



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL
EM BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS Y CONTRA
ANTÍGENOS DE *Shigella spp.***

JENIFFER CLORIVES LOPES BATISTA

Manaus-AM
2019

JENIFFER CLORIVES LOPES BATISTA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS Y CONTRA
ANTÍGENOS DE *Shigella spp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração em Saúde.

Orientador: Dr. Luís André Morais Mariúba

Manaus-AM
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B333p Batista, Jeniffer Clorives Lopes
Produção e Avaliação de Imunoglobulinas Y contra antígeno de
Shigella spp. / Jeniffer Clorives Lopes Batista. 2019
56 f.: 31 cm.

Orientador: Luís André Morais Mariúba
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Shigella flexneri. 2. peptídeo sintético. 3. FimH. 4.
Imunoglobulina Y. I. Mariúba, Luís André Morais II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

JENIFFER CLORIVES LOPES BATISTA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS Y CONTRA
ANTÍGENOS DE *Shigella spp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como pré-requisito para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração em Saúde.

DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM: 01/03/2019

BANCA EXAMINADORA

**Dr. Luís André Morais Mariúba – ILM
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE-FIOCRUZ AMAZONIA**

**Dra. Andrea Monteiro Tarragô -HEMOAM
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO
AMAZONAS**

**Dr. Helber Abellini Astolpho – CMM
COLÉGIO MILITAR DE MANAUS**

Aos meus queridos pais Vanderléa e Moacy, aos meus avós Joaquim e Manoel, grandes impulsionadores desse sonho, ao meu amoroso marido Diego por todo apoio a realização dos meus projetos.

Dedico

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”.

Isaac Newton

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, quem me guia e fortalece a cada passo da vida, o dom mais precioso concedido. Obrigada meu Senhor e meu Deus por tudo! Nada que eu faça será suficiente para agradecer toda graça que vem de, ti meu pai, e mesmo assim a minha voz cantará engrandecendo o Teu nome, te louvando e glorificando!

Aos meus pais, Moacy e Vanderléa, por toda dedicação, amor e principalmente pelo incentivo a estudar e ir em busca dos meus sonhos. Sou muito grata a Deus por ter pais tão dedicados que nunca mediram esforços para me orientar, educar e amar. Vocês são meus heróis e exemplo de vida, sem vocês eu nada seria.

Ao marido e fiel amigo, Diego Luã, presente de Deus para mim. Muito obrigada pela parceria, amor e cumplicidade sem medidas, nas mais diversas circunstâncias.

Aos avós, Dona Clorives e Sr. Joaquim, Dona Maria e Sr. Manoel, pelo afago e valiosos conselhos, amor e carinho. Encontrei em vocês conhecimentos que jamais caberão em prateleiras de bibliotecas.

Aos irmãos, Jonathan, Vandercy, Miléa, Maria e Luana pela história de vida compartilhada. Vocês são minha grande paixão e os amores mais leais que eu poderia ter.

Aos queridos amigos, Késsia e Wagner, Lorrane e Diego, anjos que me deixam em pé quando estou sem força para voar e que me fazem felizes sem nada cobrar. A vocês minha lealdade!

Aos colegas de turma, Samanta, Tarsila, Minerval, Jander e André pelo companheirismo e amizade durante a realização deste trabalho. Vocês são prova de que sorrisos devem ser compartilhados e pesos não precisam ser carregados sozinho.

Ao meu queridíssimo orientador Dr. Luís André Mariúba, pelo voto de confiança e oportunidade de realizar um trabalho como este, fazer parte dessa equipe de pesquisa fantástica (DCDIA). Mais que um orientador, o Sr. foi um amigo que com toda compreensão, paciência e principalmente humildade fascinante, contribui para o crescimento e desenvolvimento de seus alunos.

Aos caríssimos colegas de trabalho Juliane, Rarissa e Yury, pessoas incríveis que além de muito conhecimento são pessoas gentis, de imensa humildade e carisma com quem pude aprender bastante durante o mestrado. Minha caminhada não teria tanta luz e significado sem vocês! E claro, a galerinha do NIT: Daniele, Edilene, Paula, Diogo, Natália e Walter: Vocês encheram minha jornada com uma dose de aconchego e apoio que só podemos encontrar em pessoas ímpares. Ter trabalhado com pessoas maravilhosas como vocês tornou o percurso, de longe muito mais recompensador que o alvo principal.

À Universidade Federal do Amazonas, que através do Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia (PPGBiotec), impulsiona os jovens a aprofundar na Ciência e Pesquisa e transformar aos poucos a sociedade. Ao PPGBiotec por todo suporte

administrativo, em especial ao Dr. Edmar Vaz e Nubiane Pinom, pela dedicação e empenho para auxiliar os discentes em todas as etapas inerentes à vida acadêmica.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia, que através da Dona Jura, Michele, Mari, Ketlen, Ivanildes e Rosinara; dos senhores Evandro, Lúcio, Francinaldo, Ícaro, Raimundo, Sebastião e Orismar, deram o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Vocês sem dúvida foram meu braço direito e esquerdo em todas as etapas!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida, que apesar das constantes reduções de investimento por parte do governo Brasileiro, ainda está de pé e torna possível o desenvolvimento da ciência no país.

RESUMO

Shigella é o patógeno Gram-negativo que causa a disenteria aguda, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos de idade em países de baixa e média renda, ocasionando milhares de óbitos por ano. Em decorrência disso, diversos estudiosos têm se empenhado com a busca por uma alternativa eficaz e segura, principalmente pela falta de uma vacina eficaz e a disseminação de cepas multirresistentes. O peptídeo P9 (FimH) de *Shigella flexneri* foi utilizado neste estudo, para imunizar galiformes *Gallus galus Dekalb White* afim de produzir e avaliar IgY (Imunoglobulina Y). A IgY anti-P9 obtida e isolada por métodos de precipitação com polietilenoglicol e cromatografia de afinidade, foi avaliada quanto a sua reatividade pelas técnicas imunológicas Dot blot, Western blot e Citometria de fluxo. IgY anti-P9 foi capaz de reconhecer o antígeno-alvo na forma sintética, denaturada e nativa de *Shigella flexneri* 5a M90T. O anticorpo obtido apresentou reatividade cruzada contra outras cepas de bactérias diarreio gênicas, não podendo este ser utilizado para utilização em métodos de imunodiagnóstico. Por outro lado, estes anticorpos possuem grande potencial para utilização em métodos de imunidade passiva contra *Shigella spp.*, e possivelmente servir de base para ampliação na aplicação contra outras doenças.

Palavras-Chave: *Shigella flexneri*, peptídeo sintético, FimH, Imunoglobulina Y.

RESUMO

Shigella is the Gram-negative pathogen that causes acute dysentery, affecting mainly children under five years of age in low- and middle-income countries, causing thousands of deaths per year. As a result, several scholars have been working to search for an effective and safe alternative, mainly due to the lack of an effective vaccine and the spread of multiresistant strains. The peptide P9 (FimH) from *Shigella flexneri* was used in this study to immunize *Gallus galus* Dekalb White galiform to produce and evaluate IgY (Immunoglobulin Y). Anti-P9 IgY obtained and isolated by polyethyleneglycol precipitation methods and affinity chromatography was evaluated for its reactivity by the immunological techniques Dot blot, Western blot and Flow cytometry. IgY anti-P9 was able to recognize the target antigen in the synthetic, denatured and native form of *Shigella flexneri* 5a M90T. The antibody obtained showed cross-reactivity against other strains of diarrheogenic bacteria, which can not be used for immunodiagnostic methods. On the other hand, these antibodies have great potential for use in passive immunity methods against *Shigella spp.*, And possibly serve as a basis for application enhancement against other diseases.

Key words: *Shigella flexneri*, synthetic peptide, FimH, immunoglobulin Y.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. RESULTADOS	14
3.1. ARTIGO 1	14
Publicado na revista Scientia Amazonia	14
3.2. ARTIGO 2	27
Aceito para publicação na revista Scientia Amazonia	27
3.4. ARTIGO 3	40
A ser submetido a revista HUMAN VACCINE AND IMMUNOTHERAPEUTICS	40
1. Introdução	42
2. Material e métodos	43
2.1. Aspectos éticos da pesquisa.....	43
2.2. Produção de anticorpos	44
2.3. Extração de anticorpos utilizando PEG	45
2.4. Purificação de anticorpos anti-peptídeo	45
2.5. Imunodeteção por Dot blot.....	46
2.6. Imunodeteção por Western Blot	46
2.7. Imunodeteção por Citometria de fluxo	47
3. Resultados e discussão	48
3.1. Obtenção de anticorpo	48
3.2. Reconhecimento do antígeno sintético	49
4. CONCLUSÕES	54
5. REFERÊNCIAS	55
ANEXO	56
Anexo I – Certificado de aprovação no Conselho de ética animal (CEUA)	56

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Estudo Multicêntrico Entérico Global (GEMS), *Shigella* está dentre os patógenos mais importantes associados à diarreia infantil. A doença causada por esse patógeno, pode progredir rapidamente para a forma mais grave da doença e levar a óbito. Por outro lado, a eficácia dos antibióticos recomendados pela OMS para o tratamento da forma grave da doença está em ameaça devido à disseminação de múltipla resistência antibiótica. (W.H.O., 2004; PORE et al., 2011; NUNES et al., 2012; MUTHUIRULANDI SETHUVEL et al., 2016).

Os diversos métodos de diagnóstico direcionados a doenças clínicas epidemiologicamente relevantes são importantes, mas a prevenção efetiva e segura é a melhor estratégia de intervenção em saúde coletiva. Dentre as ferramentas desenvolvidas para promover prevenção e proteção contra um determinado patógeno encontra-se as imunoglobulinas (Ig), mais conhecidas como anticorpos (Ac), empregadas também em testes de diagnóstico e tratamentos terapêuticos (HADDAR et al., 2016; KOTLOFF et al., 2017).

Os anticorpos são glicoproteínas encontradas no plasma e outros fluidos corporais de vertebrados, sendo produzidos por linfócitos B e empregados naturalmente pelo sistema imune do organismo afim de neutralizar patógenos virais e bacterianos. Isto ocorre através de uma interação com um antígeno, que corresponde a qualquer molécula que gera resposta ao sistema de defesa de um organismo. Ao se tratar de anticorpos, a imunoglobulina aviária tem ganhado atenção nas últimas décadas, principalmente a proveniente da gema de ovo de galinha (IgY), apresentada pela primeira vez no final da década de 1990 e que tardiamente surgiu como alternativa para o controle de doenças infecciosas. A eficiência desse anticorpo foi demonstrada através de profilaxia e tratamento terapêutico de diversas doenças como gastroenterite causada por rotavírus, candidíase, gastrite, doença celíaca, cólera, síndrome metabólica, fibrose cística, e também como anti-veneno de cobra e escorpião (RAHMAN et al., 2013; THU et al., 2017).

Alguns estudos já demonstraram o efeito positivo de IgY, contra colonização intestinal animal por alguns patógenos (*C. jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Eimeria*) e a estabilidade frente as enzimas digestivas, ressaltando sua utilização em imunização passiva contra vírus e bactérias presentes no sistema digestivo de camundongos e recém-nascidos humanos (LI et al. e MÜLLER et al., 2015; THIBODEAU et al., 2017).

Dessa maneira, este trabalho objetiva produzir anticorpos IgY em gema de ovo de galinha contra o patógeno *Shigella spp.* e avaliar sua capacidade específica *in vitro*, mediante prévia submissão ao Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEUA-UFAM).

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir e avaliar imunoglobulinas Y contra antígenos de *Shigella spp.*

2.2 Objetivos específicos

- Imunizar aves *Gallus galus* com e Peptídeo-9 (Fim-H)
- Avaliar a produção de anticorpos policlonais das aves;
- Avaliar *in vitro* a sensibilidade e especificidade dos anticorpos e anti-P9..

