

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

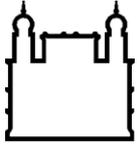
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária



**Anticorpos IgY específicos para rotavírus do grupo A. Uma
abordagem terapêutica para rotavirose em *Macaca fascicularis***

GENTIL ARTHUR LINS BENTES MENDONÇA DE VASCONCELOS

Rio de Janeiro
Março 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos

Anticorpos IgY específicos para rotavírus do grupo A. Uma abordagem terapêutica para rotavirose em *Macaca fascicularis*.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Marcelo Alves Pinto

Rio de Janeiro
Março 2015

**Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ICICT/Fiocruz-RJ**

V331 Vasconcelos, Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de

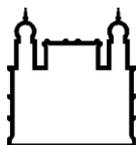
Anticorpos IgY específicos para o rotavírus do grupo A. Uma abordagem terapêutica para rotavirose em *Macaca fascicularis* / Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos. – Rio de Janeiro, 2015. xviii, 143 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 98-138

1. Rotavírus grupo A. 2. Imunoglobulina Y. 3. Imunoterapia. 4. *Macaca fascicularis*. I. Título.

CDD 579.254



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos

Anticorpos IgY específicos para rotavírus do grupo A. Uma abordagem terapêutica para rotavirose em *Macaca fascicularis*.

ORIENTADOR: Dr. Marcelo Alves Pinto

Aprovada em 10 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Renato Sergio Marchevsky
Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dr. Marcelo Alves Soares
Departamento de Genética/UFRJ e Programa de Oncovirologia/INCA

Dr. Valmir Laurentino Silva
Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz

À minha Mãe,

Dedico esta dissertação à pessoa mais importante para que eu pudesse chegar a este dia, minha Mãe. Muitas pessoas participaram da construção da minha educação e formação, mas ninguém foi mais importante que ela. Se eu obtiver esta conquista, com certeza ela será a grande responsável. Na verdade, por qualquer conquista em minha vida, pois sempre valorizou a educação dos filhos. Está e sempre esteve presente ao meu lado.

Mãe, muito obrigado pela pessoa que você é!!!

AGRADECIMENTOS

Vou iniciar agradecendo ao meu orientador Dr. Marcelo Alves Pinto por aceitar orientar essa tese de doutorado e pelos ensinamentos nesses quatro anos de projeto. Mesmo com pouco tempo disponível, como todo chefe de laboratório, sempre foi muito solícito. Nas três etapas que os animais foram utilizados, sua ajuda foi de extrema importância.

Agradeço também o Dr. José Paulo Gagliardi Leite e o Dr. Eduardo de Mello Volotão que apesar de não serem coorientadores no papel, eu os considero como fossem, pois participaram em todas as etapas de execução do trabalho pela experiência com o vírus trabalhado, portanto, foram de fundamental importância.

Além dos pesquisadores responsáveis, o grupo de trabalho era composto pela Juliana Rodrigues Guimarães, Natália Maria Lanzarini e Alexandre dos Santos da Silva. Também merecem meu agradecimento, pois além da ajuda laboratorial, me ajudaram como amigos. Principalmente a Juliana que acompanhou mais de perto a parte final do doutorado e me suportou um pouco mais, sendo muito companheira e compreensiva. Muito obrigado por estar ao meu lado neste momento! Você é mais que minha companheira de trabalho.

Agradecimento aos animais. Sem eles o projeto não teria nem começado. Utilizei dois modelos de animais e infelizmente, de alguma forma, eles sofrem na condição de animais de laboratório para experimentação. Espero poder ter correspondido a responsabilidade de trabalhar com animais tão nobres.

Não posso me esquecer de pessoas que ajudaram no apoio da realização dos experimentos, eles são essenciais para realização de qualquer trabalho. E foram muitas pessoas a quem pedi ajuda! Não me furtava de solicitar auxílio quando era preciso. Dentre essas pessoas estão Alexandre Madi Fialho do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental que me auxiliou em toda parte de produção e purificação do rotavírus. Sua ajuda foi preponderante, pois o vírus foi o principal insumo do projeto. Agradeço também a Ana Carolina Ganime, Elioneide, Cleber Hooper, Márcia Pimenta, Messias e Márcia Terezinha que me ajudaram na execução de procedimentos chave. Todos foram fundamentais!

Estendo o agradecimento a todos os colegas do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia. O grupo do Laboratório de Virologia Comparada também deve ser lembrado.

Agradeço também aos pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar, Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira e Dra. Vanessa Salete de Paula.

Gostaria de agradecer ao Dr. Renato Sergio Marchevsky, Dr. Valmir Laurentino Silva, Dr. Marcelo Alves Soares, Dra. Adriana de Abreu e Corrêa e Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto que aceitaram participar da banca de avaliação e revisão desta tese.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária e ao Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade dada a mim de realizar esse doutorado, e à CAPES pela bolsa concedida durante dois anos.

Meu muito obrigado à Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO) por nos ceder o Laboratório de Bioclimatização para acomodação das galinhas e a realização dos experimentos necessários.

No mesmo sentido, agradeço o Biotério de Experimentação em Primatas do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) pelo espaço para realizar as duas infecções com os primatas não humanos.

Este agradecimento deveria estar no começo pela importância que teve na maior parte do meu doutorado, mas por não pertencer ao grupo de trabalho, escrevo aqui. Durante três anos foi a pessoa que me apoiou incondicionalmente e foi um alicerce forte para eu suportar vários momentos difíceis. Você sabe que faz parte desta tese. Camila, muito obrigado por ter sido esta pessoa!

Meus sinceros agradecimentos ao Gerson Silva de Lima, Adriana Moraes Martins e Jade Crespo Lyra da Seção de Bactérias e Recombinantes de Bio-Manguinhos/Fiocruz, laboratório que também faço parte e recebi um apoio que jamais esperava receber. Saberei sempre ser grato a eles, pois não seria qualquer grupo de trabalho que aceitaria a condição que eles me deram para concluir este doutorado. Foram mais que pais!

Nesses agradecimentos não poderia esquecer meu pai, meus amigos de longa data e meus irmãos, que com certeza também são meus amigos. Apesar de entenderem muito pouco ou nada do que faço, tenho certeza que torcem por mim.

Bom, são muitas pessoas a agradecer, foram quatro anos de muito trabalho e com certeza estou esquecendo algumas pessoas, mas não se sintam de lado, com certeza todos que estavam próximos foram importantes para essa tese. Sintam-se sempre abraçados pelos meus agradecimentos!

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

A produção de anticorpos em aves imunizadas seguida da extração desses anticorpos da gema dos ovos (IgY), tem atraído o interesse da comunidade científica, como pode ser demonstrado pelo aumento significativo da literatura sobre a IgY. Esta abordagem, que é apropriada à produção em larga escala, oferece inúmeras vantagens, tais como, baixo custo e alta eficiência da técnica, em vista do extraordinário rendimento de IgY em somente uma ave (20-40 g IgY por ano), e é mais adequada ao conceito bioético quando trata-se da manutenção e do manejo das aves. Destaca-se que a tecnologia da IgY oferece novas possibilidades de aplicação em imunoterapia e métodos de diagnóstico, tanto para aplicação humana quanto veterinária, incluindo estratégias de tratamento de doenças intestinais graves em crianças, particularmente em países pobres. Neste presente estudo, objetivou-se avaliar a eficiência terapêutica da IgY utilizando macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) jovens desafiados com o rotavírus do grupo A (RVA) humano, a maior causa de morbidade e mortalidade de crianças em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento. Para esta proposta, anticorpos IgY específicos contra o RVA foram produzidos em aves, purificados por polietileno glicol, caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida, *western blotting* e um teste de neutralização em cultura de células (MA-104). Este experimento preliminar rendeu uma suspensão altamente concentrada de IgY específica anti-rotavírus (IgY anti-RVA) (média de 37 mg/mL). O macaco cynomolgus foi estabelecido como modelo de infecção experimental após uma única administração de suspensão de rotavírus humano ($3,1 \times 10^6$ FFU/mL) por sonda gástrica. Os animais foram acompanhados durante onze dias, sendo observadas as manifestações clínicas, cargas virais sérica e fecal, hematologia e dosagem de eletrólitos séricos. O principal sinal clínico (observado em dois dos sete animais inoculados) foi diarreia associada com diminuição dos níveis séricos de potássio durante três dias, seguido de recuperação. O RNA viral foi detectado nas fezes e no soro dos animais infectados, além de partículas infecciosas encontradas nas fezes, sugerindo replicação viral. Na imunoterapia experimental, os macacos foram inoculados com RVA humano ($3,1 \times 10^7$ FFU/mL), desafiados com a suspensão de IgY anti-RVA obtida previamente, e foram monitorados durante cinco dias pelos parâmetros observados no experimento anterior. A eficiência terapêutica da imunoterapia com IgY foi confirmada pela ausência de episódios de diarreia, que é reconhecida como “padrão ouro” para eficácia clínica, apesar do RNA viral ter sido detectado nas fezes de 11 de 12 animais inoculados com o RVA. A duração da detecção do RNA foi reduzida em dois dos três grupos de animais tratados com IgY, quando comparado ao grupo controle positivo. Em um animal que foi tratado com IgY pelas vias oral e intravenosa, não foi detectado genoma viral nas fezes. Como conclusão, a aplicação de anticorpos IgY anti-RVA específicos produzidos em aves, apresenta eficácia no tratamento de gastroenterite aguda causada pelo rotavírus do grupo A humano. Nossos resultados também confirmam que macacos cynomolgus podem ser considerados hospedeiros suscetíveis à infecção com RVA humano, e apontam para a necessidade de controle sanitário da rotavirose humana em colônias de criação de macacos cynomolgus. Esses resultados preliminares sugerem um papel promissor da imunoterapia passiva utilizando IgY anti-RVA em infecção experimental com o rotavírus do grupo A humano. No entanto, um enfoque direto na patogênese da infecção no trato entérico fornecerá informações adicionais para confirmar a eficácia do tratamento com a IgY.

Palavras chave: rotavírus grupo A, imunoglobulina Y, imunoterapia, *Macaca fascicularis*.

ABSTRACT

The production of antibodies in chickens and the extraction of specific antibody suspensions from egg yolk (IgY) are increasingly attracting the interest of the scientific community, as demonstrated by the significant growth of the IgY literature. This approach, which is suitable to a large-scale production, offers several advantages such as the low cost and high efficiency of the technique, in view of the extraordinary yield of IgY by a one hen (20 g – 40 g IgY *per year*), and its suitability to a more bioethical manner for hen keeping. Of note, the IgY-technology offers new possibilities for application in human and veterinary diagnostics and therapeutics, including strategies for the treatment of severe intestinal diseases in children, particularly in poor countries. In this study, we aimed to evaluate the therapeutic efficacy of the IgY by using young cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) challenged with human rotavirus group A (RVA), a major cause of morbidity and mortality in children worldwide, especially in developing countries. For this purpose, specific IgY antibodies against RVA were produced in hens, purified by polyethylene glycol, characterized by polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting and a neutralization assay in a cell culture system (MA-104). This preliminary experiment has yielded a high concentrated suspension of anti-rotavirus specific IgY (anti-RVA IgY) (average 37 mg/ml). The cynomolgus experimental infection model was established after a single administration of a human rotavirus suspension (3.1×10^6 FFU/ml) by oral gavage. The confined animals were followed during a period of eleven days, observed for clinical signs, measurement of serum and faecal viral load, and evaluation of hematology and serum electrolytes. The main clinical sign (observed in two of the seven inoculated monkeys) was diarrhea associated with a decrease in serum potassium during three days, followed by recovery. Viral RNA was detected in both serum and faeces of the infected animals, thus suggesting viral replication. In cynomolgus experimental immunotherapy, the monkeys were inoculated with human RVA (3.1×10^7 FFU/ml), challenged with the anti-RVA IgY suspension previously obtained, and monitored during five days by using the same clinical and biochemical parameters, as previously established. The therapeutic efficacy of the immunotherapy with IgY was confirmed by the absence of episodes of diarrhea, which is recognized as the "gold standard" for clinical efficacy, although viral RNA had been detected in faeces of all but one of the inoculated monkeys. The duration of RNA detection was shortened in two of the three groups of animals treated with IgY, when compared to the positive control. One animal, which was orally and intravenously treated with the anti-RVA IgY, had no RNA detected in faeces. In conclusion, the application of specific anti-RVA IgY antibodies, produced in hens, presents efficacy in the treatment of acute gastroenteritis caused by human rotavirus group A. Our results also confirm that cynomolgus monkeys can be considered susceptible hosts to infection with human RVA, and pointed to the necessity of sanitary control of human rotavirus disease in the breeding colonies of cynomolgus monkeys. Our preliminary results suggest the promising role of passive immunotherapy using anti-RVA IgY in experimental infection with human rotavirus group A. However, a direct approach to the pathogenesis of enteric tract infection will provide additional data to confirm the effectiveness of the IgY treatment.

