

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y A PARTIR DA GEMA DE OVOS COMERCIAIS

MAUREEN HOCH VIEIRA FERNANDES¹; CLARISSA CAETANO DE CASTRO²;
DÉBORA SCOPEL E SILVA³; MATEUS GONÇALVES⁴, RAYRA DE ALMEIDA
CÔRREA⁵; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER⁶

¹UFPEl – maureenhvfernandes@yahoo.com.br

²UFPEl – clarissac.decastro@gmail.com

³UFPEl – debynha_scopel@hotmail.com

⁴UFPEl – mateusgoncalves.r@gmail.com

⁵UFPEl – rayraalmeidac@gmail.com

⁶UFPEl – sohübner@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A imunoglobulina Y (Ig Y) é a principal imunoglobulina produzida pelas galinhas (*Gallus domesticus*), sendo continuamente sintetizada e secretada no sangue e transferida para a gema do ovo, onde é acumulada em altas concentrações (WARR et al., 1995), no intuito de proteger o embrião em desenvolvimento de patógenos (JANSON et al., 1995). A Ig Y é composta por duas cadeias L e duas cadeia H, sendo as cadeias L (18,660 kDa) e a H (65, 105 kDa) compostas por regiões V e C (SUN et al., 2001). Inicialmente, esta imunoglobulina foi comparada a Ig G dos mamíferos, no entanto, hoje já é considerada como um ancestral da Ig G (WARR et al., 1995).

O uso de gema de ovo como fonte de anticorpos é muito vantajoso, visto que é um método não invasivo (GASSMANN et al., 1990); possui uma boa estabilidade, podendo ser estocada a 4 °C por anos (LARSSON, 1993); tem rendimento entre 5 a 10 vezes maior que IgG produzida em coelho (SVENDSEN et al., 1996); é viável economicamente, pois além da produção de Ig Y ser rápida e em grandes quantidades, as galinhas mantêm altos níveis de anticorpos específicos por um período prolongado (POLSON et al., 1980).

Existem várias técnicas já descritas para o isolamento de Ig Y da gema de ovo, e elas podem ser usadas individuais ou em combinação, dependendo da quantidade, da atividade biológica requerida e da pureza que se pretende obter (SCHADE et al., 2000). Em geral os métodos podem ser divididos em três principais grupos: métodos de precipitação, métodos cromatográficos e ultrafiltração (GUIMARÃES et al., 2008).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a combinação de dois métodos de precipitação (propilenoglicol 6000 e sulfato de amônio) para a obtenção e purificação de Ig Y da gema de ovos comerciais.

2. METODOLOGIA

Ovos

Os ovos foram comprados aleatoriamente em mercados da região de Pelotas.

Isolamento e purificação da Ig Y da gema de ovo

O método usado para extração da Ig Y foi o adaptado por WEN et al. (2012), utilizando propilenoglicol 6000 (PEG 6000) e sulfato de amônio. Resumidamente, a gema foi separada da clara do ovo, transferida para um tubo e

registrado o volume (V1). Três vezes o volume da gema (3xV1) foi adicionado de PBS, formando um volume final (4xV1). Depois 14% de PEG 6000 (em gramas, pulverizado) do volume total foram adicionados e a solução foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente. Esse conteúdo foi centrifugado a 5000g por 20 minutos a 10 °C. O sobrenadante foi coletado e filtrado com gazes estéreis. O volume resultante foi mensurado e foi adicionado novamente PEG 6000 até a obtenção de uma concentração de 12%. O material foi agitado por 10 minutos e centrifugado como anteriormente. Nessa etapa o sobrenadante é desprezado e o pellet dissolvido em PBS no volume original da gema (V1). Adicionou-se a esse conteúdo uma solução a 50% de sulfato de amônio e foi mantido sob agitação overnight a 4 °C. Após centrifugação, o precipitado foi coletado e lavado com uma solução a 33% de sulfato de amônio. Uma nova centrifugação foi feita, o precipitado dissolvido em 1 mL de PBS e dialisado em PBS por 24 horas. A solução obtida foi armazenada a -20 °C.

Eletróforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras de Ig Y extraídas foram analisadas por eletróforese em gel de poliacrilamida 12%. A técnica foi realizada conforme descrita por Laemmli (1970). As amostras de Ig Y obtidas foram analisadas sob condições redutoras (β -mercaptoetanol a 5%). Para as análises as amostras foram aquecidas em água fervente, por 5 minutos, antes da eletróforese. O padrão de peso molecular utilizado foi *Prestained SDS-PAGE Standards Low Range*. As amostras foram aplicadas nos poços no volume final de 10 μ L. As eletróforeses foram submetidas a uma corrente de 100 V e interrompidas quando o corante utilizado atingiu a base do gel de separação. O gel retirado do sistema e corado por *Comassie blue* em seguida tratado com uma solução descorante para a visualização das bandas protéicas.

Western blot

Para execução do ensaio imunoenzimático sobre membrana de nitrocelulose (*Immunoblot*), as amostras de Ig Y extraídas sob condições redutoras foram submetidas à eletróforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito anteriormente e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 μ m de diâmetro. A técnica utilizada foi descrita por Tsang et al. (1983).