2. RESULTADOS

3.1. ARTIGO 1

Publicado na revista Scientia Amazonia



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
 Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
 ISSN:2238.1910

Tecnologia IgY: eficiente alternativa aos anticorpos convencionais de mamífero¹

Jeniffer Clorives Lopes Batista², Aline Rubens de Souza³, Paula Taquita Serra⁴, Daniele Souza de Farias⁵, Késsia Caroline Souza Alves⁶, Maria Edilene Martins de Almeida⁷, Juliane Correa Glória⁸, Diogo Pereira de Castro⁹, Luís André Morais Mariúba¹⁰

Resumo

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

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

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

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

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

² Mestranda em Biotecnologia/UFAM, Manaus-AM. E-mail: jeniffer.clorives@gmail.com

³ Mestre em Biotecnologia, ILMD/ Fiocruz Amazônia, Manaus-AM, E-mail: alineerubens@gmail.com

⁴ Doutoranda em Biologia Celular e Molecular IOC/ILMD. Rio de Janeiro, RJ. E-mail: paulatakita@hotmail.com

⁵ Bolsista LMD/Fiocruz Amazônia. Email: dandan.farias@gmail.com

⁶ Doutoranda em Biotecnologia UFAM, Manaus-AM, Brasil. E-mail: kessiafenty@gmail.com

⁷ Doutoranda em Biologia Celular e Molecular IOC/ILMD, Rio de Janeiro, RJ, E-mail: edilene_martins19@hotmail.com

⁸ Doutoranda em Biotecnologia UFAM, Manaus, AM, E-mail: juliane.correa.biotec@gmail.com

⁹ Dr. em Biotecnologia, ILMD/ Fiocruz Amazônia, Manaus, AM, E-mail: diogocastrop@gmail.com

¹⁰ Biotecnologista, ILMD/Fiocruz Amazônia, Manaus, AM, E-mail: lamariuba@hotmail.com



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
 Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
 ISSN:2238.1910

1. Introdução

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

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

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

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

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

2. Metodologia

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

3. Imunoglobulina Y

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



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
 Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
 ISSN:2238.1910

3.1. Características estruturais, físico-químicas e funcionais

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

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

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

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

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

3.2 Produção de anticorpos policlonais em aves

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



Biotecnologia

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

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

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

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
ISSN:2238.1910

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

3.3. Isolamento de IgY

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

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

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



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
 Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
 ISSN:2238.1910

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

4. Versáteis aplicações

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

4.1 Neutralização

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

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

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

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



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
 Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
 ISSN:2238.1910

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

4. Versáteis aplicações

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

4.1 Neutralização

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

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

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

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



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
 Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
 ISSN:2238.1910

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

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

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

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

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



Biotecnologia

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

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

4.5 Citotoxicidade

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

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

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
ISSN:2238.1910

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

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

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

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



Biotecnologia

anticorpos comestível em alternativa aos antibióticos convencionais.

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

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

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
ISSN:2238.1910

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

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

4.7 Desafios atuais

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

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



Biotecnologia

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

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

5. Considerações Finais

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

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

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B44-B55, 2019
Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>
ISSN:2238.1910

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

Divulgação

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

Referências

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



Biotecnologia

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



Biotecnologia

- swine production: A review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 2015, v. 6, n. 1, p. 1–10.
- MEJIAS, A. et al. Development and clinical applications of novel antibodies for prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. **Vaccine**, 2016, v. 35, p. 3. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.026>
- MIAN, I. et al. Function and properties of antibody binding sites. *Journal of Biology Molecular*. 1991; v. 217, n. 1, p. 133–51.
- MÜLLER, S. et al. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutrition Journal**, 2015, v. 14, n. 1, p. 1–7.
- MUNHOZ, L. S. et al. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, 2014, v. 44, n. 1, p. 153–160.
- PAULY, D. et al. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, 2011, v. i, n. 51, p. 2–7.
- REVATHY, J. et al. In vitro evaluation of the efficacy of chicken egg yolk antibodies (IgY) generated against *Propionibacterium acnes*. **International Journal of Cosmetic Science**, 2014, v. 36, n. 1, p. 68–73.
- SHENG, Y. et al. Production of chicken yolk IgY to sulfamethazine: comparison with rabbit antiserum IgG. **Food and Agricultural Immunology**, 2015 v. 26, n. 3, p. 305–316, <http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2014.914468>
- SHI, H. et al. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017, v. 95, p. 1734–1742.
- SUDJARWO, S.A. ET AL. Potencial da imunoglobulina de gema de ovo de galinha (IgY) específica como imunoterapia à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. **J Adv Pharm Technol Res**. 2017, v.8, p. 91-96. Doi: <http://dx.doi.org/10.4103/japtr.JAPTR.167.16>
- TAN, S. H. et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **Journal of Immunological Methods**, 2012, v. 380, n. 1–2, p. 73–76.
- YAMAZAKI, T. et al. Neutralizing Antibodies Induced by Gene-Based Hydrodynamic Injection Have a Therapeutic Effect in Lethal Influenza Infection. **Frontiers in Immunology**. 2018, v. 9. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/Fimmu.2018.00047>
- VEGA, C. et al. Egg Yolk IgY Antibodies: a Therapeutic Intervention Against Group A Rotavirus in Calves. **HHS Public Access Author manuscript**, 2015, v. 344, n. 6188, p. 1173–1178.
- THOMSEN, K. et al. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, 2016, v. 12, n. 7, p. 1690–1699.
- WILLER, E. DA M.; LIMA, R. DE L.; GIUGLIANO, L. G. In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. **BMC microbiology**, 2004, v. 4, p. 18–28.
- XU, J. J. et al. Protection efficacy of multivalent egg yolk immunoglobulin against *Eimeria tenella* infection in Chickens. **Iranian Journal of Parasitology**, 2013, v. 8, n. 3, p. 449–458.
- XU Y, Selerio-Poely T, Ye X. Efeitos clínicos e microbiológicos do anticorpo da gema de ovo contra *Porphyromonas gingivalis* como adjuvante no tratamento da periodontite crônica moderada a grave: um ensaio clínico randomizado controlado por placebo. **J Periodontal Implant Sci**. 2018. <https://doi.org/10.5051/jpis.2018.48.1.47>
- XU, L. et al. Immunomodulatory effects of chicken egg yolk antibodies (IgY) against experimental *Shewanella marisflavi* AP629 infections in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). **Fish and Shellfish Immunology**, 2019, v. 84, p. 108–119. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.073>
- XUEMEI, J. et al. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) using a human mycoplasma protein, **Journal of Chromatography B**, 2016, v. 1012–1013, p. 37–41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.012>.
- ZHANG, X. et al. IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biological Reviews*. 2019, v. 92, n. 4, p. 2144–2156. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12325>

3.2. ARTIGO 2

Aceito para publicação na revista Scientia Amazonia

Disenteria bacilar: uma ameaça à saúde pública global¹

Parte da Revisão de Dissertação de Mestrado do primeiro autor em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas (UFAM)¹

Jeniffer Clorives Lopes Batista² - Mestranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Avenida Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 1200- Coroado I, CEP: 69076-005. Manaus-AM, Brasil. E-mail: jeniffer.clorives@gmail.com

Daniele Souza de Farias³-Bolsista do Instituto Leônidas e Maria Deane-LMD/Fiocruz Amazônia. E-mail: dandan.farias@gmail.com

Rarissa de Oliveira e Silva⁴-Mestranda na Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas (PPGIBA-UFAM). Avenida Brasil, 4365. CEP: 21040360. Rio de Janeiro-RJ. Brasil. E-mail: bm.rarissa@gmail.com

Késsia Caroline Souza Alves⁵-Doutoranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Avenida Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 1200- Coroado I, CEP: 69076-005. Manaus-AM, Brasil. E-mail: kessiafenty@gmail.com

Maria Edilene Martins de Almeida⁶-Doutoranda na Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC- ILM). Avenida Brasil, 4365. CEP: 21040360. Rio de Janeiro-RJ. Brasil. E-mail: edilene_martins19@hotmail.com

Juliane Correa Glória⁷-Doutoranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Avenida Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 1200- Coroado I, CEP: 69076-005. Manaus-AM, Brasil. E-mail: juliane.correa.biotec@gmail.com

Diogo Pereira de Castro⁸-Dr. em Biotecnologia, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia. Rua Teresina, 476. Adrianópolis. CEP: 69057-070. Manaus-AM. Brasil. E-mail: diogocastrop@gmail.com

Luís André Morais Mariúba⁹-Biotecnologista do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) -Fiocruz Amazônia. Rua Teresina, 476. Adrianópolis. CEP: 69057-070. Manaus-AM. Brasil. E-mail: lamariuba@hotmail.com

Resumo

Shigella é uma das principais causas de disenteria em todo o mundo, infectando milhões de pessoas a cada ano, principalmente crianças abaixo dos cinco anos de idade em populações de baixa renda. A elucidação do processo infeccioso deste patógeno tem sido investigada há anos, através de estudos in vitro/vivo que buscaram compreender os eventos relacionados a patogênese. Devido a surgimento de estirpes multiresistentes a antibióticos, estudiosos tem se empenhado na busca por uma alternativa profilática, segura, eficaz e de ampla cobertura. Neste trabalho, encontram-se características gerais do patógeno, o status epidemiológico atual, métodos utilizados para o diagnóstico e também para tratamento dos casos de infecção leve e grave, assim como novas alternativas de prevenção/control de infecções.

Palavras-Chave: shigelose; epidemiologia; prioridade; patógeno entérico; Gram-negativo;

Bacillary dysentery: a global public health problem. Shigella is one the leading causes of dysentery in the world, infecting millions of people each year, especially children under five in low-income populations. The elucidation of the infectious process of this pathogen has been investigated for years. Though in vivo/vitro studies that sought understand the events related to pathogenesis. Due to the emergence of multiresistant strains to antibiotics, scholars have been engaged in the search for a prophylactic, safe, effective and broad coverage alternative. In the work, we present general characteristics of the pathogen, current epidemiological status, methods used for diagnosis and also for treatment of cases of mild and severe infection, as well as new alternatives for prevention/control of infections.

Keywords: shigellosis; epidemiology; priority; enteric pathogen; Gram-negative;

1. Introdução

A doença diarreia é causada por diversos agentes etiológicos que englobam vírus, bactérias e parasitas. As doenças diarreicas são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo as responsáveis por grandes índices de óbitos durante a primeira infância, com uma estimativa de 1,3 milhões mortes por ano (MOKOMANE et al., 2017). Os principais agentes etiológicos dessa síndrome são os patógenos entéricos gram-negativos, estando *Shigella* dentre os que requerem controle emergencial (KOTLOFF et al., 2013; NUNES et al., 2012; W.H.O., 2004). Segundo a OMS, os principais causadores de diarreia em crianças jovens em ordem decrescente foram: *Shigella spp.*, *Rotavirus/adenovirus 40/41*, *EPEC ST- positivo*, *Cryptosporidium spp.* e *Campylobacter spp.* (MOKOMANE et al., 2017). A shigelose atinge cerca de 165 milhões de pessoas por ano, havendo aproximadamente 1 milhão de óbitos. Apesar de acometer pessoas independentemente da idade, a maioria dos episódios ocorrem principalmente nos países em desenvolvimento, afetando de maneira acentuada crianças de idade inferior a cinco anos. (MUTHURULANDI et al., 2016; NUNES et al., 2012; PORE et al., 2011; RAM et al., 2008; W.H.O., 2004). De modo geral, a shigelose não só resulta em altos índices de mortalidades como também em sequelas que afetam a longo prazo o crescimento e desenvolvimento cognitivo das crianças sobreviventes à infecção.

Neste contexto, esta revisão descreve características gerais relacionados ao agente etiológico *Shigella*, sua patogenia, mecanismos celulares e moleculares, assim como os métodos atualmente empregados para o diagnóstico e tratamento.

2. Metodologia

Esta revisão da literatura levanta as principais informações sobre o patógeno *Shigella* e os principais desafios relacionados à problemática, contextualizando com estudos atuais. As consultas bibliográficas foram realizadas por meio de bancos de dados *Scopus*, *Pubmed*, *Science Direct* e Portal de periódicos CAPES. O período das publicações foi de 1994 a 2018, cujas palavras-chave foram: “shigelosis”, “bacillary dysentery” e “microbial resistance”.

3. *Shigella spp.*

O microrganismo *Shigella* foi descoberto em 1898 em um surto de disenteria no Japão, descrito por Kiyoshi Shiga, que inicialmente denominou o patógeno como *Bacillus dysenteriae* devido à relação com *Bacillus coli*, a atual *Escherichia coli*. Posteriormente, Simon Flexner, Mark Boyd e Carl Somme descreveram patógenos similares no final do século XX e em homenagem ao descobridor nomearam o gênero com o termo *Shigella* (BAKER et al., 2014; NYOGI et al., 2005; SASAKAWA et al., 2010). As dimensões celulares são de 0,4 a 0,6 micrômetros de diâmetro e 1 a 3 micrômetros de comprimento, e caracteriza-se como uma célula bacteriana Gram-negativa e imóvel, apesar de não formar biofilme nem expressar adesina. Possui a forma de bastonete, é desprovido de esporo e cápsula, sendo um anaeróbio facultativo e enteroinvasivo (THE et al., 2016; ZAIDI; ESTRADA-GARCÍA, 2014).