Key words: group A rotavirus, immunoglobulin Y, immunotherapy, *Macaca fascicularis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Micrografia eletrônica de partículas do rotavírus.....	1
Figura 1.2 – Representação esquemática do vírion de rotavírus.....	3
Figura 1.3 – Ciclo de replicação do rotavírus.....	6
Figura 1.4 – Potencial mecanismo da patogênese do rotavírus e imunidade.....	8
Figura 1.5 – Mortalidade pelo rotavírus em crianças menores de cinco anos em 2008.....	14
Figura 1.6 – Representação esquemática da IgY de aves e da IgG de mamíferos.....	25
Figura 1.7 – Ovário de franga.....	29
Figura 1.8 – Ilustração esquemática do transporte seletivo no folículo ovariano aviário....	31
Figura 1.9 – Transferência de anticorpos para o ovo.....	32
Figura 3.1 – Purificação e concentração do rotavírus pelo cloreto de céσιο.....	43
Figura 3.2 – Esquema representativo da primeira etapa de centrifugação da purificação por polietileno glicol (PEG).....	50
Figura 4.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida do RNA viral das frações purificadas dos rotavírus do grupo A humano (RVA Wa) e símio (RVA SA11).....	62
Figura 4.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas virais dos rotavírus do grupo A humano (RVA Wa) e símio (RVA SA11).....	63
Figura 4.3 – Quantificação do rotavírus do grupo A humano (RVA Wa) pelo do ensaio de unidade de foco fluorescente (FFU).....	64
Figura 4.4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da IgY.....	67
Figura 4.5 – <i>Western blotting</i> da IgY anti-RVA.....	69
Figura 4.6 – Evidência de excreção de partículas infecciosas de rotavírus nas fezes dos macacos.....	75
Figura 4.7 – Imunofluorescência indireta utilizando IgY para detecção do antígeno da hepatite A no fígado de macacos cynomolgus inoculados com HAV.....	83

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.1 – Aspectos das vacinas Rotarix [®] e RotaTeq [®]	20
Quadro 3.1 – Protocolo de imunização das aves para avaliação de rendimento.....	49
Quadro 3.2 – Protocolo de infecção de <i>Macaca fascicularis</i> pelo RVA.....	53
Quadro 3.3 – Protocolo de imunoterapia pelo RVA em <i>Macaca fascicularis</i>	59
Tabela 4.1 – Concentração das proteínas totais purificadas da gema em cada grupo nas 13 semanas de coleta dos ovos.....	66
Tabela 4.2 – Temperatura dos macacos cynomolgus durante os 11 dias de estabelecimento do modelo experimental.....	70
Tabela 4.3 – Macacos cynomolgus inoculados com RVA por via oral. Quantificação de RVA nas fezes e soro em diferentes tempos após a inoculação, detecção realizada pelo RT-qPCR.....	74
Tabela 4.4 – Teste de neutralização do rotavírus com IgY anti-rotavírus.....	76
Tabela 4.5 – Temperatura dos macacos cynomolgus durante os 5 dias de imunoterapia....	77
Tabela 4.6 – Quantificação de RVA nas fezes e soro dos macacos cynomolgus pelo RT-qPCR.....	82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1 – Média do peso corporal das frangas de cada grupo após as imunizações.....	65
Gráfico 4.2 – Concentração das proteínas totais purificadas da gema em cada grupo nas 13 semanas de avaliação.....	67
Gráfico 4.3 – Níveis séricos de potássio nos macacos cynomolgus.....	71
Gráfico 4.4 – Comparação dos níveis séricos de sódio e cloro entre os macacos cynomolgus do Grupo Desafio e os macacos do Grupo Controle.....	72
Gráfico 4.5 – Contagem de linfócitos dos macacos cynomolgus.....	73
Gráfico 4.6 – Níveis séricos de potássio, sódio e cloro nos macacos cynomolgus.....	78
Gráfico 4.7 – Contagem de linfócitos e neutrófilos dos macacos cynomolgus.....	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADRV-N – Do termo inglês *new adult diarrhoea rotavirus* (novo rotavírus da diarreia adulta)

APC – células apresentadoras de antígenos

BCA – Ácido bicinconínico

bp – Pares de base

BRV – Rotavírus bovino

BSA – Albumina de soro bovino

CaCl – Cloreto de cálcio

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CETA - Comitê de Ética no Trato com Animais

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – Adjuvante completo de Freund

Cl⁻ – Cloro

CoCl₂ – Cloreto de cobalto

CpG-ODN - Oligodesoxinucleotídeos contendo C-fosfato-guanosina

CsCl – Cloreto de céσιο

Cu⁺ – Cobre

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DAPI – 4' 6-diamidino-2-fenilindol

DLP – Partícula de rotavírus de duplo capsídeo

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

dpi – Dia(s) pós-inoculação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DHBV – Vírus da hepatite B de patos

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EIA - Ensaio imunoenzimático

ELISA – Do termo inglês *enzyme-linked immunosorbent assay* (teste imunoenzimático)

Fab – Do termo inglês *Fragment antigen binding* (Fragmento que se liga ao antígeno)

Fc – Do termo inglês *Fragment crystallizable* (Fragmento cristalizável)

FcRY – Receptor Fc da gema do ovo

FFU – Unidades de foco fluorescente

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FR – Fator reumatoide

g – Força G

GA – Gastroenterite aguda

HAV – Vírus da hepatite A
HBV – Vírus da hepatite B
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HAMA – Anticorpos anti-camundongo produzidos em humanos
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HPV – Papilomavírus Humano
HRV – Rotavírus Humano
HSC70 – Proteína do choque térmico cognato 70
IFA – Adjuvante incompleto de Freund
IFN – Interferon
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IgY – Imunoglobulina Y
IL – Interleucina
IO – Tratamento com IgY oral
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IOIV – Tratamento com IgY oral e intravenosa
K⁺ – Potássio
kDa – Kilodalton
LCR – Líquido céfalo-raquídeo
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LPS – Lipopolissacarídeo
MA-104 – Células de rim de macacos rhesus
mA – Miliampère
mAb – Anticorpo monoclonal murino
MBA – Do termo inglês *mannose-biotin adducts* (Molécula manose-biotina aduta)
mmol – Milimol
Na⁺ – Sódio
NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
ND – Não detectado
nm – Nanômetro
NSP – Proteína não estrutural
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORF – Área aberta de leitura
PAMP – Padrões moleculares associados à patógenos
PBS – Tampão fosfato salina
PBS-T – Tampão fosfato salina Tween[®] 20

PCR – Reação em cadeia da polimerase
PEG – Polietileno glicol
pH – Potencial hidrogeniônico
PLA₂R – Receptor de manose em mamíferos
PRR – Receptores reconhecedores de padrões
qPCR – PCR em tempo real (quantitativo)
RCWG – Do inglês *Rotavirus Classification Work Group* (Grupo de Trabalho de Classificação dos Rotavírus)
RE – Retículo endoplasmático
RNA – Ácido ribonucleico
RNA_{fd} – RNA de fita dupla
RNA_i – RNA de interferência
RNA_m – RNA mensageiro
RNA₊ – RNA polaridade positiva
RNA₋ – RNA polaridade negativa
RT-PCR – Transcrição reversa-PCR
RT-qPCR – reação da transcriptase reversa seguida da PCR em tempo real (quantitativo)
RVA – Rotavírus do grupo A
RVA SA11 – Rotavírus do grupo A símio
RVA Wa – Rotavírus do grupo A humano
SARS – Síndrome respiratória aguda grave
SCPrim – Serviço de Primatologia
SDS-PAGE – Do termo inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio)
SFB – Soro fetal bovino
q.s.p. – Quantidade suficiente para
tc – Do termo em inglês *tissue culture* (cultura celular)
TLP – Partículas de rotavírus de triplo capsídeo
TLR – Receptor *Toll-like*
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa
UNIFESO – Centro Universitário Serra dos Órgãos
V – Volt
VP – Proteína viral do capsídeo
wt - Do termo em inglês *wild type* (tipo selvagem)

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Rotavírus	1
1.1.1. Histórico.....	1
1.1.2. Estrutura.....	2
1.1.3. Classificação	3
1.1.4. Replicação viral	4
1.1.5. Patogenia.....	7
1.1.6. Imunidade ao rotavírus	9
1.1.7. A Rotavirose	11
1.1.7.1. Clínica	11
1.1.7.2. Epidemiologia	13
1.1.7.3. Diagnóstico.....	16
1.1.7.4. Tratamento	17
1.1.7.5. Prevenção	19
1.2. Imunoglobulina Y	22
1.2.1. Histórico.....	22
1.2.2. O anticorpo.....	23
1.2.3. Propriedades moleculares da IgY	24
1.2.3.1. Estrutura	24
1.2.3.2. Estabilidade	25
1.2.4. Rendimento	27
1.2.5. Conteúdo da gema.....	27
1.2.6. Transferência da IgY para gema do ovo	29
1.2.7. Produção da IgY	32
1.2.7.1. Adjuvante	32
1.2.7.2. Via de inoculação	33
1.2.7.3. Purificação.....	34
1.2.8. Aplicação	35
1.3. Modelos animais de infecção experimental	37
1.4. Justificativa	39
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo geral.....	40
2.2. Objetivos específicos	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Delineamento experimental	41
3.2. Produção dos rotavírus	42
3.2.1. Propagação dos rotavírus em cultura de células	42
3.2.2. Purificação e concentração por gradiente de cloreto de céso	42
3.2.3. Caracterização dos rotavírus	44
3.2.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida do ácido nucléico viral	44
3.2.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas virais	44
3.2.4. Quantificação dos rotavírus	45
3.2.4.1. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	45
3.2.4.2. Ensaio de unidade de foco fluorescente (FFU)	46

3.3. Produção da imunoglobulina Y	47
3.3.1. Acomodação, alimentação e procedimentos com os animais	47
3.3.2. Imunização das aves	48
3.3.3. Método de purificação da IgY	49
3.3.4. Quantificação de proteínas totais	50
3.3.5. Caracterização da IgY	50
3.3.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	51
3.3.5.2. <i>Western blotting</i>	51
3.4. Estabelecimento do modelo de infecção pelo RVA em macacos cynomolgus	52
3.4.1. Animais	52
3.4.2. Procedimentos da infecção	53
3.4.3. Análise hematológica e bioquímica	54
3.4.4. Detecção do RVA nas amostras	54
3.4.4.1. Detecção do antígeno viral nas fezes	54
3.4.4.2. Detecção do RNA viral nas fezes e no soro	54
3.4.4.3. Evidência de partículas virais infecciosas eliminadas nas fezes	55
3.5. Imunoterapia para RVA em macacos cynomolgus	56
3.5.1. Ensaio de neutralização da IgY em cultura de células	56
3.5.2. Animais	57
3.5.3. Procedimentos da infecção e imunoterapia	58
3.5.4. Análise hematológica e bioquímica	59
3.5.5. Detecção do RNA viral nas amostras de fezes e soro	60
3.6. Aplicação da IgY em diagnóstico	60
3.7. Análise estatística	61
4. RESULTADOS	62
4.1. Produção do inóculo de rotavírus humano	62
4.2. Produção da IgY anti-RVA nas aves (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	64
4.2.1. Observação clínica	64
4.2.2. Pesagem das aves	65
4.2.3. Histopatologia	65
4.2.4. Dosagem das proteínas totais purificadas	65
4.2.5. Caracterização da IgY anti-RVA purificada	67
4.2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	67
4.2.5.2. <i>Western blotting</i>	68
4.3. Estabelecimento do modelo de infecção pelo RVA em macacos cynomolgus	70
4.3.1. Observação clínica	70
4.3.2. Dados hematológicos e bioquímicos	70
4.3.3. Detecção do RVA nas amostras	73
4.4. Imunoterapia para RVA em macacos cynomolgus	76
4.4.1. Ensaio de neutralização em cultura de células	76
4.4.2. Observação clínica	76
4.4.3. Dados hematológicos e bioquímicos	77
4.4.4. Detecção do RVA nas amostras	81
4.5. Aplicação da IgY em diagnóstico	82
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
8. ANEXO I	139
9. ANEXO II	140
10. ANEXO III	141

1. INTRODUÇÃO

1.1. Rotavírus

1.1.1. Histórico

A gastroenterite é definida como uma inflamação do trato gastrintestinal que pode ser causada por agentes infecciosos ou toxinas. A gastroenterite infecciosa causa morbidade e mortalidade substancial em todo o mundo. As infecções bacterianas eram comumente associadas à gastroenterite (Parashar *et al.*, 1998), e os vírus não eram associados a esta infecção até o início da década de 1970. No entanto, com o descobrimento do vírus Norwalk em 1972 (Kapikian *et al.*, 1972) e do rotavírus em 1973 (Bishop *et al.*, 1973), agentes não bacterianos causadores de gastroenterite foram identificados.