Immunoblot

O ensaio foi realizado conforme descrito Ferraz (2011). Inicialmente, as membranas com as amostras de Ig Y foram bloqueadas e, posteriormente, anticorpo de coelho anti-galinha, na diluição 1:500, foi adicionado a solução de bloqueio, incubando-se a temperatura ambiente, sob agitação constante, por 1 hora. A membrana foi lavada e adicionou-se o conjugado (anticorpos de anti-coelho) marcado com peroxidase na diluição 1:500, incubando-se por mais 30 minutos. A membrana foi novamente lavada e a reação enzimática foi revelada com *Sigmafast DAB with metal enhancer*, adicionado de peróxido de hidrogênio. A membrana ficou sobre agitação constante até a visualização das bandas reativas. A reação foi interrompida por lavagens sucessivas em água destilada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O SDS-PAGE revelou que foi possível o isolamento de Ig Y nas amostras de gema de ovos comerciais, utilizando a técnica com PEG-6000 e sulfato de

amônio. A eletroforese deu origem a duas bandas de proteínas com peso molecular de aproximadamente 68 kDa (cadeia pesada) e 27 kDa (cadeia leve), de acordo com estudos previamente descritos (DEVI et al., 2002). Contudo, a técnica, não permitiu um alto grau de purificação, como relatado por Wen et al. (2012). No gel referente ao ensaio com a técnica de *Immunoblot* é possível visualizar o reconhecimento dessas bandas peptídicas isoladas, já que foi empregado anticorpo específico para Ig Y. Pode-se observar a marcação forte e específica das bandas peptídicas relativas as cadeia pesada e leve do material extraído da gema de ovo, sob condições redutoras. Ambos os géis podem ser observados na Figura 1.

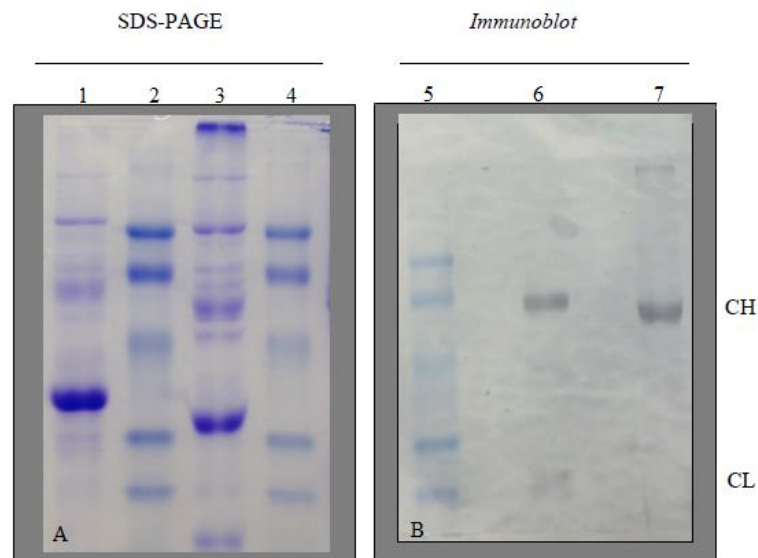


Figura 1. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, sob condições redutoras. As preparações de IgY obtidas pelo método de extração PEG 6000 e sulfato de amônio foram distribuídas na seguinte ordem: (1) amostra 1 de Ig Y purificada a partir de gema de ovo ; (2) padrão de peso molecular; (3) amostra 2 de Ig Y purificada a partir de gema de ovo; (4) padrão de peso molecular (B) *Immunoblot* mostrando o reconhecimento da Ig Y por anticorpos específicos. As bandas peptídicas identificadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose na mesma posição original do gel, através da técnica de *Western Blot*. (5) padrão de peso molecular; (6) amostra 1 de Ig Y purificada a partir de gema de ovo e (7) amostra 2 de IgY purificada a partir de gema de ovo. CH (cadeia pesada); CL (cadeia leve).

4. CONCLUSÕES

O método de precipitação empregando PEG-6000 e sulfato de amônio foi capaz de extrair IgY da gema de ovos comerciais e mostrou ser uma metodologia simples e de baixo custo, sendo capaz de possibilitar a obtenção de anticorpos de uma forma ética, que poderão ser utilizados em diversos campos da ciência e na prevenção e tratamento de doenças.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEVI, C. M., BAI, M. V., LAL, A. V., UMASHANKAR, P. R., KRISHNAN, L. K. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg

- yolk. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 51, p. 129–138, 2002.
- GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T.; HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**, Zurich, v. 4., p. 2528-2532, 1990.
- GUIMARÃES, M. C. C.; CORREIA, V. G.; GAMA FILHO, R. B. Produção de anticorpos em galinhas. **Revista Perspectivas online**, v. 2, n. 7, p.122-129, 2008.
- FERRAZ, P.N. **Emprego da proteína de 75KDa como marcador molecular na diferenciação da resposta vacinal de uma resposta imune causada por uma cepa selvagem de Mycoplasma gallisepticum**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.
- JANSON, A. K.; SMITH, C. I.; HAMMARSTROM, L. Biological properties of yolk immunoglobulins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 371A, p. 685-692, 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature, England**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARSSON, A.; BALOW, R.; LINDAHL, T. L.; FORSBERG, P. Chicken antibodies: talking advantage of evolution – a review. **Poultry Science**, Uppsala, v. 72, p. 1807-1812, 1993.
- POLSON, A.; VON WECHMAR, M. B.; VAN REGENMORTEL, M. H. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Communications**, United States, v. 9, n. 5, p. 475-93, 1980.
- SUN, S.; MO, W.; JI, Y.; LIU, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, p. 708–712, 2001.
- WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**; v. 16, n. 8, p. 392-398, 1995.
- SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY technology**., Berlin Heidelberg New York, Springer Lab Manuals, p. 1-255, 2000.
- SVENDSEN, L. B.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G.; HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 191, n. 2, p. 113-120, 1996.
- TSANG, V. C. W.; PERALTA, J. M.; SIMONS, A. R. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, v. 92, p. 377-391, 1983.
- WEN, J.; ZHAO, S.; HE, D.; YANG, Y.; LI, Y.; ZHU, S. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. **Antiviral Research**, v. 93, p. 154-159, 2012.