Atualmente o gênero é constituído por quatro distintas espécies: *Shigella dysenteriae* (Grupo A:15 sorotipos), *Shigella flexneri* (Grupo B:14 sorotipos e subtipos), *Shigella Boydii* (Grupo C:20 sorotipos) e *Shigella sonnei* (Grupo D) (BELD; REUBSAET, 2012; LIVIO et al., 2014; PUZARI; SHARMA; CHETIA, 2017; LIU et al, 2012). A classificação por sorogrupos acima é uma maneira de diferenciar as espécies e suas variações correspondentes a partir dos componentes da cadeia lateral do antígeno O, um componente de polissacarídeo presente no LPS encontrado na membrana externa de todas as bactérias Gram-negativas (PHALIPON; SANSONETTI, 2007; SCHROEDER; HILBI, 2008). Dentre todas, *S. sonnei* é a única a apresentar reação positiva para β -D-galactosidase e ornitina descarboxilase, o que a difere das demais espécies do gênero (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2015).

4. Epidemiologia

Nos últimos 30 anos, a mortalidade associada a *Shigella* caiu consideravelmente, e isso se deve principalmente as contribuições da redução de desnutrição global. Apesar disso, a doença foi classificada pelo “Global Burden of Disease Consortium” no ano de 2015 como a segunda principal causa de mortes diarreicas no mundo (KOTLOFF et al., 2013 e 2017). Cerca de 98% dos óbitos anuais associados a *Shigella* correspondem aos países de média e baixa renda, com cerca de 30% de mortes infantis em 2016. (KOTLOFF et al., 2017). Cerca de 5% dos episódios globais são causados por *Shigella dysenteriae*, 5% por *Shigella boydii*, 23% *S. sonnei* e 65% por *Shigella flexneri*, com uma taxa de mortalidade de 75%. (LAUNAY et al., 2017; MUTHUIRULANDI et al., 2016; PUZARI et al., 2017).

As infecções causadas pela espécie *S. flexneri*, geralmente predominam em países em desenvolvimento, principalmente em populações de baixa renda, enquanto casos associados a *Shigella sonnei* são comuns em populações de alta renda. Nos Estados Unidos, *Shigella sonnei* é a terceira causa de gastroenterite e recentemente causou um surto estendido de junho de 2015 a junho de 2016 em moradores de rua (HINES et al., 2017; MUTHUIRULANDI et al., 2016).

S. dysenteriae é a espécie mais virulenta que contribui de forma mínima para a shigelose endêmica, apesar de ter potencial para provocar epidemias e pandemias avassaladora, principalmente em populações que possuem saneamento básico e hábitos de higiene pessoal precários. No último século, quatro pandemias foram ocasionadas por *S. dysenteriae*, ocorridas na África Oriental e Ocidental, no sul da Ásia e na América Central. As estirpes tiveram amplo espectro de resistência a antibióticos, atingindo cerca de 30% da população em todas as faixas etárias (KOTLOFF et al., 2013 e 2017; LEVINE et al., 2012; LIU et al., 2012). Apesar disso, o sorogrupo *S. dysenteriae* em conjunto com *S. boydii* tem causado poucos casos da doença em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente (LIMA et al., 2015).

No Brasil, infecções causadas por *S. sonnei* estão associadas a regiões socioeconomicamente desenvolvidas como o Sudeste, enquanto que infecções causadas pelo sorogrupo *S. flexneri* ocorreram com maior frequência em regiões em desenvolvimento socioeconômico como o Norte e Nordeste do país (SOUSA et al., 2010). Cerca de 90% das infecções foram causadas por *S. sonnei* em Minas gerais durante o outono e verão, e 80% das infecções foram causadas por *S. flexneri* no Piauí, frequentemente em crianças com idade inferior a 24 meses (NUNES et al., 2012). A região norte do país notifica poucos casos de infecção pelo patógeno, mas *S. flexneri* foi frequente nos isolados de fezes provenientes de crianças com diarreia, observados no Pará (*S. flexneri 2a*), Porto Velho (3ª causa de diarreia infantil). Em Manaus, um estudo envolvendo 1339 crianças com diarreia, verificou que de 30 isolados de *Shigella* 60% corresponderam a *S. flexneri*, 22% a *S. sonnei* e 6% a *S. boydii* e *S. dysenteriae* em crianças de 0-10 anos de idade, residentes à periferia da cidade (BASTOS; LOUREIRO; HOFER, 2012; CRUZ et al., 2014; ORLANDI et al., 2006).

A cobertura de serviços de saneamento básico, como água potável e tratamento de esgoto, geralmente são ausentes em populações de baixa renda, tornando-as mais vulneráveis a doenças. Cerca de 90% da população das regiões norte e nordeste do país não possuíam esgoto coletado até o ano de 2011, o que expõe a população a diversos patógenos e colabora como ameaça à saúde coletiva. Manaus, possui atualmente um sistema de coleta e tratamento de esgoto sanitário em operação desde o ano de 2012, que abrange a parte central da cidade, conjuntos habitacionais e residenciais. E a estimativa média é de que em 30 anos a cidade tenha 60% do esgoto coletado e tratado, segundo a Manaus Ambiental (MANI; WIERZBA; WALKER, 2016; HOLT et al., 2012; SACK et al., 1994; WHO, 2004). Desta forma compreende-se que as infecções se incidem em ambas as populações, socioeconomicamente desenvolvidas e em desenvolvimento, mas diferem quanto a espécie infectante prevalente.

5. Shigelose

A shigelose é uma doença gastrointestinal inflamatória aguda causada pela enterobactéria *Shigella*, que afeta adultos, eventualmente, crianças de zero até dez anos de idade, afetando principalmente crianças com idade inferior a cinco anos, de maneira acentuada em países em desenvolvimento socioeconômico (MANI; WIERZBA; WALKER, 2016; SANGEETHA et al., 2014). A infecção pode ocorrer através de indivíduos

infectados, moscas, água e alimentos contaminados, com uma baixa dose infecciosa de 10 a 200 células bacterianas por via fecal-oral. Diante disto, a prevenção primária desta doença deve se basear no fornecimento de água potável e métodos de saneamento básico, em conjunto com o desenvolvimento de melhoria em higiene pessoal e alimentar (GERMANI; SANSONETTI, 2006; MANI et al., 2016; OJHA et al., 2013).

O período de incubação do patógeno no organismo hospedeiro varia de um a quatro dias, mas a diarreia aquosa manifesta-se geralmente cerca de 48 horas após a infecção, com cerca de vinte evacuações por dia, tendo a doença uma duração de até oito dias. A doença manifesta-se inicialmente como uma diarreia aquosa e leve, podendo evoluir rapidamente para uma disenteria aguda também conhecida como disenteria bacilar, caracterizada pela presença de muco e sangue nas fezes do indivíduo infectado. A sintomatologia da doença é variável e depende tanto da imunocompetência do organismo hospedeiro quanto da espécie infectante, manifestando-se através de cólicas intestinais e fezes sanguinolentas. (BASTOS e LOUREIRO, 2010; CUNHA et al., 2017; KOTLOFF et al., 1999; SANGEETHA et al., 2014; RAM et al., 2008). A shigelose pode ser causada por qualquer uma das quatro espécies descritas, por isso o monitoramento epidemiológico global é importante para o direcionamento de estudos que buscam o desenvolvimento de alternativas profiláticas e terapêuticas.

6. Mecanismo de patogênese

O modelo de mecanismo celular da patogênese de *Shigella*, atualmente bem estabelecido, deriva de diversos estudos *in vitro/vivo* envolvendo diferentes tipos celulares como células epiteliais, macrófagos, monócitos e fibroblastos; assim também como modelos de infecção animal utilizando murinos e leporídeos, que colaboraram bastante para avaliação das respostas imunes do hospedeiro e compreensão ação do patógeno (PARSOT et al., 2005).

Para estabelecer com sucesso a infecção no intestino, o patógeno deve evadir as barreiras do hospedeiro, que são as secreções gástricas e o ácido clorídrico do estômago e a bile no intestino. O ácido clorídrico, juntamente com as secreções gástricas, reduz o pH do estômago para 3 e destroem a maioria das bactérias que ali chegam, mas alguns entéricos Gram-negativos como *Shigella*, desenvolveram mecanismos que permitem sua sobrevivência no local (MERRITT et al., 2009; SISTRUNK et al., 2016). A bile é um componente essencial da digestão e absorção de nutrientes no intestino, sendo composta por vários elementos como proteínas, sais minerais, lipídios, vitaminas e carboidratos. Dentre eles, os sais biliares são importantes para solubilizar, digerir e absorver lipídios e vitaminas lipossolúveis. Esses sais possuem atividade bactericida, mas patógenos entéricos como bactérias Gram-negativas resistem a essa atividade e os utilizam como sinal de localização para regular a expressão gênica de seus fatores de virulência. (NICKERSON et al., 2017; POPE et al., 1995).

Apesar dos grandes avanços na compreensão dos mecanismos celulares que *Shigella* utiliza para sua sobrevivência, pouco se conhece de fato sobre como a bactéria atinge com sucesso o epitélio intestinal, embora o mecanismo de invasão e as respostas imunes do hospedeiro tenham sido bastante explorados. *Shigella*, ao chegar ao cólon utiliza as células M como porta de entrada para o epitélio intestinal, se transloca para o tecido linfóide e entra em contato com as células dendríticas e os macrófagos residentes, o que resulta em piroptose destas células e liberação de grandes quantidades de IL-1 β e IL-18, citocinas inflamatórias (ARIZMENDI et al., 2016). As citocinas (IL-1 β e IL-18) ativam o processo inflamatório recrutando células polimorfonucleadas (PMN) para o local, o que ocasiona a destruição da integridade do tecido intestinal. Em concordância com os tais fatos, estudos *in vivo* utilizando murinos infectados com *Shigella* e a proteína efetora ipaH7.8 por via intranasal mostraram que a piroptose mediada por esse efetor é essencial para o escape do macrófago, e a morte de macrófagos um dos registros para rastreamento da infecção (ARIZMENDI et al., 2016; ASHIDA et al. 2015; SASAKAWA et al., 2015).

Ao ser fagocitada pelo macrófago, *Shigella* destrói o fagossomo intracelular, ativa o SST3, se adere à célula epitelial, e libera proteínas efetoras (IpaA-IpaD) que atuam no citoesqueleto da célula polimerizando actina. A bactéria então é englobada e se replica no interior do citoplasma da célula hospedeira. O patógeno dissemina-se para as células adjacentes usando uma calda de actina, sendo essa motilidade dependente da localização da proteína de virulência autotransportadora IcsA, na superfície bacteriana. A cardiopilina, um fosfolípido que reside nas membranas de *S. flexneri*, é essencial na membrana interna para apropriada

divisão celular e favorecer a apresentação adequada de IcsA na superfície da membrana externa (ROSSI et al., 2017; ARIZMENDI et al., 2016; SISTRUNK et al., 2016; BROTCKE et al., 2014).

7. Mecanismos de Virulência

O genoma de *Shigella* foi sequenciado e usado para descobrir a persistência, epidemiologia global e regional das espécies, o qual revelou que *S. flexneri* é composta por várias linhagens filogeneticamente distintas e que mantém níveis de diversidade semelhantes à *S. sonnei*, no entanto é muito mais antiga e diversa que essa (CONNOR et al., 2015; CHATTAWAY et al., 2017; THE et al., 2016).

Os mecanismos que o patógeno utiliza para se adaptar ao cólon intestinal e burlar o sistema de defesa do hospedeiro provêm de mecanismos de regulação e expressão gênica, um fator que favorece a patogênese de *Shigella* a torna um patógeno altamente adaptado ao organismo humano. O genoma de *Shigella flexneri*, modelo da maioria dos estudos, é constituído de um cromossomo circular único (200 pseudogenes e centenas de elementos transponíveis) e um plasmídeo de virulência de 220 kb, o qual possui uma região que concentra genes fundamentais para a invasão celular (FRIS et al., 2016; PEDRON et al., 2003). O cromossomo contém ilhas de patogenicidade como a ilha SHI-1, a qual contém genes de virulência que induzem o acúmulo de fluidos intestinais e degradação do muco intestinal. Além desses genes, também se encontram no cromossomo genes que detectam mudanças de temperatura e pH no organismo hospedeiro e que regulam positivamente e negativamente genes plasmidiais, *VirF*, *VirB* e *IcsA*. (SCHROEDER et al., 2008). No cromossomo e plasmídeo há duas ORF's reguladas por ferro que codificam duas enterotoxinas fundamentais para patogênese de *Shigella*, a enterotoxina Shet-1 que está relacionada com a diarreia aquosa, e Shet-2 que desempenha função de enterotoxina e também de reguladora de secreção da citocina inflamatória IL-8 em células infectadas (SCHROEDER et al., 2008).