Quase que imediatamente, o espectro de vírus que causavam a infecção gastrintestinal em adultos foi reconhecido como diferente daqueles que acometiam crianças. Entre as crianças até dois anos, aproximadamente metade dos casos de diarreia que requeriam atendimento hospitalar eram atribuídos ao rotavírus (Kapikian, 1993), enquanto em adultos, os surtos de gastroenterite não bacteriana eram associados às viroses tipo-Norwalk (Fankhauser *et al.*, 1998).

Em 1973, Bishop e colaboradores descreveram partículas virais únicas obtidas a partir de biópsia da mucosa duodenal de crianças com gastroenterite (Bishop *et al.*, 1973). Vírus com aspectos morfológicos semelhantes já haviam sido visualizados em 1963 em cortes histológicos intestinais de camundongos com diarreia (Adams and Kraft, 1963). Através da microscopia eletrônica, partículas virais de 70 nm de diâmetro descritas nestes estudos, aparentavam o formato de uma roda (Figura 1.1), do latim *rota*, motivando o nome rotavírus (Flewett *et al.*, 1974).

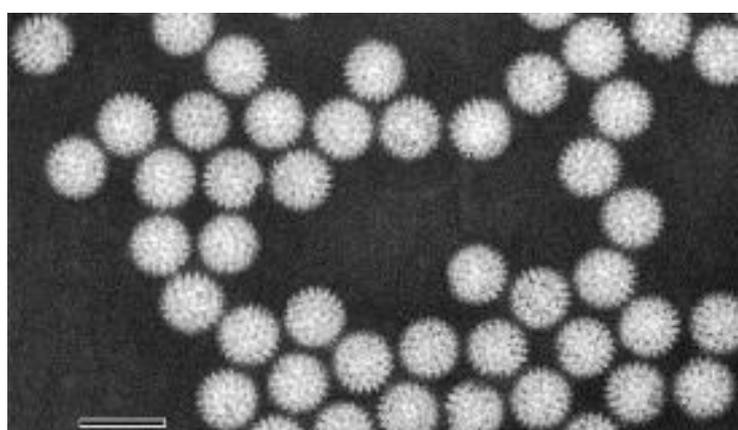


Figura 1.1 – Micrografia eletrônica de partículas do rotavírus. Proveniente de uma amostra de fezes de criança com diarreia por rotavírus (escala representa 100 μ m). (Glass *et al.*, 2014)

Atualmente, o rotavírus do grupo A é um dos principais agentes causadores da gastroenterite viral aguda, seguido pelos norovírus, adenovírus entéricos e astrovírus, respectivamente (Clark and McKendrick, 2004; Ramani and Kang, 2009; Madsen *et al.*, 2014).

1.1.2. Estrutura

O rotavírus é um vírus não envelopado, com 70 nm de diâmetro, pertencente à família *Reoviridae* e é classificado em oito grupos (A-H), também comumente referido por espécies (Matthijnssens *et al.*, 2012; Than and Kim, 2013). Desses grupos, somente os grupos A, B e C são reconhecidos por infectar humanos e animais, enquanto os grupos D, E, F e G infectam somente animais (Estes and Kapikian, 2007; Matthijnssens *et al.*, 2012). No entanto, em 1997, um novo grupo de rotavírus (H) foi descoberto infectando adultos e que não pertencia a nenhuma outra espécie estabelecida (Yang *et al.*, 1998; Matthijnssens *et al.*, 2012). Este novo vírus foi nomeado “novo rotavírus da diarreia adulta” (ADRV-N) (Yang *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2007). Recentemente, um vírus correlacionado ao ADRV-N foi isolado em porcos (Wakuda *et al.*, 2011).

O genoma viral consiste de 11 segmentos de dupla-fita de RNA (RNAfd), que codifica seis proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral (VP1-VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1-NSP6) (Clark and McKendrick, 2004; Estes and Kapikian, 2007). Cada segmento do RNA codifica uma proteína, com exceção do segmento 11 que em muitos isolados do vírus codifica duas proteínas, NSP5 e NSP6 (Mattion *et al.*, 1991; Estes and Greenberg, 2013). O vírus é constituído de um triplo capsídeo: externo, intermediário e interno, este último também é chamado de *core* e confere proteção ao RNA (Figura 1.2). O capsídeo externo compreende duas proteínas, a glicoproteína VP7 e a VP4, que definem os genótipos G e P, respectivamente, e estão relacionados à especificidade do hospedeiro, virulência e a imunidade protetora (Estes and Cohen, 1989; Kapikian *et al.*, 2001). A VP4 é clivada pela tripsina em duas proteínas, VP5* e VP8*, importantes na fase de adsorção à célula (Estes, 2001). Os capsídeos intermediário e externo conferem à partícula viral uma estrutura icosaédrica de dupla camada visualizado no microscópio eletrônico (Kapikian *et al.*, 2001). O capsídeo intermediário é composto pela VP6, a proteína viral mais abundante e que é utilizada na classificação dos grupos (Parashar *et al.*, 1998; Desselberger, 1999), sendo também o epítopo mais comum para detecção em testes de diagnóstico. Outras proteínas estruturais também parecem conferir certo grau de especificidade entre os grupos (Estes, 2001).

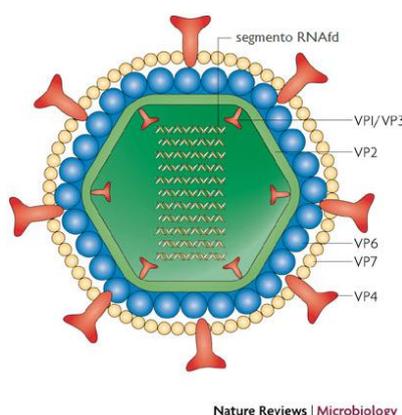


Figura 1.2 – Representação esquemática do vírion de rotavírus. (Adaptado de Angel *et al.*, 2007)

1.1.3. Classificação

Tradicionalmente, a classificação viral era apoiada nas características clínicas, morfológicas e sorológicas dos diferentes isolados virais. Contudo, com o crescimento rápido do uso de técnicas moleculares em todo o mundo, a classificação baseada no sequenciamento está complementando e substituindo os métodos de classificação mais tradicionais (Matthijnsens *et al.*, 2012). A construção de sequências pareadas identificando perfis tem sido utilizada para diferenciar tipos em espécies virais (de Villiers *et al.*, 2004; Johne *et al.*, 2011) ou definir genótipos dentro de espécies de vírus causadores de gastroenterites agudas (de Villiers *et al.*, 2004; Matthijnsens, Ciarlet, Heiman, *et al.*, 2008).

Em 1989, foi estabelecido um sistema binário de classificação para RVA, sendo baseado em reações imunológicas e na estrutura dos genes das duas proteínas que compõem o capsídeo externo (VP7 e VP4), as quais, independentemente, estimulam a produção de anticorpos neutralizantes (Ciarlet and Estes, 2002). Dessa forma, as amostras de RVA são classificadas em VP4 ou “sorotipos P” (P refere-se à sensibilidade à protease) e VP7 ou “sorotipos G” (G refere-se à glicoproteína) (Matthijnsens, Ciarlet, Heiman, *et al.*, 2008; Estes and Greenberg, 2013). A classificação dos RVA em sorotipos VP4 ou VP7 é realizada por ensaios de neutralização cruzada utilizando soros hiperimunes. Essa técnica é demorada, pois requer coleções virais, reagentes imunológicos apropriados e está disponível em poucos laboratórios de pesquisa (Matthijnsens, Ciarlet, Rahman, *et al.*, 2008). Adicionalmente, os genótipos de rotavírus podem ser classificados com base na identidade entre as sequências genéticas dos segmentos que codificam as proteínas VP7 (com os tipos definidos pela sigla G, diferenciados em 23 G) e VP4 (com os tipos definidos pela sigla P, diferenciados em 32 P), no formato GxP[x] (Kapikian *et al.*, 2001; Matthijnsens, Ciarlet, Heiman, *et al.*, 2008; Assis *et al.*, 2013).

Outra classificação, mais atual, proposta pelo *Rotavirus Classification Work Group* (RCWG), pretende uniformizar a nomenclatura do rotavírus, utilizando o sequenciamento completo ou parcial de todos os 11 segmentos do material genético para classificar em genótipos: G_x-P_[x]-I_x-R_x-C_x-M_x-A_x-N_x-T_x-E_x-H_x, que representam os genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/NSP6, respectivamente. Com base nesta nomenclatura, foram descritos até o momento 27 G, 37 P, 17 I, 9 R, 9C, 8 M, 16 A, 10 N, 12 T, 15 E, e 11 H genótipos de RVA. Este novo sistema de classificação recomenda nomear a sequência viral obtida considerando-se os seguintes parâmetros: a) a espécie de rotavírus; b) a sua origem (humana ou animal), identificando também se a sequência foi obtida a partir de vírus selvagem (wt “wild type”) ou vírus de cultura celular (tc “tissue culture”); c) o país em que foi detectado o vírus, utilizando o código padrão de 3 letras; d) o nome comum dado pelo pesquisador; e) o ano de detecção; f) os genótipos G e P da seguinte forma: GXP[X] (Matthijnssens *et al.*, 2011). Como exemplo, o rotavírus do grupo A humano: RVA/human-tc/USA/Wa/1974/G1P[8].

1.1.4. Replicação viral

Os estudos pioneiros a respeito da replicação dos RVA foram realizados utilizando uma linhagem de células fetais derivada de rim de macaco rhesus (*Macaca mulatta*) (MA-104) analisadas através da microscopia eletrônica. Resultados mais recentes foram obtidos através de estudos em células polarizadas do epitélio intestinal e, através de investigações sobre etapas específicas do ciclo replicativo utilizando expressão gênica e interação proteica *in vitro* (Estes and Greenberg, 2013). Estudos envolvendo RNA de interferência (RNAi) também têm sido muito utilizados (Arias *et al.*, 2004; Campagna *et al.*, 2005).

O rotavírus infecta os enterócitos das vilosidades do intestino delgado e replica exclusivamente no citoplasma celular (Trask *et al.*, 2012). O processo de adsorção dos RVA é complexo, envolve diferentes proteínas e é sabida a existência de mais de um receptor de membrana envolvido no processo, sendo um localizado na região apical da célula hospedeira e dependente de ácido siálico e o outro localizado na região basolateral da célula. Em células MA-104 o processo de adsorção dura de 10-12 horas à temperatura de 37°C (Ramig, 2004; Guerrero and Moreno, 2012; Estes and Greenberg, 2013).

