of Veterinary Research.* 1975; 23, 131-140.
- Noll F, Lutsch G, Bielka H. Structure of IgG and IgY molecules in ribosome-antibody complexes as studied by electron microscopy. *Immunology Letters.* 1982; 4, 117-123.

Schmidt P, Wiedemann, V., Kühlmann, R, Wanke, R, Linckh, E. & Lösch, U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal disorders. *Veterinary Medicine*. 1989; B 86, 619-628.

Schade R, Hlinak, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX* 13, Suppl. 1996; 1,5-9.

Carlander D. Avian IgY Antibody. *In Vitro and In Vivo*. Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 2002; 1119, 153pp. Uppsala, Sweden: University of Uppsala.

Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J et al. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia inducible factor 1 α . *The FASEB Journal*. 1999; 3, 81-88.

Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T, Ebina T. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1993; Jul; 57(7):1077-81.

Leenars PPAM, Hendriksen CFM, de Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R et al. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM workshop 35. *ATLA* 1999; 27, 79-102.

Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY Technology (ed. R Schade, L Behn, M. Erhard, A Hlinak & C. Staak), pp. 108-210. Berlin, Germany, Heidelberg, Germany, & New York, USA: Springer Lab Manuals 2000.

Hassl A, Aspöck H. Purification of egg yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *Journal of Immunological Methods*. 1988; 110, 225-228.

Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolks: isolation and purification. *Journal of Food Science*. 1992; 57, 629-634.

Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods*. 1993; 160, 207-214.

Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunological Investigations*. 1990; 19, 253-258.

Shafiq MK, Afzal H, Khanum N, Arshad M. Isolation of egg yolk immunoglobulins (IgY) by chloroform polyethylene glycol technique and assaying of antibodies against avian infectious bronchitis. *Veterinary Medicine Journal*. 1997; 45, 273-278.

McLaren RD, Prosser CG, Grieve RCJ, Borrisenko M. The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunised with ovine α -lactalbumin. *Journal of Immunological Methods*. 1994; 177, 175-184.

Chang HM, Lu TC, Chen CC, Tu YY, Hwang JY. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48, 995-999.

Guimarães MCC. Produção e aplicação de anticorpos da gema do ovo de galinha [tese]. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; 2005.

Lesley SA, Groskreutz DJ. Simple affinity purification of antibodies using *in vivo* biotinylation of a fusion protein. *Journal of Immunological Methods*. 1997; 207, 147-155.

Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *Journal of Immunological Methods*. 1998; 215, 1-7.

Kim H, Nakai S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. *Journal of Food Science*. 1998; 63, 485-490.

Yamamoto Y, Takekoshi Y, Itami N, Honjo T, Kojima H, Yano S et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for extracellular glutathione peroxidase in serum of normal individuals and patients with

renal failure on hemodialysis. *Clinical Chemica Acta*. 1995; 236, 93-99.

Yang J, Jin Z, Yu Q, Yang T, Wang H, Liu L. The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers. *Chinese Journal of Biotechnology*. 1997; 13, 85-90.

Kollberg H, Carlander D, Olesen H, Wejaker PE, Johannesson M, Larsson A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatric Pulmonology*. 2003; 35, 433-440.

Chi ZB, Gao YX, Pan Y, Zhang B, Feng XP. The inhibitive effect of IgY toothpaste against oral *Streptococcus mutans*. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2004; (4):256-8.

Ribeiro AML, Rudnik L, Canal CW, Kratz LR, Farias C. Uso de Gemas de Ovos de Aves Hiperimunizadas Contra *Escherichia coli* Suína no Controle da Diarréia Neonatal de Leitões. *R. Bras. Zootec*; 2005; v.34, n.4, p.1234-1239.

Thalley BS, Carroll SB. Rattlesnake and scorpion antivenoma from the egg yolks of immunized hens. *Biotechnology*. 1990; 8, 934-938.

Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel Filho FB, Matta MF, Kipnis TL, da Silva WD. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Veterinary Record*. 1998; 143, 579-584.

S Nishinaka, T Suzuki, H Matsuda, M Murata. A new cell line for the production of chicken monoclonal antibody by hibridoma technology. *Journal of Immunological Methods*. 1991; 139 (2), p.217-222.

J McCafferty, AD Griffiths, G Winter, DJ Chiswell. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990; 348, 552 – 554.

Pesquisador da UENF desenvolve soro contra veneno de serpentes africanas. *Informativo da UENF* 2007; agosto 08, p. 1-3.