O plasmídeo dispõe também de ilhas genômicas adquiridas evolutivamente por transferência horizontal de genes através de bacteriófagos. Uma dessas ilhas concentra a maioria dos genes importantes para *Shigella*, e ela é descrita como ilha de patogenicidade (PAI). Esta ilha contém genes de ativação e regulação transcricionais (*VirF* e *VirB*), genes associados a montagem do Sistema de Secreção Tipo III (SST3), genes de invasão (*Ipa*), genes de chaperonas (*Ipg*) e genes de disseminação (*Ics*) (HU et al., 2015; POPE; et al., 1995).

Os genes *VirF*, *VirB*, *IcsA/VirG* destacam-se sobre os demais por estarem envolvidos nas etapas essenciais à cascata de eventos regulatórios inerentes a patogênese de *Shigella*. *VirF* é o gene de um regulador de transcrição primário, enquanto *VirB* é gene de um regulador de transcrição secundário, e *IcsA/VirG* relacionam-se com a adesão e propagação celular da bactéria. (GIANGROSSI et al., 2017; PARSOT, 2005; PEDRON et al., 2003). O locus *mxi-spa* localizado na ilha de patogenicidade, contém genes que codificam proteínas estruturais do Sistema de Secreção Tipo III (SST3), um sistema que secreta proteínas Ipas essenciais para invasão de células epiteliais e início do ciclo infeccioso (BURKINSHAW et al., 2014; HU et al., 2015; POPE et al., 1995).

Tal sistema secretor, composto por mais de 50 proteínas estruturais, é indispensável para a patogênese, motilidade e simbiose bacteriana, pois é empregado por várias bactérias Gram-negativas na transferência de proteínas efectoras para o citoplasma de células eucarióticas. Apesar de montado e exposto na membrana da bactéria, ele só é ativado após o contato com a célula epitelial, liberando mais de 30 efetores para iniciar a patologia (CORNELIS, 2006; CHATTERJEE et al., 2013; HU et al., 2015; IZORÉ et al., 2011; KAUR, PORTALIOU et al., 2016). Esse sistema libera através de seu canal secretório cerca de 30 proteínas, como as translocadoras IpaB-IpaD, as efectoras IpaA e IcsB e ativadoras de transcrição *VirB* e *MxiE*, codificadas na ilha de patogenicidade (PARSOT, 2005). Nos últimos anos houve um progresso considerável na compreensão da estrutura do SST3 com importantes contribuições da Cristalografia de raios X, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Microscopia Eletrônica (ME) (WORRALL et al., 2011). Hu e colaboradores (2015) conseguiram apresentar a estrutura intacta do SST3 e seu complexo citoplasmático a partir de um modelo construído de minicélulas de *S. flexneri*, explorada por um detector de elétrons desenvolvido recentemente e uma tomografia crioelétrica de auto rendimento (crio-ET) para visualização das minicélulas hidratadas e congeladas.

Os *Ipa* genes codificam as proteínas invasivas IpaA, IpaB, IpaC e IpaD para favorecer a entrada de *Shigella* à célula epitelial. A invasiva IpaA, a partir de um complexo formado com a proteína citoesquelética vinculina, controla a montagem de filamentos de actina no citoesqueleto (PHALIPSON et al., 2007). A invasiva IpaB, além de ser requerida na penetração da bicamada lipídica da célula hospedeira, constrói canal

iónico na membrana interna para promover influxo de potássio e induzir a piroptose em macrófago (SANSONETTI et al., 2001), e está associada ao desaparecimento do Aparelho de Golgi, interferindo na fisiologia da célula hospedeira. A invasiva IpaC, complexada a IpaB é transportada pela agulha e inserida na membrana formando o poro para passagem de outros efetores, interagindo com proteínas associadas a filamentos de actina do citoesqueleto da célula hospedeira para indução de polimerização de actina. A invasiva IpaD está associada com a secreção e recrutamento de IpaB e IpaC (translocadores) para a ponta da agulha do SST3 (MACMICKING et al., 2017; YANG e HU et al., 2015).

Além desses, o plasmídeo contém genes que codificam as proteínas secretórias VirA, IpaH4.5, IpaH7.8, IpaH9.8 e outras. A proteína efetora VirA tem como função o rompimento da rede de microtúbulos da célula hospedeira, enquanto a proteína IpaH9.8 marca enzimas intracelulares (Gbps) com ubiquitina afim de fugir da destruição que essas enzimas realizam. Por isso alguns estudos recomendam a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) do gene *IpaH* como ferramenta de diagnóstico de gastroenterite aguda em crianças na Índia (AGGARWAL et al., 2016). A caracterização dos mecanismos de virulência torna compreensível o perfil da patogênese de *Shigella*, desde a infecção até o processo inflamatório característico.

A identificação precisa do patógeno é crucial para fins de vigilância, compreensão de quais organismos são mais prevalentes e em quais áreas, planejamento de medidas de prevenção específicas, estratégias de vacinação e o estabelecimento de tratamentos empíricos.

8. Vacina, Diagnóstico e Tratamento

Cerca de 90% dos isolados globais correspondentes a *S. flexneri* (sorotipos 2a, 3a e 6) e *S. sonnei*, logo o ideal seria uma vacina multivalente de máxima cobertura que incorpore todos os sorogrupos de *Shigella*, ou seja as quatro espécies, que em conjunto corresponderem a mais de cinquenta sorotipos diferentes (MANI; et al., 2016; ZHAO et al., 2017). Há uma vacina bivalente de *S. flexneri* e *S. sonnei* que é utilizada em Pequim, onde a resistência antimicrobiana é encontrada em cerca de 90% dos isolados de *Shigella*. No entanto, atualmente não há uma vacina licenciada e comercialmente disponível que seja eficaz, segura e multivalente que seja recomendada pela OMS, tampouco alguma alternativa terapêutica não antibiótica, (PUZARI et al., 2017; ZHAO et al., 2017). O que há atualmente, são 15 candidatos vacinais em diferentes fases de testes clínicos oriundos de diversas partes do globo, como Índia, Washington, Espanha, França, Coreia e Áustria possuem estudos com testes clínicos de fase 1. Itália e Suíça possuem estudos com testes clínicos de fase 2, enquanto os Estados Unidos é o único país a ter estudos com testes clínicos de fase 1, fase 2 e fase 3 em andamento, sendo os mais adiantados no desenvolvimento de uma vacina alternativa. A natureza dessas candidatas é baseada desde proteínas de membrana, antígenos fusionados, vesículas de membrana, proteínas do SST3, oligossacarídeos sintéticos a célula inteira de *Shigella* atenuada ou geneticamente modificada. Estima-se que 150 mil mortes possam ser evitadas globalmente até o ano de 2030 com o desenvolvimento de uma vacina multivalente contra *Shigella* (MANI et al., 2016; WALKER et al., 2017), sendo uma das prioridades em saúde pública mundial.

A identificação imediata do patógenos é necessária em contextos de possíveis surtos para a implementação de medidas eficazes de controle, sendo útil para o manejo de pacientes, particularmente aqueles com doença grave, persistente ou imunocomprometidos. Um dos principais desafios para o diagnóstico laboratorial de infecções diarreicas é que existem mais de 40 patógenos causadores de diarreia, as técnicas convencionais de detecção microbiológica exigem múltiplas etapas, sem contar com a necessária infraestrutura adequada e equipe devidamente capacitada (MOKOMANE et al., 2017). O diagnóstico convencional definitivo da shigelose é realizado diretamente através das fezes, a partir do isolamento do microrganismo em cultura, mas pesquisadores já descobriram, através de uma avaliação de ensaio de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), que este método identificou quase o dobro de casos atribuíveis a *Shigella*, comparado ao método convencional (WALKER et al., 2016; PUZARI et al., 2017). O Instituto Pasteur também desenvolveu testes imunocromatográficos para diagnóstico rápido (TDRs) de *Shigella* direcionados para os sorogrupos *S. flexner 2a*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae*, com especificidades na faixa de 91-100%. Esses TDRs, já foram avaliados em diferentes amostras como cepas isoladas, esfregaços retais e fezes, em diferentes países como Vietnã e Chile e estavam em fase de industrialização, segundo Haddar e colaboradores (2017).

O método terapêutico direcionado para os casos de diarreia leve é a reposição de eletrólitos, como correção da desidratação. A terapia empregada, recomendada pela OMS, para os casos de disenteria é um tratamento empírico a partir da administração de antibióticos como ciprofloxacina (fluoroquinolonas), azitromicina e cefalosporina de terceira geração como método primário por promover baixa taxa de resistência antibiótica, e posteriormente, ampicilina e cotrimoxazol, como alternativa secundária. A antibioticoterapia reduz o risco de possíveis complicações e duração dos sintomas no organismo, estando atualmente, sob forte ameaça com os crescentes relatos descrevendo casos com bactérias multiresistentes em diversas regiões do globo como África, China, Chile e Índia (KOTLOFF et al., 2017; GONZALEZ-TORRALBA et al., 2018).

Pemica e colaboradores (2016), desenvolveram um estudo buscando rastrear 15 patógenos diferentes por meio da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para correlacionar a despecho clínicos utilizando amostras clínicas fecais. O tratamento padrão atualmente empregado em muitos países é tratar com antibióticos crianças que apresentem diarreia sanguinolenta e abster crianças que não apresentem esse quadro. O estudo constatou que a infecção por *Shigella* foi estatisticamente mais comum em crianças que apresentaram sangue nas fezes, não sendo semelhante para nenhum outro patógeno bacteriano. No estudo verificou-se que cerca de 219 crianças de um total de 586, não apresentaram fezes sanguinolentas, mas estavam infectadas e crianças com fezes com sangue não apresentaram aumento de mortalidade. Isto sugere que a metodologia recomendada pela OMS pode não ser completamente eficaz para o controle das infecções, visto que não houve associação estatisticamente significativa entre diarreia sanguinolenta e morte, mas acentuadamente entre desnutrição e morte. Isso tem sido discutido entre os estudiosos, pois essa exclusão pode colocar as crianças infectadas em risco maior, visto que inúmeras apresentam diarreia leve e a associação entre mortalidade é mais forte para diarreia relacionada a *Shigella* do que com somente disenteria, principalmente em crianças malnutridas (KOTLOFF et al., 2017; TICKELL et al., 2017).

Considerações Finais

A problemática relacionada a síndrome diarreica, especialmente causada por bactérias do gênero *Shigella*, tem impulsionado vários estudiosos a buscar desenvolver uma vacina eficaz e segura, como método de prevenção da doença, que apesar dos esforços ainda não está disponível. Considerando isto, e também o aumento do número de casos com bactérias resistentes aos antibióticos utilizados para o tratamento da doença, a busca por novas alternativas terapêuticas também se faz necessária em paralelo. Métodos de proteção contra patógenos através de imunidade passiva são pouco empregados e atualmente a Tecnologia IgY tem sido utilizada com sucesso contra diferentes patógenos, mas não há nada direcionado a *Shigella*. Estudos recentes, têm mostrado o efeito promissor de IgY contra patógenos bacterianos como diferentes estirpes de *Salmonella*, *Acinetobacter baumani*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Helicobacter pylori*, que tiveram crescimento celular afetado devido a ação neutralizante de IgY. Isto pode ser bastante promissor contra as doenças diarreicas de modo geral, pois os anticorpos de gema de ovo apresentam diversas vantagens, como método de obtenção menos invasivo, mais econômico e de alto rendimento.

Divulgação

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

Referências

AGGARWAL, P. et al. True Prevalence of Shigellosis in Indian Children with Acute Gastroenteritis: Have We Been Missing the Diagnosis?. **Journal of research in health sciences**, v. 16, n. 1, p. 11–6, 2016. Acesso

em: 01. Fev.2018.

ARIZMENDI, O.; PICKING, W. D.; PICKING, W. L. Macrophage Apoptosis Triggered by IpaD from *Shigella flexneri*. **Infection and immunity**, v. 84, n. 6, p. 1857–65, 1 jun. Acesso em: 15.Mar.2018.

ASHIDA, H.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C. *Shigella* Manipulates Host Immune Responses by Delivering Effector Proteins with Specific Roles. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 219, 7 maio 2015. 2015.00219. Acesso em:15. Mar.2018.

BAKER, K. S. et al. The extant World War 1 dysentery bacillus NCTC1: a genomic analysis. **The Lancet**, v. 384, n. 9955, p. 1691–1697, nov. 2014.