A arquitetura complexa das partículas maduras com triplo capsídeo (TLP) integram os elementos necessários para a entrada na célula e transcrição endógena dos RNA mensageiros (RNAm) do vírus (Li *et al.*, 2009; Settembre *et al.*, 2011). O vírion precisa se ligar à célula alvo pela interação entre as espículas virais do capsídeo externo (VP4) e receptores

específicos presentes na membrana plasmática. No entanto, a partícula não é infecciosa para penetrar pela membrana, assim, durante o processo de adsorção, a proteína VP4 é clivada em VP5* e VP8* pela ação da tripsina pancreática presente no trato gastrointestinal do hospedeiro. A ligação da proteína VP5* a receptores de membrana é independente de ácido siálico. A proteína VP7 também parece estar envolvida no processo de adsorção, sendo ácido-siálico dependente (Haselhorst *et al.*, 2009), e já foi demonstrado que a VP7 se liga a outros receptores, incluindo as integrinas e a proteína do choque térmico cognato 70 (HSC70) (Ramig, 2004; Lopez and Arias, 2006; Guerrero and Moreno, 2012; Trask *et al.*, 2012; Estes and Greenberg, 2013).

A endocitose independente de clatrina e caveolina permite que o vírion forme o endossomo inicial. Nesta fase, a queda na concentração de cálcio leva à perda da proteína VP7 e à penetração na membrana pela VP5* (Chemello *et al.*, 2002; Pando *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2009; Trask *et al.*, 2012). A perda do capsídeo externo e liberação da partícula de duplo capsídeo (DLP) transcricionalmente ativa no citosol, ativa o complexo polimerase interno (VP1 e VP3) para transcrever a fita de RNA polaridade positiva (RNA+) de cada um dos 11 segmentos genômicos de RNA de fita dupla (RNAfd) (Trask *et al.*, 2012; Estes and Greenberg, 2013). O RNA+ serve tanto como RNAm como molde para a síntese das fitas de RNA polaridade negativa (RNA-) para formar o genoma de RNAfd (Carreño-Torres *et al.*, 2010; Trask *et al.*, 2012).

Uma vez que as proteínas sintetizadas estão prontas em quantidade suficiente, o genoma é replicado e empacotado nas novas DLPs, dentro de inclusões citoplasmáticas eletrodensas chamadas de viroplasmas (Petrie *et al.*, 1984; Cheung *et al.*, 2010). Duas proteínas não estruturais, NSP2 e NSP5, demonstraram ser suficientes para formar estas inclusões citoplasmáticas livres de membranas (Fabbretti *et al.*, 1999), que são de tamanhos heterogêneos (López *et al.*, 2005; Campagna *et al.*, 2007). São nestas estruturas que ocorrem a síntese do RNAfd e o empacotamento destes dentro do *core* das partículas pré-vírion (Silvestri *et al.*, 2004). Desta forma, a síntese do genoma se inicia quando a VP1 e a VP3 se ligam ao terminal 3' do RNA+ viral e, a condensação da proteína do capsídeo interno VP2 em torno do complexo de polimerase desencadeia a síntese de RNAfd pela VP1. A proteína do capsídeo intermediário VP6 agrega o *core* para formar a DLP (Trask *et al.*, 2012). Portanto, além da NSP2 e NSP5, as proteínas VP1, VP2, VP3 e VP6 também se acumulam no viroplasmas (González *et al.*, 2000; López *et al.*, 2005; Arnoldi *et al.*, 2007; Patton *et al.*, 2007).

Por meio das proteínas VP6 e VP4, as novas DLPs prontas ligam-se a NSP4, que serve como um receptor do retículo endoplasmático (RE), propiciando o brotamento das DLP para o interior do RE. Durante este processo, partículas transitórias envelopadas são observadas no RE. A remoção da membrana transitória e a montagem das proteínas VP4 e VP7 do capsídeo externo resultam na maturação da partícula de triplo capsídeo. Os vírions formados são liberados pela lise celular ou pela utilização de uma via secretora (Musalem and Espejo, 1985; Jourdan *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2012; Trask *et al.*, 2012). Todo o processo de replicação está demonstrado na Figura 1.3.

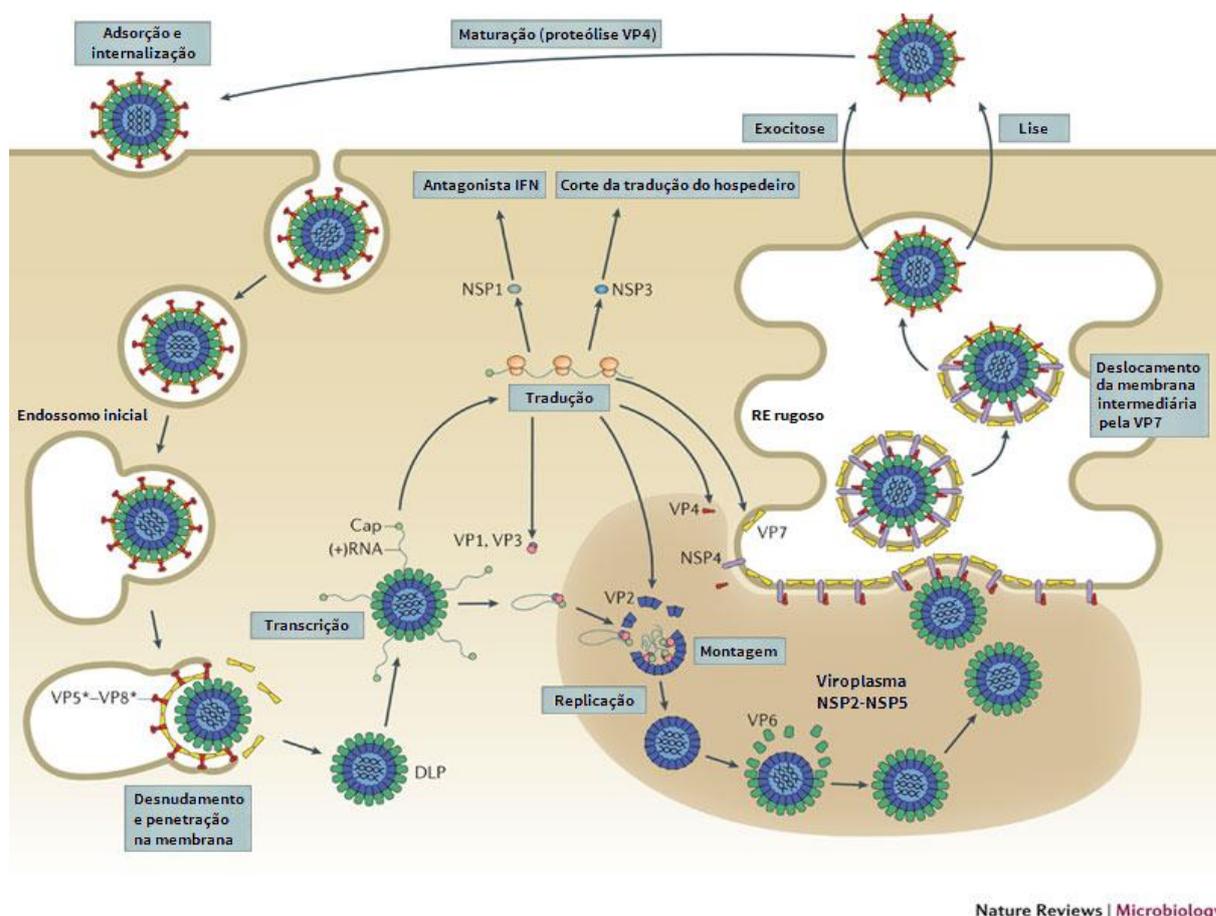


Figura 1.3 – Ciclo de replicação do rotavírus. (Adaptado de Trask *et al.*, 2012)

Apesar das atividades das proteínas NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 durante a replicação estarem relativamente bem caracterizadas, as atividades da NSP1 e NSP6 permanecem desconhecidas. Entretanto, estudos mais recentes têm associado a NSP1 ao escape viral a defesa do hospedeiro à infecção, ao combate da resposta antiviral inata do hospedeiro e à supressão da indução de apoptose durante os estágios iniciais da infecção para promoção da replicação viral (Arnoldi *et al.*, 2007; Graff *et al.*, 2009; Bagchi *et al.*, 2010). Diferente das outras NSPs, a NSP6 não é codificada por todos os isolados de rotavírus. Para as cepas que a expressam, esta proteína é codificada de uma área aberta de leitura (ORF) junto com a NSP5

no segmento 11 (Mattion *et al.*, 1991). Esta proteína é altamente efêmera e é degradada dentro de duas horas após sua síntese (Rainsford and McCrae, 2007). Não obstante muitos estudos sugerirem que a NSP6 localiza-se no viroplasma (Rainsford and McCrae, 2007), o papel preciso na replicação do rotavírus necessita ser elucidado. De modo geral, os aspectos que envolvem a replicação dos RVA são complexos e não foram totalmente compreendidos (Greenberg and Estes, 2009).

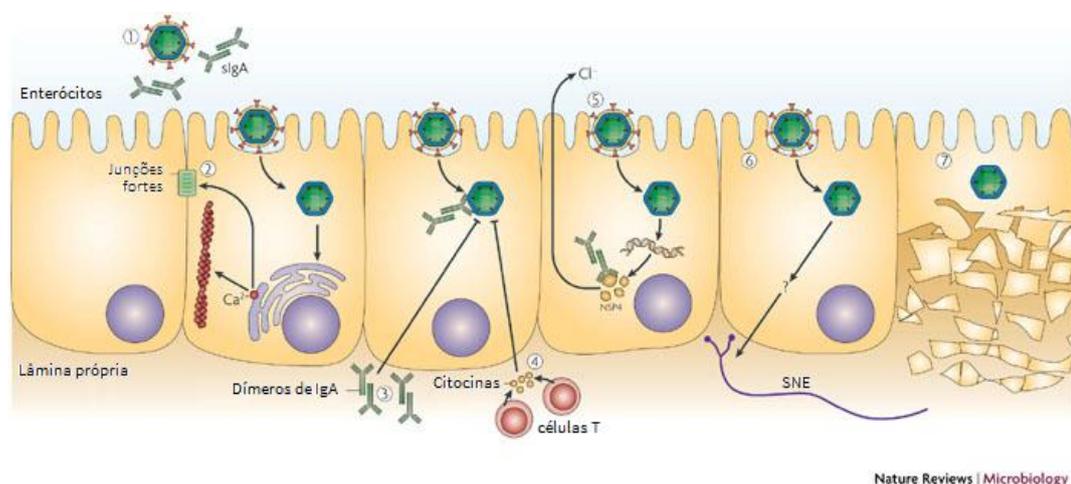
1.1.5. Patogenia

Os mecanismos de patogênese do rotavírus vêm sendo estudados em modelos animais e humanos. No ser humano, a dose infectante estimada é de 100 a 1.000 partículas virais (Ward *et al.*, 1986). A transmissão do rotavírus ocorre de pessoa para pessoa, frequentemente pela via fecal-oral (Cortese *et al.*, 2009). Contudo, já foi descrito rotavírus em amostras de urina, em secreções do trato respiratório superior, sistema nervoso central e líquido céfalo-raquídeo (LCR) (Vollet *et al.*, 1981; Zheng *et al.*, 1991; Nishimura *et al.*, 1993; Ushijima *et al.*, 1994), no entanto, acredita-se que estes achados não estão associados com transmissão. A disseminação pode ocorrer por meio de mãos contaminadas, superfícies de ambientes, objetos, alimento e água (Parashar *et al.*, 2013).

Após a ingestão, as partículas de rotavírus chegam ao intestino delgado e internalizam exclusivamente em enterócitos maduros no ápice das microvilosidades (Holmes *et al.*, 1975), mas anticorpos neutralizantes contra VP4 ou VP7, ou ambos, podem prevenir a ligação viral e a penetração no enterócito (Figura 1.4) (Parashar *et al.*, 2013). A infecção destas células ocorre, e após a replicação citolítica nos enterócitos do intestino delgado, as novas partículas do vírus são produzidas de 10 a 12 horas após a infecção, sendo liberadas em grande quantidade na luz intestinal, podendo infectar porções distais do intestino delgado ou ser eliminadas nas fezes (Anderson and Weber, 2004). A infecção de células vizinhas causa contínua replicação e liberação de novos vírions, assim sendo, a carga viral é alta no estágio inicial da infecção. Mais de 10^{11} partículas virais por grama de fezes são excretadas pela criança durante a infecção (Editorial: Rotaviruses of man and animals, 1975; Desselberger, 1999). Esta carga diminui rapidamente logo que a diarreia acaba, mas o ácido nucléico viral pode ser detectado em baixos níveis por várias semanas (Richardson *et al.*, 1998). Entretanto, a quantidade de rotavírus eliminado por adultos pode ser muito variável, podendo ser de 10 a 100 vezes menor quando comparado a crianças (Vollet *et al.*, 1979).

A patogenia da diarreia inclui a redução na absorção de água e nutrientes, e aumento na secreção fluída intestinal (Lundgren and Svensson, 2001). Morfologicamente, a infecção

causa encurtamento das vilosidades; necrose de enterócitos com descamação das microvilosidades do intestino delgado, determinando a perda das células absorptivas e a proliferação das células da cripta secretória; edema mitocondrial; distensão do retículo endoplasmático; e infiltração de células mononucleares na mucosa (Barnes and Townley, 1973; Davidson and Barnes, 1979; Lundgren and Svensson, 2001; Boshuizen *et al.*, 2003). A má absorção pode também ser resultado da redução na expressão de enzimas digestivas, induzida pelo vírus, bem como o vazamento paracelular, consequência de alterações funcionais das junções de adesão entre os enterócitos, mediadas pela NSP4 (Lundgren and Svensson, 2001). O aumento da secreção de cloro através da ativação de canais de cloro dependentes de cálcio, e a consequente perda de água e eletrólitos também são mediados pela NSP4, que age como uma enterotoxina viral induzindo diarreia secretória (Ball *et al.*, 1996; Horie *et al.*, 1999). A NSP4 também estimula o sistema nervoso entérico (plexo mesentérico), promovendo o aumento do peristaltismo intestinal, e contribuindo assim para a diarreia (Lundgren *et al.*, 2000; Greenberg and Estes, 2009). Enzimas produzidas pelas células absorptivas como a sacarase e isomaltase têm sua expressão reduzida, resultando no acúmulo de açúcares não digeridos no lúmen intestinal, aumentando o gradiente osmótico que favorece a secreção fluída intestinal (Parashar *et al.*, 2013). Pode-se concluir que a diarreia induzida pelo rotavírus é de característica multifatorial (Lundgren and Svensson, 2001).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 1.4 – Potencial mecanismo da patogênese do rotavírus e imunidade. (1) Anticorpos neutralizantes específicos contra VP4 e/ou VP7 podem prevenir a ligação viral e penetração à célula, induzindo a exclusão viral. (2) Se este mecanismo falhar, o rotavírus internaliza os enterócitos causando alteração do metabolismo das proteínas da membrana do enterócito, induzindo diarreia por deficiência absorptiva ou mesmo osmótica. O rotavírus também aumenta de concentração de cálcio (Ca^{+2}) intracelular que rompe o citoesqueleto e as junções de adesão entre os enterócitos, resultando no extravasamento paracelular. (3) A replicação viral intracelular pode ser inibida pela IgA anti-VP6 secretória durante a transcrição nos enterócitos. (4) Citocinas secretadas de células T rotavírus-específicas podem inibir a replicação viral. (5) Se a replicação não for parada, há a produção de NSP4, uma toxina que induz diarreia e estimula o plexo mesentérico (6), induzindo a diarreia secretória e aumento da peristalse. (7) Finalmente, o rotavírus lisa a célula hospedeira, adicionalmente, contribuindo para diarreia má absorptiva ou osmótica. SNE: Sistema Nervoso Entérico. (Adaptado de Angel *et al.*, 2007)

Considerava-se que a infecção por rotavírus era limitada ao intestino, porém, inúmeros estudos ao longo da última década, têm mostrado que o rotavírus pode provocar viremia de curto prazo em crianças imunocompetentes, bem como em animais infectados experimentalmente (Blutt *et al.*, 2003). A relevância clínica da propagação sistêmica do rotavírus ainda não é clara, mas pode estar associada às manifestações extraintestinais da infecção (Parashar *et al.*, 2013).

1.1.6. Imunidade ao rotavírus

A resolução da infecção por rotavírus depende bastante da resposta imunológica do hospedeiro. Basicamente, em um indivíduo considerado saudável, durante a infecção, os antígenos do rotavírus são transportados para as placas de Peyer, sofrem processamento pelos macrófagos, células dendríticas ou células B, e são apresentadas às células T *helper*. Esta cascata de eventos culmina na estimulação da expansão das células B específicas e precursores de linfócitos T citotóxicos (Offit, 1996).

Evidências sugerem que a resposta imune inata é imprescindível como primeira linha de defesa, limitando a replicação do RV e a infecção propriamente dita no hospedeiro (Broquet *et al.*, 2011; Pott *et al.*, 2011; Angel *et al.*, 2012; Pott *et al.*, 2012; Sen *et al.*, 2012). Após o início da infecção no intestino, a resposta imune inata é rapidamente desencadeada. Células do sistema imune, como as apresentadoras de antígenos (APC), possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRR) que reconhecem estruturas microbianas conservadas, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (Matzinger, 2002). Componentes virais como a presença de RNAfd, são reconhecidos por diferentes classes desses receptores, principalmente *Toll-like 3* (TLR 3), RIG-1 e MDA5 (Takeuchi and Akira, 2008; Pott *et al.*, 2012). A cascata de sinalização gerada a partir deste reconhecimento, principalmente por células dendríticas e macrófagos, leva à ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e o interferon (IFN), resultando na redução da replicação e disseminação do vírus (Takeuchi and Akira, 2008; Angel *et al.*, 2012; Holloway and Coulson, 2013).

Além de desempenhar este papel regulatório inicial, a resposta imune inata é potencialmente importante para a intensidade e longevidade da resposta imune adaptativa (Cervantes-Barragan *et al.*, 2012). Isso porque os produtos gerados a partir dela, como os IFNs α e β , por exemplo, têm importante efeito imunomodulador, incluindo a ativação de células dendríticas e expansão e diferenciação de células B produtoras de anticorpos e células T específicas (Seo and Hahm, 2010), além de regular o ciclo celular e a apoptose

(Bonjardim *et al.*, 2009). Outro exemplo da importância da imunidade inata para a geração de uma resposta adaptativa eficaz é o processamento dos antígenos de RV por células dendríticas e macrófagos nas placas de Peyer, que são agregados linfonodulares que compõem o tecido linfoide associado ao intestino (em inglês, *Gut Associated Lymphoid Tissue* ou GALT). Lá, estes antígenos são apresentados aos linfócitos T auxiliares (T CD4⁺) que promovem uma série de eventos, culminando na estimulação da ativação específica dos linfócitos B e T (diferenciação em células com poder citotóxico e secreção de citocinas) (Offit, 1996).

As células B produzem anticorpos contra proteínas específicas do vírus e as células T reconhecem através do complexo principal de histocompatibilidade (em inglês, *major histocompatibility complex* ou MHC), células infectadas que estejam expondo epítomos do RV na sua superfície celular (Desselberger, 2014). Anticorpos específicos contra as proteínas estruturais VP4 e VP7 são neutralizantes *in vitro* e protetores *in vivo*, como demonstrado por transferência passiva em modelos animais como camundongos e porcos gnotobióticos (Franco and Greenberg, 1997; Jiang *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2011). No entanto, a proteção contra a infecção de RV não é correlacionada somente com a concentração destes dois anticorpos neutralizantes. Há também a produção de anticorpos contra outras proteínas estruturais e não estruturais como VP2, VP6 e NSP4, respectivamente (Desselberger, 2014). Burns e colaboradores demonstraram que anticorpos específicos anti-VP6 da classe IgA eram protetores *in vivo* e que esta classe de imunoglobulina é considerada um consistente marcador de imunidade contra o rotavírus, já que é o anticorpo predominante nas mucosas (Burns *et al.*, 1996). Estes anticorpos específicos anti-VP6 são denominados IgA secretória (sIgA) e recentemente foi atribuída a eles a função neutralizante intracelular. Foi comprovado que receptores presentes na membrana basolateral de células epiteliais intestinais reconhecem estes anticorpos e os transportam para dentro do lúmen caracterizando um processo denominado “transcitose de sIgA”. Uma vez dentro das células, os anticorpos neutralizam as DLPs recém sintetizadas formando complexos, prevenindo assim a maturação de TLPs (Feng *et al.*, 2002; Corthésy *et al.*, 2006; Aiyegbo *et al.*, 2013; Sapparapu *et al.*, 2014).

Bernstein e colaboradores, observaram que a concentração de IgA específica nas fezes atingiu o pico máximo entre 14 e 17 dias após a infecção e persistiu por mais de um ano, em concentrações decrescentes (Bernstein *et al.*, 1989). No entanto, a IgA é frequentemente indetectável no fluído duodenal ou nas fezes na primeira semana da infecção, apesar dos sinais clínicos desaparecerem dentro deste tempo (Offit, 1996). Este padrão sugere um mecanismo independente da imunidade humoral. Os autores ainda ressaltam que células epiteliais maduras das vilosidades infectadas são imediatamente substituídas por enterócitos

imaturos, que podem ser menos suscetíveis a invasão do rotavírus. O aumento do peristaltismo melhora o *clearance* das partículas virais e a atividade dos interferons, prevenindo a tradução das proteínas estruturais virais. Já foi reportada correlação entre a concentração plasmática de interferon e diarreia de menor duração entre pacientes infectados pelo rotavírus (De Boissieu *et al.*, 1993).

Apesar de muitos autores presumirem que a infecção do rotavírus irá conferir imunidade protetora, casos de reinfecção são bastante comuns (Velázquez *et al.*, 1996), até mesmo em indivíduos vacinados. Durante o período neonatal, a infecção não protege contra uma futura reinfecção durante os três primeiros anos de vida, porém, estas infecções subsequentes são mais brandas (Velázquez *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 2002). Portanto, apesar de quase todos os adultos apresentarem anticorpos para rotavírus (Kapikian *et al.*, 1983), eles ainda podem ser suscetíveis à infecção, pois diversos mecanismos de escape ao sistema imune do hospedeiro contribuem para infecções repetidas (Jiang *et al.*, 2002). Há múltiplos grupos, subgrupos e sorotipos de rotavírus. A resposta inicial pelos anticorpos a infecção é sorotipo específica, com limitada reação cruzada dos anticorpos (Jiang *et al.*, 2002). No entanto, subsequentes infecções aumentam a diversidade de anticorpos, tendo maior chance de reação cruzada com múltiplos sorotipos (Jiang *et al.*, 2002). O título de anticorpos tem pico em crianças de um a três anos, mas posteriormente cai para concentrações quase indetectáveis em indivíduos acima de 70 anos (Elias, 1977).

Acredita-se que a proteção contra os RV envolva anticorpos locais (mucosas), sistêmicos e a resposta imune celular (Offit *et al.*, 1986). Basicamente o que há na literatura a respeito da resposta imune durante a infecção por RV se refere à resposta imune humoral. Investigações sobre o papel da imunidade celular na infecção por RV são realizadas principalmente através da utilização de modelos animais e cultura de células (Offit, 1996; Angel *et al.*, 2012), entretanto, até o momento, poucos modelos como coelhos, camundongos lactentes e porcos gnotobióticos mimetizam a infecção de RV em crianças (Molyneaux, 1995). Por esta razão, ainda há uma lacuna no entendimento do papel efetivo da resposta imune celular durante a infecção por rotavírus.