BASTOS, FC; LOUREIRO, ECB. Caracterização da resistência antimicrobiana de amostras de *Shigella* spp isoladas em Belém, estado do Pará, Brasil (1990-2000). **Rev Pan-Amazônica de Saúde**. v.1, n.4, p.71-74. 2010.

BELD, M.J.C.V.D.; REUBSAET, F.A.G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 6, p. 899-904, 2012.

BROTCKE, Z. A. et al. IcsA is a *Shigella flexneri* Adhesin Regulated by the Type III Secretion System and Required for Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, 2014. Acesso em: 11.Mar.2018.

BURKINSHAW, B. J.; STRYNADKA, N. C. J. Assembly and structure of the T3SS. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, p. 1649–1663, 1 ago. 2014. DOI: 10.1016/J.BBAMCR.2014.01.035. Acesso em: 11.Mar.2018.

CARLANDER, D.; STÅLBERG, J.; LARSSON, A. Chicken Antibodies. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 179–189, 18 jan. 1999. Acesso em: 26.Mar.2018.

CHATTAWAY, M. A. et al. Identification of *Escherichia coli* and Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 616–623, 2017. Acesso em: 01.Mar.2018.

CHATTERJEE, S. et al. Structure and Biophysics of Type III Secretion in Bacteria. **Biochemistry**, v. 52, n. 15, p. 2508–2517, 16 abr. 2013.

CONNOR, T. R. et al. Species-wide whole genome sequencing reveals historical global spread and recent local persistence in *Shigella flexneri*. **eLife**, v. 4, n. AUGUST2015, p. e07335, 4 ago. 2015. Acesso em: 13.Mar.2018.

CONROY, P. J. et al. Antibodies: From novel repertoires to defining and refining the structure of biologically important targets. **Methods**, 2017. Acesso em: 02.Jan.2018.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 811–825, nov. 2006. Acesso em: 20.Fev.2018.

CUNHA, F. DA et al. *Shigella* sp: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA. **Higiene Alimentar**, v. 31 n°264-2, p. 52–57, 2017. Acesso em: 30.Jan.2018.

CRUZ, C. B. N. et al. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

DA ROCHA, D. G. et al. Development of IgY antibodies against anti-snake toxins endowed with highly lethal neutralizing activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. October 2016, p. 404–412, 2017. Acesso em: 01.Fev.2018.

DELAHAUT, P. Immunisation – Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. **Methods**, v. 116, p. 4–11, 2017. Acesso em:15.Jan.2018.

DÍAZ, P. et al. IgY pharmacokinetics in rabbits: Implications for IgY use as antivenoms. **Toxicon**, v. 90, p. 124–133, 2014. Acesso em: 15.Mar.2018.

- DUAN, H. L. et al. Anti-Trimeresurus albolabris venom IgY antibodies: Preparation, purification and neutralization efficacy. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 4–9, 2016. Acesso em 01.Mar.2018.
- FIGUEIREDO, A. et al. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. **Scientific Reports**, 2015.
- FINK, A. L. et al. Dengue virus specific IgY provides protection following lethal dengue virus challenge and is neutralizing in the absence of inducing antibody dependent enhancement. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017.
- FRIS, M. E.; MURPHY, E. R. Riboregulators: Fine-Tuning Virulence in Shigella. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. January, p. 1–6, 2016. Acesso em: 01.Mar.2018.
- GERMANI, Y.; SANSONETTI, P.J. The genus Shigella. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E (eds). **The Prokaryotes: A handbook of the biology of bacteria**. New York: Springer Science + Business Media Inc. p. 99-116. 2006.
- GIANGROSSI, M. et al. VirF Relieves the Transcriptional Attenuation of the Virulence Gene icsA of Shigella flexneri Affecting the icsA mRNA–RnaG Complex Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 650, 18 abr. 2017. Acesso em: 01.Mar.2018.
- GONZÁLEZ-TORRALBA, A.; GARCÍA-ESTEBAN, C.; ALÓS, J. I. Enteropatógenos y antibióticos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 1, p. 47–54, 2018.
- HADDAR, C. et al. Tests de diagnostic rapide des shigelloses. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 110, n. 1, p. 1–8, 2017.
- HINES, J. Z. et al. Heavy precipitation as a risk factor for shigellosis among homeless persons during an outbreak - Oregon, 2015-2016. **Journal of Infection**, p. 1–6, 2017.
- HOLT, K.E. et al. Shigella sonnei genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. **Nature Genetics**, v. 44, p. 1056–1061, 2012.
- HU, B. et al. Visualization of the type III secretion sorting platform of Shigella flexneri. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 4, p. 1047–52, 27 jan. 2015.
- IZORÉ, T.; JOB, V.; DESSEN, A. **Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system** StructureCell Press, , 11 maio 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212611001390>>. Acesso em: 11 mar. 2018
- KAUR, K.; CHATTERJEE, S.; DE GUZMAN, R. N. Characterization of the Shigella and Salmonella Type III Secretion System Tip-Translocon Protein-Protein Interaction by Paramagnetic Relaxation Enhancement. **ChemBioChem**, v. 17, n. 8, p. 745–752, 15 abr. 2016.
- KOTLOFF, K. L. et al. Shigellosis. **The Lancet**, v. 6736, n. 17, 2017.
- KOTLOFF, K. L. et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 8, p. 651–666, 2013.
- LAUNAY, O. et al. Safety Profile and Immunologic Responses of a Novel Vaccine Against Shigella sonnei Administered Intramuscularly, Intradermally and Intranasally: Results From Two Parallel Randomized Phase 1 Clinical Studies in Healthy Adult Volunteers in Europe. **EBioMedicine**, v. 22, p. 164–172, 1 ago. 2017.
- LEVINE, M. M. et al. **The Global Enteric Multicenter Study (GEMS): Impetus, Rationale, and Genesis**. v. 55, n. Suppl 4, p. 215–224, 2012.
- LIVIO, S. et al. Shigella Isolates From the Global Enteric Multicenter Study Inform Vaccine Development.

Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 59, 2014.

LIU, L. et al. Global , regional , and national causes of child mortality : an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2151–2161, 2012.

MACMICKING, J. D. Bacteria disarm host-defence proteins. **Nature**, v. 551, n. 7680, p. 303–305, 2017.

MANAUS AMBIENTAL. Sistema de Coleta e Tratamento de Esgoto Sanitário. <http://www.manausambiental.com.br/esgotamento-sanitario>. Acesso em 05.02.2018.

MANI, S.; WIERZBA, T.; WALKER, R. I. Status of vaccine research and development for Shigella. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2887–2894, 3 jun. 2016.

MARTEYN, B.; GAZI, A.; SANSONETTI, P.J. *Shigella*: a model of virulence regulation in vivo. **Gut microbes**, v. 3, n. 2, p. 104-120, 2015.

MERRITT, M. E.; DONALDSON, J. R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1533–1541, 1 dez. 2009.

MOKOMANE, M. et al. The global problem of childhood diarrhoeal diseases: emerging strategies in prevention and management. **Therapeutic Advances in Infections Disease**. v.5, p. 29-43. Therapeutic Advances in Infectious Disease. Vol 5, Issue 1, pp. 29-43, dez. 2017. DOI: <https://doi.org/101177/2049936117744429>.

MUTHURILANDI SETHUVEL, D. P. et al. Update on: Shigella new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 8–18, 2016.

NICKERSON, K. P. et al. Analysis of Shigella flexneri Resistance, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile in Response to Bile Salts. **Infection and immunity**, v. 85, n. 6, p. e01067-16, 1 jun. 2017.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. **Journal of microbiology** (Seoul, Korea), v. 43, n. 2, p. 133-143, 2005.

NUNES, M. R. et al. Diarrhea associated with Shigella in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de pediatria**, v. 88, n. 2, p. 125-128, 2012.

OJHA, S. C. et al. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of Shigella species. **BioMed research international**, v. 2013, p. 412370, jan. 2013.

ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 507–517, 2006.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n. 1, p. 11–18, 1 nov. 2005.

PEDRON, T.; THIBAUT, C.; SANSONETTI, P. J. The Invasive Phenotype of *Shigella flexneri* Directs a Distinct Gene Expression Pattern in the Human Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 33878–33886, 5 set. 2003.

PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. J. Shigella's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 119-129, 2007.

POPE, L. M.; REED, K. E.; PAYNE, S. M. Increased protein secretion and adherence to HeLa cells by Shigella spp. following growth in the presence of bile salts. **Infection and immunity**, v. 63, n. 9, p. 3642–8, 1 set. 1995.

PORTALIOU, A. G. et al. Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 175–189, 1 fev. 2016.

PORE, D. et al. Outer membrane protein A (OmpA) of Shigella flexneri 2a, induces protective immune response in a mouse model. *PloS one*, v. 6, n. 7, p. e22663, 2011.

- PUZARI, M.; SHARMA, M.; CHETIA, P. Emergence of antibiotic resistant Shigella species: A matter of concern. **Journal of Infection and Public Health**, 2017.
- RAM, P. K. et al. Part II. Analysis of data gaps pertaining to Shigella infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 05, p. 577–603, 2008.
- ROSSI, R. et al. Cardiolipin Synthesis and Outer Membrane Localization Are Required for Shigella flexneri Virulence. **American Society for microbiology**, v.8, August. 2017.
- SACK, D.A et al. Is protection against shigellosis induced by natural infection with Plesiomonas shigelloides. **The Lancet**, v.343, p.1413-1415, 1994.
- SAEED, A. F. U. H. et al. Antibody engineering for pursuing a healthier future. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–28, 2017.
- SANGEETHA, A. V. et al. Clinical and microbiological profiles of shigellosis in children. **Journal of health, population, and nutrition**, v. 32, n. 4, p. 580–6, 2014.
- SANSONETTI, P. J. III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 3, p. G319-G323, 2001.
- SASAKAWA, C. A. New paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of Shigella. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B, v. 86, n. 3, p. 229-243, 2010.
- SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 134–156, 1 jan. 2008.
- SISTRUNK, J. R. et al. Survival of the Fittest: How Bacterial Pathogens Utilize Bile To Enhance Infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 819–36, 1 out. 2016.
- SOUSA, M.A.B. et al. Bacteriocin production by Shigella sonnei isolated from faeces of children with acute diarrhoea. **Apmis**, v. 118, n. 2, p. 125-135, 2010.
- TAI, A. Y. C. et al. A review of the public health management of shigellosis in Australia in the era of culture-independent diagnostic testing. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, v. 40, n. 6, p. 588–591, 2016.
- THE, H. C. et al. The genomic signatures of Shigella evolution, adaptation and geographical spread. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 235–250, 2016.
- TICKELL, K. D. et al. Identification and management of Shigella infection in children with diarrhoea: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Global health**, v. 5, n. 12, p. e1235–e1248, 1 dez. 2017.
- WALKER, R.; DULL, P. Combination vaccine strategies to prevent enteric infections. **Vaccine**, v. 35, n. 49, p. 6790–6792, 2017.
- WALKER, R. I. et al. Vaccines against Shigella and enterotoxigenic Escherichia coli: A summary of the 2016 VASE Conference. **Vaccine**, v. 35, n. 49, p. 6775–6782, 2017.
- WORRALL, L. J.; LAMEIGNERE, E.; STRYNADKA, N. C. Structural overview of the bacterial injectisome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 3–8, 1 fev. 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the art of new vaccines: research and development: Initiative for Vaccine**. Geneva, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. 2017 Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-T_NM_WHO.pdf. Acessado em: 25 de Julho de 2017.

YANG, S. C. et al. The roles of the virulence factor IpaB in *Shigella* spp. in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells. **Microbiological Research**, v. 181, p. 43–51, 2015.

ZAIDI, M. B.; ESTRADA-GARCÍA, T. *Shigella*: A Highly Virulent and Elusive Pathogen. **Current tropical medicine reports**, v. 1, n. 2, p. 81–87, 2014.

ZHAO, L. et al. An 11-year study of shigellosis and *Shigella* species in Taiyuan, China: Active surveillance, epidemic characteristics, and molecular serotyping. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 6, p. 794–798, 2017.