1.1.7. A Rotavírose

1.1.7.1. Clínica

A primeira infecção pelo rotavírus normalmente ocorre em crianças entre seis meses a dois anos de idade. Nesta fase há maior risco da doença grave, a qual requer internação hospitalar (Crawley *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 2002). Infecções em neonatos ocorrem, mas

muitas vezes assintomáticas ou leves, possivelmente por causa da proteção de anticorpos da mãe passados através do leite materno. Três ou mais infecções podem acometer 42% das crianças com dois anos de idade, e os sinais clínicos são abrandados a cada reinfeção (Velázquez *et al.*, 1996; Gladstone *et al.*, 2011). Em um estudo realizado no México com crianças acompanhadas desde o nascimento, foi descrito que com dois anos de idade 96% das crianças já haviam sido infectadas pelo rotavírus uma vez, enquanto aproximadamente 70% já haviam sido infectadas duas vezes. Mais de 10% das crianças estudadas tiveram cinco ou mais infecções (Velázquez *et al.*, 1996). Yolken e colaboradores haviam descrito previamente que em crianças com dois anos de idade, mais de 85% tinha anticorpos para dois sorotipos diferentes de rotavírus (Yolken *et al.*, 1978).

A infecção é ubíqua e o espectro clínico da rotavirose pode variar da doença subclínica ou diarreia aquosa moderada autolimitada à diarreia profusa com vômito e febre, que pode resultar em desequilíbrio hidroeletrolítico, choque e morte (Parashar *et al.*, 2013). Em todos os grupos etários, a apresentação clássica é de febre e vômito por dois a três dias, seguida por diarreia aquosa (Grimwood *et al.*, 1988), no entanto, a diarreia pode ser profusa e a ocorrência de 10 a 20 episódios por dia é habitual (Anderson and Weber, 2004). Aproximadamente 30-40% das crianças apresentam febre moderada (39°C a 40°C). Quando há episódios de vômito, estes duram de um a dois dias, mas especialmente quando associada a esta condição, a diarreia por rotavírus pode ser acentuada e com desidratação fatal. Apesar de a gastroenterite ser a principal manifestação da infecção por rotavírus, sinais clínicos neurológicos também já foram descritos, como convulsões (comumente afebris), encefalopatia e cerebelite (Dickey *et al.*, 2009). Outras manifestações clínicas, tais como, síndrome de morte súbita em crianças, enterocolite necrosante e intussuscepção, têm sido associadas à gastroenterite por rotavírus, porém, ainda sem confirmação (Parashar *et al.*, 2013).

Uma apreciação da apresentação típica da infecção pelo rotavírus em crianças é fundamental para a compreensão do quadro clínico da doença em adultos. Normalmente a infecção em adultos é subclínica, mas pode ser grave, particularmente em indivíduos com idade mais avançada, apresentando assim amplo espectro de manifestações clínicas (Anderson and Weber, 2004). Tendo em vista a amplitude da sintomatologia nesta faixa etária, é difícil fornecer uma descrição concisa da apresentação clínica característica. Estudos prospectivos de voluntários jovens adultos que ingeriram rotavírus fornecem alguns esclarecimentos (Kapikian *et al.*, 1983; Ward *et al.*, 1986; Ward *et al.*, 1989; Ward *et al.*, 1990). Nestes estudos, frequentemente, o tempo de incubação do rotavírus foi de dois a seis dias após a ingestão do vírus e a doença teve curso clínico de um a quatro dias (Anderson and Weber,

2004). Cerca de 2/3 dos participantes tiveram produção de anticorpos, com mais da metade de todos os participantes eventualmente eliminando vírus nas fezes. Sinais clínicos são menos comuns que a evidência da infecção, mas a maioria incluía diarreia, febre, dor de cabeça, mal-estar, náusea ou cãimbra. As partículas de vírus foram detectadas nas fezes desde o início do quadro clínico e persistiram por mais de dez dias em alguns casos. Já foram descritos casos com eliminação viral de até 35 dias (Mori *et al.*, 2002). No estudo em uma universidade americana durante um surto de rotavírus entre os estudantes, de 83 indivíduos confirmados para a infecção, 93% tiveram diarreia, 90% dores abdominais ou desconforto, 83% perda de apetite, 81% náusea, e mais de 50% tiveram fadiga, vômito, dor de cabeça, calafrios, febre ou mialgia (CDC, 2000).

Pacientes com imunodeficiência têm maior risco de aparição dos sintomas e disseminação prolongada do vírus podendo chegar a um ano ou mais, representando assim, um potente reservatório da infecção, fenômeno já descrito em crianças (Saulsbury *et al.*, 1980; Glass *et al.*, 2014).

1.1.7.2. Epidemiologia

O rotavírus é a principal causa de gastroenterite grave em crianças e é responsável anualmente por aproximadamente 25 milhões de visitas clínicas, dois milhões de internações hospitalares, e de 200 mil mortes em crianças abaixo de cinco anos de idade em todo o mundo (Tate *et al.*, 2012; Lanata *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2013). Esta virose infecta quase todas as crianças entre três a cinco anos de idade em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Apesar da infecção por rotavírus estar presente no mundo todo, a maior parte das mortes ocorre nos países em desenvolvimento (Chang *et al.*, 2003).

Uma revisão que compilou 131 estudos de vigilância publicados de 2001 a 2011 encontrou que o rotavírus foi diagnosticado em 33-49% dos casos de gastroenterites registrados em diferentes regiões geográficas e com variados níveis de mortalidade infantil (Tate *et al.*, 2012). No entanto, mais de 90% das mortes por rotavírus ocorreram em países de baixa renda na África subsaariana e sul da Ásia (Figura 1.5), provavelmente pela falta de assistência médica e ausência de saneamento básico (Patel, Steele, *et al.*, 2011; Tate *et al.*, 2012). Além disso, nestes países, a fome atinge grande parte da população o que gera inúmeros casos de desnutrição. Existem alguns agentes patogênicos entéricos que são comumente encontrados em crianças mal nutridas, e esses agentes frequentemente variam pelo estado nutricional (Ferdous *et al.*, 2013). Em crianças acometidas por desnutrição, a diarreia é frequentemente mais grave e fatal, e está correlacionada à duração da mesma pelo

rotavírus (Nitiema *et al.*, 2011). Em razão da imunidade humoral e celular defectiva, os indivíduos mal nutridos, conseqüentemente estão mais sujeitos a serem acometidos por diarreia mais longa (Temu *et al.*, 2012).

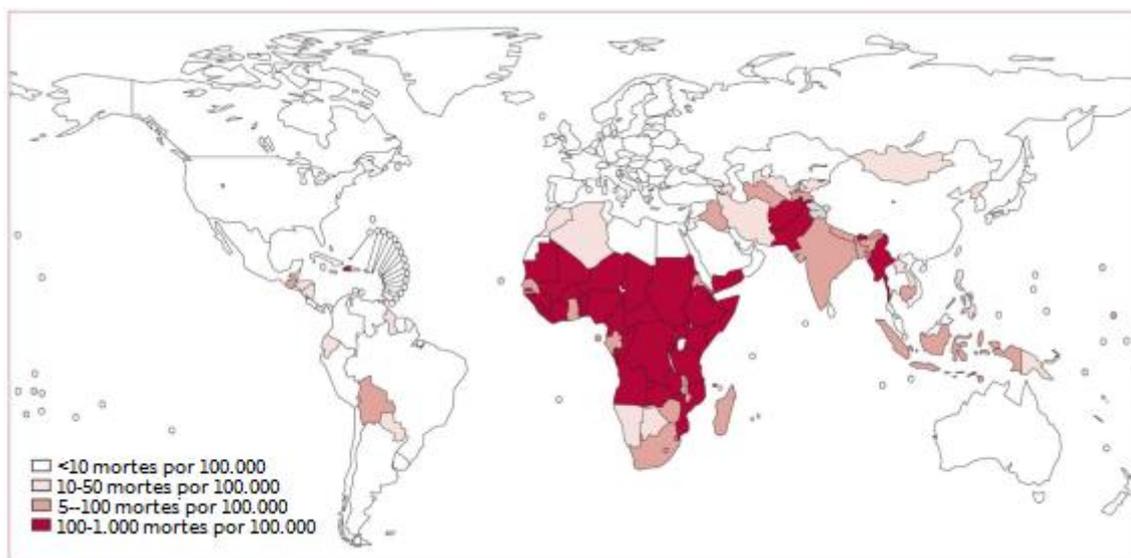


Figura 1.5 – Mortalidade pelo rotavírus em crianças menores de cinco anos em 2008. (Adaptado de Tate *et al.*, 2012)

Em climas temperados, a gastroenterite por rotavírus apresenta sazonalidade proeminente, ocorrendo especialmente durante o outono e inverno, com pouca ocorrência durante os meses do verão (Patel *et al.*, 2013). Nos países tropicais, a infecção ocorre em todas as épocas do ano, apesar da incidência frequentemente aumentar durante os meses frios e secos (Parashar *et al.*, 2013). No Brasil, a distribuição sazonal das gastroenterites por RV assume duas configurações bem distintas. As regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, exibem marcante perfil sazonal, observando-se maior prevalência nos meses com menores índices pluviométricos do ano (maio a setembro) (Gomes *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1991; Stewien *et al.*, 1993). Nos estados das regiões Norte e Nordeste, tal sazonalidade parece não se revelar tão evidente (Linhares *et al.*, 1983; Stewien *et al.*, 1993).

A maioria destas infecções é causada pelo rotavírus do grupo A, sendo esse o mais encontrado no mundo e também o grupo detectado pelos testes comerciais. Entretanto, o grupo B também é responsável por muitos surtos e parece ser limitado a infecções na Ásia, com endemicidade em certas regiões, principalmente na Índia, China e Bangladesh (Sanekata *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2004; Anderson and Weber, 2004). O grupo C é conhecido por causar doenças esporádicas que, frequentemente, passam despercebidas e desde que foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1995, tem sido encontrado em diversos países (Castello *et al.*, 2000; Sánchez-Fauquier *et al.*, 2003; Anderson and Weber, 2004), podendo causar doença tanto infectando isoladamente o indivíduo como por coinfeção com o

grupo A em locais onde este é endêmico (Cunliffe *et al.*, 2001). Apesar do grupo A ser endêmico, também pode causar surtos importantes (Marshall *et al.*, 2003; Villena *et al.*, 2003).

Dos genótipos do grupo A, no mínimo dez tipos de G e oito tipos de P causam infecções em humanos. G1-4 são os mais comuns tipos de G encontrados em todo o mundo, e P[4] e P[8] são os tipos de P mais frequentemente associados a estes primeiros. O sorotipo G1P[8] é o mais encontrado no mundo, mas outras quatro combinações, G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8], são também frequentemente encontradas, e mais de 50 isolados tipos G- e P- têm sido identificados em diferentes locais (Kostouros *et al.*, 2003; Glass *et al.*, 2014). Este padrão é visto em países desenvolvidos e em desenvolvimento, apesar de infecções mistas serem mais comumente descritas em países em desenvolvimento (Kasule *et al.*, 2003). Alguns tipos de G não usuais estão surgindo com mais frequência, especialmente o G9 (Armah *et al.*, 2003; Doan *et al.*, 2003; Kirkwood *et al.*, 2003), contudo, a distribuição genotípica varia amplamente entre as diferentes regiões.

O genótipo G1P[8] é o mais prevalente nas Américas (43%), na Europa (33%) e na região Pacífico Oeste (47%). No entanto, as prevalências de G4P[8] nos países europeus (23%) e G3P[8] na região do Pacífico Oeste (25%) são relevantes. Na região Mediterrânea Leste, G2P[4] é o genótipo mais comumente identificado (41%) seguido de uma proporção substancial de outros genótipos incomuns (31%). Dados da África e do Sudeste Asiático revelam um cenário diferente, onde genótipos incomuns como G2P[6], G3P[6], G12P[8], G12P[6] e G9P[6] são predominantes. Esses genótipos são muito significantes no total de infecções por rotavírus, 35% na África e 55% no Sudeste Asiático (Jain *et al.*, 2014). No Brasil, o G1P[8] era o mais prevalente, contudo, após a introdução da vacina monovalente no Programa Nacional de Imunizações, houve uma queda na epidemiologia deste genótipo, e o G2P[4] (51,3%) foi o mais encontrado em casos de hospitalizações por diarreia até 2011 (Ichihara *et al.*, 2014). Devido a sazonalidade dos genótipos, atualmente, o G12P[8] é o mais detectado em amostras de indivíduos com diarreia (Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental - Referência Regional em Rotavirose).

Novos genótipos de rotavírus têm surgido devido à resposta eficaz do sistema imune nos indivíduos vacinados contra os principais genótipos circulantes. Desta forma, o monitoramento da evolução dos genes da VP4 e VP7 é essencial para entender a diversidade genética e molecular do vírus nos níveis regional e global, com o fito de selecionar as proteínas que irão integrar as vacinas candidatas (Das *et al.*, 2004).

A infecção pelo rotavírus pode ser dividida em quatro formas características: doença endêmica, surtos epidêmicos, gastroenterite do viajante e infecções transmitidas de crianças para adultos (Anderson and Weber, 2004). Entre os adultos, os surtos epidêmicos por rotavírus ocorrem mais frequentemente em comunidades que de algum modo são mais protegidas de exposição a crianças infectadas pelo rotavírus (von Bonsdorff *et al.*, 1978). Surtos de rotavírus também têm ocorrido em unidades de saúde, particularmente aquelas com aglomeração, com indivíduos com imunidade comprometida e múltiplas comorbidades que podem facilitar a disseminação da infecção, como por exemplo, asilos (Ryan *et al.*, 1997). O rotavírus tem sido associado como um importante agente de diarreia dos viajantes entre adultos, especialmente entre aqueles que visitam a América Central e o Caribe (Bolivar *et al.*, 1978; Vollet *et al.*, 1979; Keswick *et al.*, 1982; Steffen *et al.*, 1999). Além de o rotavírus estar ligado a gastroenterite em adultos, principalmente aqueles que estão em contato com crianças têm maior risco de infecção. A transmissão do rotavírus ocorre simultaneamente em membros da família (Kim *et al.*, 1977; Wenman *et al.*, 1979; Grimwood *et al.*, 1983).

1.1.7.3. Diagnóstico

A gastroenterite causada por rotavírus não pode ser distinguida de outros patógenos entéricos que também causam gastroenterite somente pelo quadro clínico, portanto, o diagnóstico pode ser realizado com acurácia pela rápida detecção do antígeno viral nas amostras de fezes (Parashar *et al.*, 2013). Todavia, o rotavírus não é rotineiramente testado em pacientes com gastroenterites porque seu resultado pouco altera a conduta clínica, que indica a terapia de reidratação apropriada (Parashar *et al.*, 2013).

Quando se recorre ao diagnóstico, métodos comerciais de detecção de antígenos são os mais utilizados, tais como: ensaios imunoenzimáticos (EIA) e métodos imunocromatográficos, testes estes que possuem alta sensibilidade e especificidade (90-95%) (Yolken *et al.*, 1977; Thomas *et al.*, 1988). No entanto, o rotavírus pode ser detectado em espécimes de fezes de indivíduos com gastroenterite por vários outros métodos, incluindo microscopia eletrônica (Bishop *et al.*, 1974), isolamento viral em cultura de células (Hasegawa *et al.*, 1982), teste de aglutinação em látex (Haikala *et al.*, 1983), eletroforese em gel de poliácridamida (ácido nucléico e proteínas) (Kalica *et al.*, 1978), teste de hibridização em *dot-blot* (Flores *et al.*, 1983) e a reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR) (Wilde *et al.*, 1991).

O diagnóstico inicialmente era realizado pela microscopia eletrônica, com ou sem aglutinação por imunossoro. Como muitas partículas virais são excretadas nas fezes durante a

fase aguda da infecção, podendo chegar até a 10^{11} partículas/g (Kang *et al.*, 2004), esta técnica era corriqueiramente utilizada, pois permite a visualização da partícula, contudo o ensaio imunoenzimático tornou-se o mais comumente utilizado por ser uma técnica mais rápida e prática (Than and Kim, 2013). A eletroforese em gel de poliacrilamida detecta o RNA do rotavírus extraído diretamente de espécimes fecais, e o padrão de migração eletroforética dos 11 segmentos de RNA de dupla fita permite a análise dos isolados virais circulantes (Herring *et al.*, 1982).

A taxa de resultados falso-positivos dos testes comerciais é de 3-5% (Iturriza-Gómara *et al.*, 2000). Uma das maiores limitações destes testes é detectar somente rotavírus do grupo A (Hrdy, 1987; Rao, 1995). Outros métodos mais sensíveis estão sendo amplamente utilizados em laboratório de pesquisa, como por exemplo, a RT-PCR para detecção do genoma viral (Iturriza-Gómara *et al.*, 2004), que é até mil vezes mais sensível que os imunoenaios (Wilde *et al.*, 1991). Esta técnica resulta em dados de genotipagem da VP7 e VP4 que formam a base da classificação binária (G e P) dos isolados de rotavírus (Than and Kim, 2013).

1.1.7.4. Tratamento

O controle da gastroenterite aguda por rotavírus se concentra no tratamento e na prevenção da desidratação, alívio dos sintomas e sinais clínicos, e restabelecimento do funcionamento fisiológico normal (Parashar *et al.*, 2013). A terapia de reidratação oral e/ou intravenosa é o principal tratamento da gastroenterite aguda por rotavírus e outros agentes. A via oral é a preferida no tratamento da desidratação leve a moderada em crianças com diarreia aguda (Nelson *et al.*, 2003; Hartling *et al.*, 2006; Lawson, 2012). No entanto, para cada 25 crianças tratadas, uma não responderá ao tratamento oral e será necessária a reidratação intravenosa (Hartling *et al.*, 2006). Recomenda-se que crianças que estejam debilitadas, letárgicas, com dificuldade em realizar a hidratação oral, ou em choque, iniciar o tratamento intravenoso. A reidratação oral não deve ser utilizada em crianças com má absorção da glicose (Nelson *et al.*, 2003).

Por mais de duas décadas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou como tratamento a solução padrão de reidratação oral (sódio – 90 mmol/L, glicose – 111 mmol/L e osmolaridade total – 311 mmol/L) (Hahn *et al.*, 2002). No entanto, estudos demonstraram que quando comparada a esta solução padrão da OMS, a administração de solução de reidratação oral com osmolaridade reduzida associada com pequenas infusões de fluido intravenoso, culminou em menor volume de fezes, diminuição de episódios de vômito e diminuição do

risco de perda de sódio (Hahn *et al.*, 2002). Portanto, a partir de 2002, a OMS passou a recomendar na rotina o uso da solução com osmolaridade reduzida (sódio – 75 mmol/L, glicose – 75 mmol/L e osmolaridade total – 224 mmol/L). Para manter a hidratação infantil sem sinais de desidratação, a OMS recomenda administrar fluido extra ou essa solução de reidratação oral após cada episódio de diarreia. O volume sugerido é de 50 a 100 mL em crianças menores de dois anos de idade e de 100 a 200 mL para crianças acima desta idade (WHO, 2005). Em crianças que já estejam apresentando alguns sinais de desidratação, a OMS recomenda corrigir a hidratação ao longo de quatro horas com 75 mL/kg de solução (WHO, 2005).

Além da recomendação da OMS, inúmeros guias de avaliação e tratamento da gastroenterite aguda em crianças estão disponíveis (Gorelick *et al.*, 1997; Goldman *et al.*, 2008; Health, 2009; Allen *et al.*, 2010; Gregorio *et al.*, 2011; Service, 2011; Lewis *et al.*, 2012), e uma revisão de oito desses guias internacionais notou variações nas suas qualidades, inconsistência nas recomendações da dose da solução de reidratação oral, falta de evidências em muitas recomendações e falta de padrão nas práticas gerais (van den Berg and Berger, 2011). Os autores notaram que na prática não está claro para quem e como a terapia por reidratação oral deve ser administrada, portanto, o regime ótimo não é claro. Essas constatações sugerem uma possível razão da pouca aderência a tal guia nos países desenvolvidos. Eles concluíram que futuros estudos, particularmente na prática, necessitam determinar o valor dos sinais clínicos e sintomas para avaliar a desidratação, a dose ideal da solução de reidratação oral para cada nível de desidratação, e a validade dos motivos pelos quais os médicos prescrevem outros medicamentos.

A reidratação oral deve ser recomendada de início. Na maioria dos países em desenvolvimento, a reidratação oral com solução salina é utilizada extensivamente em crianças. No caso dos adultos podem ser estimulados a ingerir bastante líquido. Uma intervenção adicional que é utilizada é a ingestão de *Lactobacillus* spp para diminuir a duração da diarreia (Guarino *et al.*, 1997; Shornikova *et al.*, 1997). Apesar de raramente serem utilizados em crianças, medicamentos opióides, redutores da motilidade, como a codeína, loperamida e cloridato de difenoxilato podem ajudar no alívio dos sintomas e controle do volume da diarreia (Desselberger, 1999). Outros tratamentos tais como probióticos, zinco, ondansetrona, nitazoxanida e alguns compostos biológicos são eficazes no tratamento da gastroenterite aguda (Sarker *et al.*, 2001; WHO, 2005; Rossignol *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2010; Dalby-Payne and Elliott, 2011; Fedorowicz *et al.*, 2011; Lawson, 2012; Lazzerini and Ronfani, 2013; Sarker *et al.*, 2013). Porém, a recomendação de uso desses

tratamentos varia consideravelmente entre os diferentes níveis de desenvolvimento das regiões e países (Parashar *et al.*, 2013). É importante que a amamentação continue durante todo o tratamento de reidratação (WHO, 2005). A alimentação deve ser reintroduzida logo que possível, pois isso reduzirá a duração da gravidade da diarreia (Gregorio *et al.*, 2011), no entanto, alimentos com lactose devem ser evitados (Dalby-Payne and Elliott, 2011).

Se os sinais e sintomas não puderem ser controlados e os pacientes vierem a ficar desidratados, a administração intravenosa de fluídos e a internação hospitalar serão necessárias. O leite materno tem sido utilizado no auxílio da resolução da diarreia crônica em crianças imunodeficientes infectadas (Saulsbury *et al.*, 1980), e a neutralização do antígeno do rotavírus livre por imunoglobulinas também é uma abordagem terapêutica descrita na literatura (Guarino *et al.*, 1994). Guarino e colaboradores notaram uma média de duração da diarreia de 76 horas em crianças que receberam a dose oral de 300 mg/kg de imunoglobulina anti-rotavírus, comparado com 131 horas em crianças que não receberam (Guarino *et al.*, 1994). Em um estudo envolvendo três crianças imunocomprometidas com diarreia crônica por rotavírus, a administração oral de imunoglobulina (IgG 150 mg/kg) teve ação neutralizante do antígeno de rotavírus nas três, mas houve recorrência em duas (Losonsky *et al.*, 1985).

1.1.7.5. Prevenção

Não obstante crianças serem propensas à infecção por rotavírus até quatro a cinco vezes no primeiro ano de vida, a incidência de gastroenterite grave por rotavírus é reduzida a cada repetição da infecção (Velázquez *et al.*, 1996; Gladstone *et al.*, 2011). Por este motivo, vacinas orais e atenuadas foram desenvolvidas para mimetizar o efeito natural da infecção e prevenir a doença acentuada (Parashar *et al.*, 2013). Uma vacina recombinante com rotavírus humano e símio foi licenciada em 1998 nos Estados Unidos após demonstrar alta eficácia contra gastroenterite grave por rotavírus em crianças (RotaShield[®], Wyeth), porém, foi inesperadamente retirada de comercialização após um ano, pois em estudos observacionais pós-licença, diversos eventos de intussuscepção associados à vacina foram descritos (CDC, 1999; Murphy *et al.*, 2001).

A intussuscepção é uma forma de obstrução intestinal grave que requer cirurgia corretiva com alto risco de fatalidade, que ocorre pela invaginação de uma porção do intestino dentro de um segmento adjacente do próprio intestino, ocasionando assim uma obstrução estrangulante (Nakagomi, 2000; Jehangir *et al.*, 2014). A oculsão das artérias mesentéricas do segmento intestinal invaginado, eventualmente acarreta em necrose isquêmica e resulta em perfuração e peritonite (DiFiore, 1999). No período de 1998 a 1999, a vacinação de 10.000

crianças com RotaShield® foi relacionada a casos de intussuscepção (CDC, 1999; Murphy *et al.*, 2001; Parashar *et al.*, 2013).