2.4. ARTIGO 3

**A ser submetido a revista HUMAN VACCINE AND
IMMUNOTHERAPEUTICS**

Avaliação de anticorpos IgY contra antígeno peptídico de *Shigella flexneri*¹

Resumo

Shigella é o patógeno Gram-negativo que causa a disenteria aguda, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos de idade em países de baixa e média renda, ocasionando milhares de óbitos por ano. Em decorrência disso, diversos estudiosos têm se empenhado com a busca por uma alternativa eficaz e segura, principalmente pela falta de uma vacina eficaz e a disseminação de cepas multirresistentes. O peptídeo P9 (FimH) de *Shigella flexneri* foi utilizado neste estudo, para imunizar galiformes *Gallus galus Dekalb White* afim de produzir e avaliar IgY (Imunoglobulina Y). A IgY anti-P9 obtida e isolada por métodos de precipitação com polietilenoglicol e cromatografia de afinidade, foi avaliada quanto a sua reatividade pelas técnicas imunológicas Dot blot, Western blot e Citometria de fluxo. IgY anti-P9 foi capaz de reconhecer o antígeno-alvo na forma sintética, denaturada e nativa de *Shigella flexneri* 5a M90T. O anticorpo obtido apresentou reatividade cruzada contra outras cepas de bactérias diarreogênicas, não podendo este ser utilizado para utilização em métodos de imunodiagnóstico. Por outro lado, estes anticorpos possuem grande potencial para utilização em métodos de imunidade passiva contra *Shigella spp.*, e possivelmente servir de base para ampliação na aplicação contra outras doenças.

Palavras-Chave: *Shigella flexneri*, peptídeo sintético, FimH, Imunoglobulina Y.

Abstract

Shigella is the Gram-negative pathogen that causes acute dysentery, affecting mainly children under five years of age in low- and middle-income countries, causing thousands of deaths per year. As a result, several scholars have been working to search for an effective and safe alternative, mainly due to the lack of an effective vaccine and the spread of multiresistant strains. The peptide P9 (FimH) from *Shigella flexneri* was used in this study to immunize *Gallus galus Dekalb White* galiform to produce and evaluate IgY (Immunoglobulin Y). Anti-P9 IgY obtained and isolated by polyethyleneglycol precipitation methods and affinity chromatography was evaluated for its reactivity by the immunological techniques Dot blot, Western blot and Flow cytometry. IgY anti-P9 was able to recognize the target antigen in the synthetic, denatured and native form of *Shigella flexneri* 5a M90T. The antibody obtained showed cross-reactivity against other strains of diarrheogenic bacteria, which can not be used for immunodiagnostic methods. On the other hand, these antibodies have great potential for use in passive immunity methods against *Shigella spp.*, And possibly serve as a basis for application enhancement against other diseases

Keywords: *Shigella flexneri*, synthetic peptide, FimH, Immunoglobulin Y.

1. Introdução

A shigelose, é uma doença diarreica infecciosa causada pelo enteropatógeno bacteriano Gram-negativo *Shigella* (YANG et al., 2018), o qual acomete principalmente crianças na faixa etária de zero a cinco anos de idade (PARAJULI et al., 2019), sendo a maioria dos casos ocorrentes em países de baixa e média renda (BONA et al., 2019). Fatores como condições precárias de saneamento básico e baixo nível socioeconômico, colaboram para a ocorrência de milhões de infecções e óbitos por ano, sendo considerada um problema global de saúde humana (PUZARI et al., 2018; MUTHUIRULANDI et al., 2016).

O gênero *Shigella* comporta os quatro grupos *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* (FRENCK et al., 2018; FARZAM et al. 2017), restritas a primatas, o que as diferenciam dos demais membros da família *Enterobacteriaceae*, a qual o gênero está inserido (MATTOCK et al., 2017; TRIKHA et al., 2017). A infecção pode se dar com uma baixa dose infecciosa de 10-100 células bacterianas, transmitida através de moscas domésticas, pessoa a pessoa, água e alimentos contaminados por via fecal-oral, podendo também ser transmitida sexualmente (BONA et al., 2019). As espécies de *Shigella* causam a disenteria bacilar em humanos por invasão de células epiteliais do intestino, multiplicação intracelular, disseminação para células adjacentes e consequentemente a indução de respostas inflamatória no intestino (KOESTLER et al., 2018; GOPAL et al., 2017).

A Organização mundial da Saúde (OMS) preconiza a utilização dos antibióticos apenas para os casos grave da doença, porém alguns estudiosos têm discutido que inclusão dos casos de diarreia leve pode colaborar com a redução da mortalidade associada a *Shigella* (THIKELL et al., 2017). Espécies de *Shigella* já foram susceptíveis a ampicilina, cloranfenicol, cotrimoxazol, ácido nalidíxico, no entanto já desenvolveram resistência a fluoroquinolonas, cefalosporinas e azitromicina. (PUZARI et al., 2018; TRIKHA et al., 2017). Considerando o desenvolvimento de resistência a antibióticos como parte da evolução de bactérias, a OMS declarou esta situação crítica como uma questão de crise global (PUZARI et al. 2018), indicando a necessidade de revisão imediata do tratamento recomendado para shigelose, principalmente quando o mesmo é realizado empiricamente. Apesar de existirem diversos estudos em fase de ensaios clínicos, até o momento não há nenhuma vacina segura, eficaz, licenciadas e disponível até o momento (FRENCK et al., 2018; NICKERSON et al., 2017).

Com a latência no desenvolvimento de novos antibióticos, há uma extrema necessidade de novas abordagens terapêuticas para infecções bacterianas, sendo o direcionamento a fatores de virulência uma estratégica abordagem para impedir a adesão bacteriana (MYDOCK-MCGRANE et al., 2017). A adesão bacteriana é facilitada pela ligação da lectina FimH a glicoproteínas manosiladas que revestem o epitélio. Esta lectina, específica para manose está localizada na extremidade distal do pili tipo 1, uma classe de microfibrila proteica altamente expressa em patógenos entéricos Gram-negativos (MYDOCK-MCGRANE et al., 2017).

Diversos estudiosos têm buscado uma solução para a shigelose, seja pela busca por novos antibióticos, vacinas ou através do desenvolvimento de anticorpos para utilização em métodos de imunidade passiva. A tecnologia IgY, ou seja, a produção e aplicação de imunoglobulinas Y (IgY), tem atraído bastante atenção devido as vantagens que proporcionam como baixo custo e maior rendimento produtivo na obtenção de anticorpos e aspecto positivo quanto a ética na utilização de animais, pois possibilita a redução de animais necessários e método não invasivo na produção anticorpos. Além disso, esses anticorpos possibilitam a redução de interferências em testes imunológicos por não apresentarem reatividade com as proteínas estafilocócica (A) e estreptocócicas (G), IgG de mamífero, proteínas do complemento e fatores reumatoides devido a falta de receptores Fc correspondentes.

A adesina bacteriana FimH é um fator de virulência e um atrativo alvo terapêutico para contornar as infecções bacterianas. A identificação de epítomos de célula B, da proteína FimH de *Shigella flexneri* e a avaliação da imunogenicidade do peptídeo sintético P9 (FimH) foram realizadas em trabalhos anteriores por nossa equipe. Esse estudo produziu e avaliou imunoglobulinas Y contra sintético peptídeo 9 (P9) de *Shigella flexneri*.

2. Material e métodos

2.1. Aspectos éticos da pesquisa

O presente estudo utilizou galinhas poedeiras *Dekalb White* (idade 71 dias) como modelo animal para a produção de anticorpos requeridas para pesquisas vinculadas ao projeto “Produção e avaliação de imunoglobulinas Y contra antígeno de *Shigella spp.*”, deferido pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas-CEUA-UFAM 003/2019 (Anexo 1).

2.2. Produção de anticorpos

Para a imunização de aves, foi utilizado o peptídeo sintético P9 (VSSAGGVA), correspondentes a epítomos imunogênicos do antígeno Fim-H de *Shigella flexneri* 5a M90T, obtidos em trabalhos anteriores por Pardo e colaboradores (2016). Inicialmente, o peptídeo foi acoplado em nanotubo de carbono (NTC) solubilizado e ativado como molécula carreadora, método o qual foi padronizado por nosso grupo sob patente sob o número INPI BR 10 2018 071933 5. A ativação do carreador NTC solubilizado e o acoplamento de peptídeos sintéticos foi promovida pelos agentes químicos EDAC [Cloroeto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] e NHS (N-hidroxissuccinimida).

Para a produção de anticorpos policlonais, as aves mantidas sob manutenção da empresa *EZscience* Biotecnologia, foram imunizadas sete vezes com um inóculo de 200 µg de peptídeo P9, o qual foi preparado com 50µL de peptídeo (5,5 mg/mL) acoplado em 200 µL de Nanotubo de carbono solubilizado e ativado (NTC) e 300 µL de Adjuvante de Freund, totalizando volume final de 500 µL. A amostra foi homogeneizada em por ciclos alternados de sonicação e vortequização gelo até aquisição de consistência não dispersante em água. Para a primeira imunização foi utilizado o Adjuvante Completo de Freund e Adjuvante Incompleto de Freud para as inoculações posteriores. Para o procedimento de imunização, as aves foram imobilizadas manualmente e inoculadas por via intramuscular, em quatro pontos distintos do músculo peitoral, com um buster quinze dias após a primeira imunização e coleta de gema de ovo hiperimune, após sete dias.

Tabela 1- Informações sobre os peptídeos utilizados para a imunização das aves.

Código	*Ag	Peptídeo	Posição	*P.M.	Carga	Atributo	Origem
P9	FimH	VSSAGGVA	133-140	646,69	0	Neutro	<i>S. flexneri</i> 5 str. 8401

*P.M.=Peso Molecular. *Ag=antígeno. **Fonte:** PARDO, 2016.

2.3. Extração de anticorpos utilizando PEG

Os anticorpos foram extraídos a partir da separação entre a fração proteica da gema de ovo e a fração lipídica utilizando o método de precipitação com polietilenoglicol (PEG) de Pauly e colaboradores (2011). Para isso, foi adicionado à gema PBS 1X (NaHPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl_2) equivalente a duas vezes o seu volume e 3,5% v/m de PEG-6000, com homogeneização durante 10 minutos em vórtex e posterior centrifugação a 4 °C por 20 minutos a 13.000xg. Após esse período, o pellet foi descartado e ao volume do sobrenadante foram adicionados 8,5% v/m de PEG, sendo o sistema submetido às condições de agitação e centrifugação, anteriormente descritas. Porém, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foram adicionados 10 mL de PBS-1X e 12% v/m de PEG, sendo submetido a condições de agitação e centrifugação já descritas, com descarte do sobrenadante. Após essa etapa, o pellet foi solubilizado em 800 μL de PBS1X com volume final completado para 1,2 mL. Após esse processo, o *pool* de anticorpos obtido foi submetido à diálise em PBS 0,1% a 4°C por 24 horas e posteriormente analisado eletroforéticamente em SDS-PAGE 15% e detecção de bandas proteicas utilizando *Coomassie Brilliant Blue*.

1.4. Purificação de anticorpos anti-peptídeo

Inicialmente, o peptídeo sintético P9 (5,5mg/mL) foi acoplado através de ligação covalente a resina cromatográfica *NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences)* conforme recomendações do fabricante, para a obtenção de uma matriz *sepharose-P9 (FimH)*. Após esse processo, a matriz cromatográfica foi lavada com 10 mL de água mili-Q e equilibrada com 10 mL de *Binding buffer* (Na_2HPO_4 0,02M pH 7,0). O *pool* de anticorpos (IgY total) obtidos no processo descrito no item 2.3, foi diluído a 1 μL /10 μL em *Binding buffer*, adicionado a sistema cromatográfico e mantido sob incubação durante 60 minutos a temperatura ambiente (T.A).

Posteriormente, a matriz foi lavada com 15 mL de *Binding buffer* e em seguida os anticorpos foram coletados em eluições de 450 μL de *Elution buffer* (Glicina-HCl 0,1 M pH 2,7) e 50 μL de *Neutralizer* (Tris 1M pH 9,0), utilizando o reagente de detecção de proteínas Bradford (SIGMA). Em seguida, a matriz foi lavada com 10 mL de *Binding buffer* e preservada com EtOH álcool etílico a 30% (EtOH). Posteriormente, o anticorpo foi concentrado 10X em coluna *Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter Devices* de 30 KDa conforme recomendações do fabricante (Mili-Pore). Posteriormente, os anticorpos foram novamente analisados por SDS-PAGE 15% para confirmação da obtenção de IgY's anti-P9.

1.5. Imunodeteccção por Dot blot

O reconhecimento dos anticorpos produzidos foi avaliado quanto ao reconhecimento do peptídeo sintético P9 imobilizados em membrana PVDF. Para isso, a membrana PVDF foi hidratada em tampão de *blot* (0,025 M Tris, 0,192 M glicina pH 8,5, 20% MeOH), MeOH (100%) e água destilada. Após hidratada, a membrana foi imobilizada com peptídeo P9 a 16 µg/mL em sistema de *trans-blot*. Em seguida, ao sistema foi adicionado 50 µL de uma solução de bloqueio PBS 1X a acrescida com 3% v/m de BSA (*Bovin Serum Albumin*) por 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, os primários IgY total obtidos foram diluídos em solução de bloqueio a 1 µL /100 µL e adicionados ao sistema e incubados durante 60 minutos a 37°C. Após esse período, a o sistema foi lavado com PBS 1X e o secundário anti-chicken cabra (peroxidase) a 1 µL /500 µL foi adicionado ao sistema e mantido sob incubação em condições descritas anteriormente. Após esse período, o sistema foi lavado com PBS 1X e para revelação do teste, foi utilizado o cromógeno DAB (Diaminobenzidina-3,3) durante 10 minutos. O parâmetro de detecção considerado, foi presença/ausência de precipitação de coloração marrom como indício de detecção positiva/negativa dos anticorpos produzidos.

2.6. Imunodeteccção por Western Blot

Os anticorpos produzidos foram avaliados, utilizando o método de imunodeteccção *Western Blo*, quanto a capacidade de reconhecimento do antígeno na forma denaturada. Afim disso, o extrato bacteriano de *Shigella flexneri* 5a M90T foi separado por SDS-PAGE 15% e eletrotransferido para uma membrana PVDF. Inicialmente, o gel de poliacrilamida e a membrana PVDF, foram devidamente hidratados, como descrito no item 2.6 e submetido a eletrotransferência no equipamento *transblotting* (BIO-RAD), a voltagem constante de 10 V por 60 minutos. Após a eletrotransferência, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio PBS-BSA 3% por 60 minutos a 37° C. Após esse período, a membrana foi lava com PBS 1X e o primário IgY total a 1 µL /100 µL foi colocado em contato com a membrana por 60 minutos a 37°C, sob agitação constante. Após esse período, a membrana foi lavada com PBS 1X e o secundário anti-chicken cabra (peroxidase) a 1 µL /5.000 µL foi colocado em contato com a membrana por 60 minutos a 37°C, sob agitação leve. Posteriormente, a membrana foi lava com PBS 1X e revelada com cromógeno DAB (10 mg/mL) durante 10 minutos e neutralização da reação com água destilada. A membrana foi seca a temperatura ambiente para análise da imunodeteccção, considerando os parâmetros descritos anteriormente (item 2.6).

2.7. Imunodeteção por Citometria de fluxo

Todas as cepas bacterianas utilizadas nesse estudo, foram provenientes da coleção bacteriológica do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ-AM), cedidas pela Prof. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA).

O reconhecimento da IgY anti-P9 foi avaliada quanto a reatividade com antígenos nativos, presentes na superfície celular de *Shigella flexneri* 5^a M90T, através de imunodeteção realizada em citometria de fluxo, utilizando como anticorpo de detecção o anti-chicken cabra adsorvido ao fluorocromo Alexa flúor 488. A reatividade da IgY anti-P9 foi também avaliada contra cepas heterólogas de *Escherichia coli*, EAEC (ATCC042), EIEC (ATCC1381), EHEC (CDC-EDL9933-171-0157:H3), ETEC (LT2871), ETEC (ST8), EPEC (ATCCE234869), DAEC (F1845), BL21 e Top-10. O painel do experimento constituiu-se de quatro condições: C1 (somente bactéria), C2 (bactéria + brometo), C3 (bactéria + anticorpo secundário) e C4 (bactéria + brometo+ anticorpos primário + anticorpo secundário).

Inicialmente, os microrganismos foram cultivados em meio líquido Luria Bertani (LB) a 37°C, durante 24 horas sob agitação constante. Após o cultivo, 50 µL de cada crescimento bacteriano foram distribuídos em tubos de citometria e centrifugadas a 14.000 rpm, durante cinco minutos para a obtenção de *pellet*. Em seguida, somente os tubos C3 e C4 foram incubados com 01 µL de brometo de etídeo (C₂₁H₂₀BrN₃) durante 30 minutos a T.A., sob privação de energia luminosa. Após esse período, os *pellets* foram lavados 02 vezes por centrifugação com PBS-1X (filtrado e autoclavado). Posteriormente, os tubos C4 foram incubados com primário 1 µL /100 µL IgY anti-P9 por 01 hora, seguido de lavagem por centrifugação. Após essa etapa, os tubos C3 e C4 foram incubados com secundário 1 µL /200 µL anti-chicken durante 01 hora a T.A. e posteriormente lavados por centrifugação, com ressuspensão de *pellet* em 200 µL de PBS-1X. Após esse processo, a leitura foi realizada no Citômetro FACS canto II (BD Biosciences), na Plataforma de Citometria de Fluxo do ILMD/FIOCRUZ-AM, utilizando os programas FACS Diva Softwer versão 6.1.2. A obtenção dos dados brutos e a análise de porcentagem de eventos, média de intensidade de fluorescência e formatação dos gráficos de citometria, foi realizado através do programa Flow-Jo versão 5.6.7.

3. Resultados e discussão

3.1. Obtenção de anticorpo

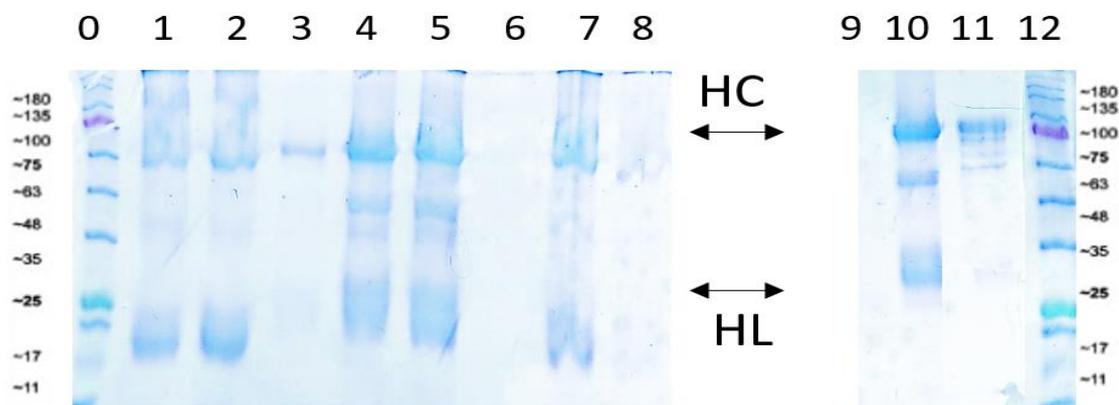


Figura 1- Confirmação da obtenção dos anticorpos obtidos a partir de imunização. Gel de poliacrilamida 15%: (0 e 12) Marcador de peso molecular Ladder protein de 11-180 KDa (SIGMA); (1-8) tem-se IgY total (*pool*), provenientes das imunizações realizadas com o peptídeo sintético P9; (9) canaleta vazia; (10) IgY –padrão (anti-humano) purificada; (11) tem-se a IgY anti-P9 isolada por cromatografia de afinidade. Todas as IgY's apresentaram banda correspondente a cadeia pesada (HC) entre 65 e 75 KDa e banda correspondente a cadeia leve entre 25 e 35 KDa. **Fonte:** própria (2019).

A eficiência dos métodos empregados para o isolamento dos anticorpos foi confirmada por meio de SDS-PAGE 15% (Figura 1). As IgY's obtidas pelo método de precipitação descritos por Pauly e colaboradores (2011), apresentaram bandas correspondentes a cadeia pesada (HC) entre 48 e 75 KDa e cadeia leve (HL) entre 17 e 25 KDa (Ladder Protein SIGMA). A IgY específicas anti- anti-P9 (B:10) purificada por cromatografia de afinidade também apresentaram bandas nas alturas descritas, além de corresponderam a uma IgY padrão purificado por cromatografia (B:8).

A eletroforese também evidenciou a presença de impurezas menores representadas por banda proteica de peso molecular entre 35-48 KDa. Foi possível observar que os diferentes *pools* de anticorpos variaram em quantidade obtida, o que pode estar relacionado a padronização do processo de isolamento do anticorpo. Em virtude dos fatos evidenciados por SDS-PAGE, a obtenção dos anticorpos foi alcançada com êxito.

3.2. Reconhecimento do antígeno sintético

Os diferentes *pools* de IgY total foram testados contra os antígenos sintéticos a P9 (16 μ g/mL) e detectados por Dot-Blot, pelo qual foi possível a visualização de precipitação caracterizada por precipitação de coloração marrom resultante da reação antígeno-anticorpo presente na membrana PVDF. Através desse teste, pode-se observar a detecção de anticorpos em diferentes níveis, variando a coloração fraca, média e forte, correlacionando-se às quantidades de anticorpos detectadas na eletroforese em gel de Poliacrilamida, anteriormente discutido.

O Protocolo desenvolvido nesse estudo, apresentou boa resolução/reação demonstrando que a IgY obtida por precipitação com PEG funcionou de forma eficiente nesse teste imunológico. Logo, pode-se afirmar que os diferentes *pools* de IgY total isolados nesse estudo foram e detectados através da técnica de Dot-Blot, foram eficientes quanto a atividade biológica funcional esperada, evidenciada pelos pontos circulares sobre a membrana PVDF, formados após a aplicação do substrato de revelação, apresentados na figura 2.

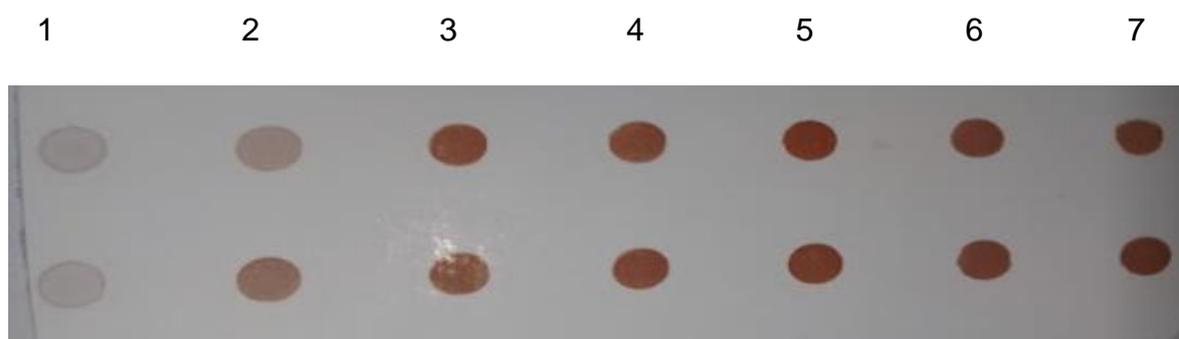


Figura 2- Imunodeteção diferentes IgY total produzidas. Dot Blot em membrana PVDF: imunodeteção de IgY em reconhecimento aos peptídeos P9 correspondentes às imunizações realizadas (1-7).

3.3. Detecção dos anticorpos quanto a reatividade com antígeno na forma desnaturada

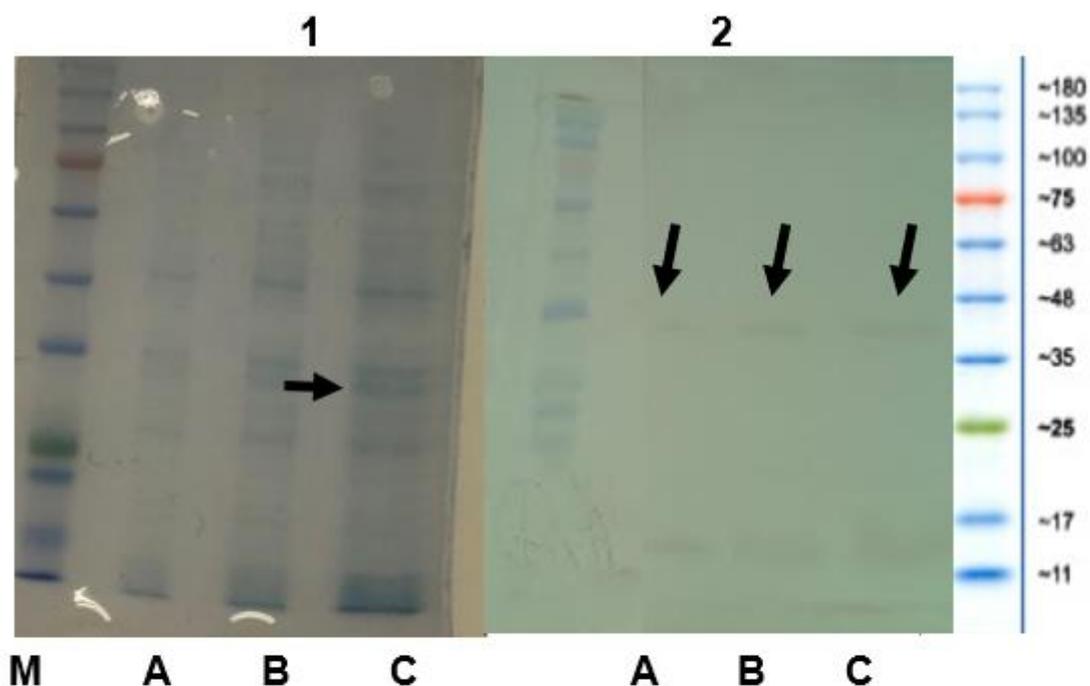


Figure 3- Imunodeteccção dos anticorpos por Western Blot. Quadro 1: Gel de poliacrilamida contendo o extrato bruto de *Shigella flexneri* 5a M90T em três diferentes quantidades (A = 5 µL; B = 10 µL; C= 15 µL). **Quadro 2:** Membrana PVDF com imunodeteccção de IgY localizado entre as bandas de 35 kDa e 48 kDa.

A partir da técnica de *Western Blot*, foi possível observar a reatividade do anticorpo a apenas uma banda proteica do extrato bacteriano de *Shigella flexneri* 5a M90T, evidenciado pela imunoprecipitação formada na altura de 30 kDa aproximadamente, localizada na faixa de 25-35 kDa (figura 4; quadro 3). A imunodeteccção da IgY anti-P9 vai de encontro aos resultados de Barati e colaboradores (2018) e Grandó e colaboradores (2017), quanto a validação do reconhecimento de IgY's produzidas em seus trabalhos utilizando a mesma técnica.

O antígeno Fim-H (30 kDa) é uma proteína que constitui a membrana externa de bactérias Gram-negativas como *Shigella* (ZUBERI et al., 2017). Considerando que o peptídeo P9 foi predito *in silico* a partir fragmentos da sequência peptídica desse antígeno FimH, foi possível observar que a reatividade da IgY anti-P9 foi específica, pois foi direcionada a uma banda correspondente ao antígeno-alvo na forma desnaturada e não apresentou reatividade cruzada com outras proteínas do extrato bacteriano. A imunodeteccção de IgY foi realizada com a utilização do secundário anti-chicken cabra adsorvido com enzima peroxidase.

3.4. Detecção dos anticorpos quanto a reatividade com antígeno na forma nativa

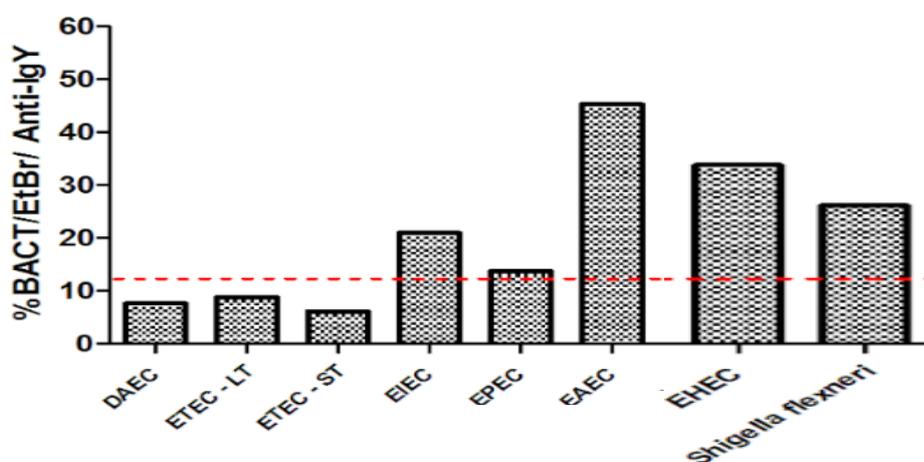


Figura 4: Imunodeteção de anticorpos anti-P9 em reconhecimento de cepas-padrão de bactérias diarreogênicas. Teste de Citometria de Fluxo (FAC's Canto II BD Biosciences) - Reatividade de IgY diferentes bactérias marcadas com brometo de etídeo utilizando secundário anti-chicken cabra Alexa flúor 488.

Afim de avaliar o reconhecimento específico da IgY anti-P9 produzida, foi utilizada a técnica de Citometria de fluxo. Foi possível observar que o anti-P9 foi capaz de reconhecer o antígeno-alvo na forma nativa presente na superfície celular de uma cepa padrão de *Shigella flexneri* 5a M90T. Porém, o anticorpo apresentou reatividade cruzada com algumas cepas de *Escherichia coli* diarreogênicas (DEC) utilizadas como controle do ensaio, evidenciando uma reatividade direcionada a EIEC, EPEC, EAEC e EHEC (figura 4). Isto, pode estar relacionado ao fato do antígeno-alvo (P9) compor a superfície celular de outros membros da família *Enterobacteriaceae* (BRAVO, et al., 2015), como os patótipos de *E. coli* utilizados na avaliação do anticorpo anti-P9.

Esses resultados, evidenciaram que os anticorpos produzidos nesse estudo não apresentaram especificidade de reconhecimento para *Shigella spp.* A reatividade cruzada do anticorpo com os diferentes patótipos de bactérias diarreogênicas inviabiliza a utilização desse anticorpo para utilização em testes de imunodiagnóstico direcionados a detecção de *Shigella*. Apesar disso, pode se observar que o anticorpo apresentou uma reatividade cruzada direcionada, não reagindo com DAEC, ETEC-LT e ETEC-ST. Considerando que, *Shigella* tem um mecanismo de patogênese indistinguível de alguns

patotipos de *E. coli* como EIEC (HAZEN et al., 2016), e que o anticorpo anti-P9 apresentou um reconhecimento cruzado, porém direcionado para *Shigella flexneri* e os patotipos de *E. coli* EIEC, EPEC, EAEC e EHEC. A utilização de antígenos imunogênicos comuns a patógenos é uma estratégia promissora para o controle de coinfeções (RAFIQ et al., 2019). Dessa maneira, a IgY anti-P9 pode ser útil na utilização em métodos de imunidade passiva e uma promissora alternativa não antibiótica para tratamento da shigelose e as doenças causadas pelos patógenos DEC, utilizados nesse experimento. Isto, pode ser bastante útil para o contexto das doenças diarreicas, a qual é responsável por elevado índice de mortalidade em todo o mundo, além de estes achados servirem de base para a aplicação contra outras doenças.

Estudos posteriores, buscarão caracterizar os anticorpos desenvolvidos nesse estudo, quanto ao nanoencapsulamento para proteção contra degradação gástrica em ambiente gastrointestinal e avaliação quanto à eficácia protetora contra invasão bacteriana.

Referências

Anderson, M. Et al. Shigella Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. **Front Cell Infect Microbiol.** 2016;6:45. Published 2016 Apr 19. doi:10.3389/fcimb.2016.00045.

FARZAM, N. et al. *Vaccination with Shigella flexneri 2a conjugate induces type 2a and cross-reactive type 6 antibodies in humans but not in mice.* **Vaccine**, 35(37). 2017 4990–4996. doi:10.1016/j.vaccine.2017.07.070

FRENCK, R. W., Baqar, S., Alexander, W., Dickey, M., McNeal, M., El-Khorazaty, J., ... Venkatesan, M. M. (2018). *A Phase I trial to evaluate the safety and immunogenicity of WRSs2 and WRSs3; two live oral candidate vaccines against Shigella sonnei.* **Vaccine**, 36(32), 4880–4889. doi:10.1016/j.vaccine.2018.06.063

Koestler, B. J., Ward, C. M., Fisher, C. R., Rajan, A., Maresso, A. W., & Payne, S. M. (2019). *Human intestinal enteroids as a model system of Shigella pathogenesis.* **Infection and Immunity**. doi:10.1128/iai.00733-18

Mattock, E., & Blocker, A. J. (2017). How Do the Virulence Factors of Shigella Work Together to Cause Disease? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00064

Muthuirulandi Sethuvel, D. P., Devanga Ragupathi, N. K., Anandan, S., & Veeraraghavan, B. (2016). *Update on: Shigella new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance.* **Letters in Applied Microbiology**, 64(1), 8–18. doi:10.1111/lam.12690

Gopal, Ashidha et al. "A infecção por Shigella dysenteriae ativa a resposta pró-inflamatória através da via de sinalização β -catenina / NF- κ B" *PloS one* vol. 12,4 e0174943. 21 de abril de 2017, doi: 10.1371 / journal.pone.0174943

Nickerson, Kourtney P et al. "Análise da resistência de *Shigella flexneri*, formação de biofilme e perfil transcricional em resposta aos sais biliares" *Infection and immunity* vol. 85,6 e01067-16. 23 de maio. 2017, doi: 10.1128 / IAI.01067-16

Parajuli, P., Deimel, L. P., & Verma, N. K. (2019). Genome analysis of *Shigella flexneri* serotype 3b strain SFL1520 reveals significant horizontal gene acquisitions including a multidrug resistance cassette. *Genome Biology and Evolution*. doi:10.1093/gbe/evz026

Puzari, M., Sharma, M., & Chetia, P. (2018). Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. *Journal of Infection and Public Health*, 11(4), 451–454. doi:10.1016/j.jiph.2017.09.025

Trikha, Radhika et al. "Remediação de *Shigella dysenteriae* tipo 1 intramacrofágica por lactobacilos probióticos isolados de amostras de fezes de bebês humanos" *Revista indiana de pesquisa médica* vol. 145,5 (2017): 679-686.

Yang, C., Wang, H., Ma, H., Bao, R., Liu, H., Yang, L., ... Song, H. (2018). *Characterization and Genomic Analysis of SFPH2, a Novel T7virus Infecting Shigella*. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.03027

RAFIQI, S.A. et al. Immunoprophylactic evaluation of recombinant gametocyte 22 antigen of *Eimeria tenella* in broiler chickens. **Parasitology Research**. 2019 <https://doi.org/10.1007/s00436-018-06198-2>

Mydock-McGrane, Laurel K et al. Rational design strategies for FH antagonists: new drugs on the horizon for urinary tract infection and Crohn's disease" *Expert opinion on drug Discovery*. vol. 12,7 (2017): 711-731.

KOESTLER, B.J. et al. "Formate Promotes *Shigella* Intercellular Spread and Virulence Gene Expression" *mBio* vol. 9,5 e01777-18. 25 Sep. 2018, doi:10.1128/mBio.01777-18

4. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos indicaram que o peptídeo P9 (FimH) foi imunogênico e capaz de induzir resposta imune significativa, com a produção de anticorpos anti-P9.
- Os métodos de isolamento e purificação utilizados para a obtenção dos anticorpos mostraram-se eficientes, resultando em moléculas funcionais e de utilização viável para rotina laboratorial.
- Os anticorpos desenvolvidos foram capazes de reconhecer os antígenos-alvo seja na forma sintética, denaturada e nativa de *Shigella flexneri*.
- Foi evidenciado que IgY anti-P9 possui uma reatividade cruzada direcionada para EIEC, EPEC, EAEC e EHEC.
- Nossos resultados forneceram um anticorpo inviável para utilização em imunodiagnóstico, porém com potencial para utilização em métodos de imunidade passiva.

5. REFERÊNCIAS

HADDAR, C. et al. Tests de diagnostic rapide des shigelloses. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 110, n. 1, p. 1–8, 2017.

KOTLOFF, K. L. et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 8, p. 651-666, 2013.

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

MUTHUIRULANDI SETHUVEL, D. P. et al. Update on: Shigella new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 8–18, 2016.

NUNES, M. R. et al. Diarrhea associated with Shigella in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de pediatria**, v. 88, n. 2, p. 125-128, 2012.

PORE, D. et al. Outer membrane protein A (OmpA) of Shigella flexneri 2a, induces protective immune response in a mouse model. *PloS one*, v. 6, n. 7, p. e22663, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the art of new vaccines: research and development: Initiative for Vaccine**. Geneva, 2004.

ANEXO

Anexo I – Certificado de aprovação no Conselho de ética animal (CEUA)



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais

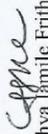


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Produção de anticorpos IGY contra antígenos de *Shigella spp*”, sob a responsabilidade da pesquisadora **Jeniffer Clorives Lopes Batista** – pós-graduada do PPGBIOTEC/UFAM – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada sob o N. 003/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De Janeiro à Abril/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Gallus gallus</i> / Dekalb White
N. de animais	06
Peso/idade	1725 g / 71 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	EZscience Biotecnologia LTDA.

Manaus, 10 de janeiro de 2019.


Profa. Dra. Cinthya Lámile Frithz Brandão de Oliveira
Presidente do CEUA-UFAM