Atualmente, duas outras vacinas orais atenuadas, uma pentavalente de rearranjo bovino-humano (RotaTeq®, Merck & Co, Inc) e outra monovalente humana (Rotarix®, GlaxoSmithKline Biologicals), estão licenciadas e disponíveis desde 2006 e têm sido implementadas em vários países, enquanto a RotaShield® foi descontinuada (Parashar *et al.*, 2013). No entanto, antes de terem a licença liberada, ambas foram testadas em ensaios clínicos com 60.000-70.000 crianças cada, para avaliar o risco de intussuscepção (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006; Vesikari *et al.*, 2006). As vacinas apresentaram 85-98% de eficácia contra gastroenterite grave por rotavírus nestes testes clínicos conduzidos nas Américas e Europa, também com boa proteção contra doença causada pelo rotavírus de genótipos não incluídos na vacina (Parashar *et al.*, 2013). Estudos adicionais das vacinas estão em andamento para avaliar a eficácia em países de baixa renda, como os africanos e do Sudeste Asiático, onde o desempenho da vacina pode ser afetado por fatores como infecções entéricas simultâneas e a grande prevalência de genótipos incomuns de rotavírus (CDC, 2008; Nelson and Glass, 2010; Glass *et al.*, 2014). Diferentes aspectos como composição, dose, número de doses, esquema de imunização e contraindicações das duas vacinas estão descritos no Quadro 1.1.

Quadro 1.1 – Aspectos das vacinas Rotarix® e RotaTeq®. (Adaptado de Parashar *et al.*, 2013)

Aspecto	Rotarix®	RotaTeq®
Composição	Um isolado de rotavírus humano (P1A[8], G1)	Rearranjo de cinco isolados de rotavírus humano G/P com um isolado de rotavírus bovino WC3 (P7[5],G6): G1×WC3; G2×WC3; G3×WC3; G3×WC3; P1A[8]×WC3
Número de doses	2 doses orais	3 doses orais
Esquema de imunização*	1ª Dose: 6 semanas de idade no mínimo; 2ª Dose: 4 ou mais semanas depois. Última dose aplicada no máximo com 24 semanas de idade	1ª Dose: 6-12 semanas de idade; 2ª e 3ª Doses: 4-10 semanas de intervalo Última dose aplicada no máximo com 32 semanas de idade
Dose	Cada dose (1-1,5 mL) contendo pelo menos 10 ⁶ doses infectantes em cultura de células	Cada dose (2 mL) contendo pelo menos 2,0-2,8x10 ⁶ unidades infectantes por rearranjo

*A idade de aplicação das doses varia de acordo com as recomendações de cada país e seus programas de imunização.

Atualmente, a vacina de rotavírus foi adotada no programa nacional de imunizações de 75 países, no entanto, em mais de 100 países também está disponível em clínicas particulares (PATH, 2015). No Brasil, a Rotarix[®] é a vacina oferecida pelo Sistema Único de Saúde desde 2006. Um estudo de revisão sistemático em oito países relatou um declínio de 49-89% em atendimentos hospitalares por rotavírus e 17-55% de redução em todos os casos de atendimentos hospitalares por gastroenterite em crianças menores de cinco anos nos dois primeiros anos de introdução da vacina (Patel *et al.*, 2012). Inesperadamente, a vacinação por rotavírus também resultou na diminuição da rotavírose em crianças que não eram mais elegíveis para vacinação, como crianças com idades mais avançadas (Gastañaduy *et al.*, 2013). Esse fenômeno, conhecido como epidemia vacinal, ou vulgarmente chamado de “vacinação em rebanho”, provavelmente está relacionado à redução da transmissão do rotavírus na população. A redução de infecções nosocomiais por rotavírus também tem sido relatada desde a introdução da vacina (Zlamy *et al.*, 2013). Estudos realizados no México e Brasil demonstraram declínio de 35% e 22% de morte de crianças por diarreia, respectivamente, desde a introdução da vacina (Richardson *et al.*, 2010; do Carmo *et al.*, 2011), e esta redução tem sido sustentada por quatro anos no México. Esses achados são particularmente notáveis, pois a eficiência na diminuição na proporção de óbitos não foi avaliada em testes pré-clínicos da vacina (Parashar *et al.*, 2013).

Estudos observacionais pós-licença em muitos países, incluindo Estados Unidos, Austrália, México e Brasil, também têm identificado um pequeno risco de intussuscepção pelas duas vacinas (Patel, López-Collada, *et al.*, 2011; Carlin *et al.*, 2013; Haber *et al.*, 2013). Os benefícios da vacinação para saúde pública em números de episódios de gastroenterite grave por rotavírus a cada cem crianças foram maiores nos países em desenvolvimento, isto se deve pela grande incidência de casos nesses países. Diante disso, em 2009 a OMS recomendou a inclusão da vacina no programa de imunização desses referidos países (Parashar *et al.*, 2013).

1.2. Imunoglobulina Y

1.2.1. Histórico

A geração de anticorpos específicos a antígenos de forma rápida, não-invasiva, associada a elevada relação custo-benefício, e a aplicação no diagnóstico e na imunoterapia, é de grande importância na pesquisa em saúde pública (Stockwin and Holmes, 2003a; b). Tradicionalmente, os modelos animais mais escolhidos para produção de anticorpos monoclonal e policlonal são os mamíferos, principalmente lagomorfos e roedores. Nestes animais, a produção envolve a imunização e as repetidas sangrias ou eutanásia para esplenectomia, que é pré-requisito para a preparação dos anticorpos monoclonais (Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009).

Em 1893, Klemperer demonstrou que a imunização de uma ave resultou na transferência de anticorpos específicos do soro para a gema do ovo (Klemperer, 1893 apud Schade *et al.*, 2005). Por mais de cem anos, este achado não foi utilizado cientificamente, mas a partir do momento que o bem-estar animal tornou-se prioridade no meio científico, os resultados de Klemperer atraíram uma grande atenção, especialmente a partir dos anos 1980. Nesta época, iniciativas pioneiras vindas do Japão começaram a chamar séria atenção para a tecnologia da imunoglobulina Y (IgY) que constituía um campo relativamente novo dentro das disciplinas biofarmacêuticas. Com a acessibilidade de produtos com IgY, como alimentos funcionais, na última década nos mercados japoneses e de países do Leste Asiático, o impacto prático da IgY para aplicações humanas criou ondulações na esfera biomédica com amplo potencial começando a ser explorado somente agora. O relativo baixo custo da produção de anticorpos por meio dos ovos de aves é uma característica muito atrativa da IgY. A necessidade por uma alternativa de baixo custo contra agentes infecciosos tornou-se ainda mais urgente com a escalada acentuada nos custos dos cuidados em saúde, a perspectiva de envelhecimento da população em muitos países desenvolvidos e a escassez de recursos financeiros entre as economias dos países em desenvolvimento. Da mesma forma, com a tendência atual entre os consumidores mudando de produtos sintéticos para materiais naturais com propriedades curativas, proporcionou um novo impulso para o crescimento de espaço no mercado para IgY. Como um alimento funcional, a IgY está bem posicionada para expandir o seu nicho tanto na área farmacêutica como de suplementos alimentares (Rahman *et al.*, 2013).

Justifica-se, portanto, o uso de frangas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) no processo de produção de anticorpos policlonais pela deposição dos mesmos na gema do ovo, fato que descarta a necessidade de procedimentos invasivos e dolorosos que envolvem a

obtenção dos anticorpos séricos. Quanto ao rendimento, o emprego desta metodologia implica na redução no número de animais usados, pois a produção dos anticorpos nas aves poedeiras é quase dez vezes maior que em coelhos (Svendsen Bollen *et al.*, 1996). A denominação IgY tem origem da expressão inglesa *egg yolk immunoglobulin*, segundo Klemperer (Klemperer, 1893), que em português significa “anticorpo da gema do ovo”.

1.2.2. O anticorpo

A IgY é isolada da gema do ovo de alguns vertebrados tais como aves e répteis (Leslie and Clem, 1969; Hädige and Ambrosius, 1984), e representa a principal imunoglobulina presente no soro destes animais (Sun *et al.*, 2001). A mesma difere estruturalmente da IgG de mamíferos, e está presente no soro e na gema do ovo das aves, tendo maior concentração na gema (Rose *et al.*, 1974; Larsson *et al.*, 1993).

Como descrito há mais de cem anos, aves têm a capacidade de transferir anticorpos maternos do soro para a gema do ovo com a finalidade de conferir imunidade passiva para o embrião e para o neonato (Klemperer, 1893). De acordo com a literatura, a tecnologia de IgY (Fischer *et al.*, 1996) oferece muitas vantagens: (i) não há sangria do animal, pois somente a coleta dos ovos é necessária após a imunização; (ii) o isolamento da IgY é rápido e simples; (iii) pequenas quantidades de antígeno são requeridas para obter altos e duradouros títulos de IgY na gema do ovo de aves imunizadas; e (iv) a manutenção das aves é de baixo custo (Gottstein and Hemmeler, 1985; Gassmann *et al.*, 1990; Hatta *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 1996; Schade and Hlinak, 1996; Tini *et al.*, 2002).

É importante afirmar que proteínas conservadas de mamíferos exibem elevado grau de imunogenicidade nas aves, justificada pela grande distância filogenética, gerando anticorpos com alta avidéz e baixa reação cruzada às proteínas humanas. Isto confere maior imunogenicidade às proteínas não habitualmente presentes em aves (Jensenius *et al.*, 1981; Lösch *et al.*, 1986; Stuart *et al.*, 1988; Gassmann *et al.*, 1990; Larsson and Sjöquist, 1990; Larsson *et al.*, 1991; Ermeling *et al.*, 1992; Larsson *et al.*, 1993; Rosol *et al.*, 1993; Svendsen *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1996; Schade and Hlinak, 1996; Tini *et al.*, 2002; Huang and Fang, 2008).

Outra característica relevante é a região Fc (da expressão inglesa *Fragment crystallizable* - Fragmento cristalizável) da IgY que não se liga a receptores Fc de mamíferos, além de não ativar o sistema complemento, ou interagir com fator reumatoide (FR) e anticorpos anti-mouse produzidos em humanos (HAMA), aumentando assim significativamente a aplicabilidade da IgY como anticorpo de captura, o que possibilita a

diminuição de resultados falso positivos quando empregados em testes de diagnóstico ou mesmo seu emprego na citometria de fluxo (Boscatto and Stuart, 1988; Larsson *et al.*, 1991; Larsson *et al.*, 1992; Akita and Nakai, 1993; Larsson *et al.*, 1993; Warr *et al.*, 1995; Carlander *et al.*, 2000; Dávalos-Pantoja *et al.*, 2000; Tini *et al.*, 2002; Huang and Fang, 2008).

De um modo geral, muitos tipos de antígenos podem ser utilizados para induzir a produção de IgY antígeno-específica, tais como: proteínas, bactérias, vírus, parasitas, fungos, polipeptídeos, hormônios, toxinas, entre outros (Schade *et al.*, 2005).

1.2.3. Propriedades moleculares da IgY

1.2.3.1. Estrutura

Historicamente, a IgY era chamada de IgG, no entanto, tornou-se claro que esta denominação é inadequada em consequência de diferenças estruturais entre as duas moléculas. Essas diferenças estruturais da molécula de IgY são refletidas nas diferentes interações moleculares e bioquímicas (Schade *et al.*, 2005). Agora sabe-se que esta imunoglobulina é evolutivamente a precursora das imunoglobulinas IgG e IgE de mamíferos (Warr *et al.*, 1995).

A estrutura geral da molécula da IgY consiste de duas cadeias pesadas (H – *heavy*) idênticas e duas cadeias leves (L – *light*) também idênticas, que são ligadas por pontes dissulfeto. A cadeia leve da IgY consiste de um domínio variável (V_L), e um domínio constante (C_L), similar a IgG de mamífero (Figura 1.6). Porém, a ligação dissulfeto intra-cadeia entre o domínio V_L e o domínio C_L da cadeia leve, que estabiliza a estrutura da cadeia leve da IgG de mamífero é ausente na cadeia leve da IgY e, assim as forças intra-moleculares da IgY são mais fracas que da IgG de mamífero (Shimizu *et al.*, 1993).

A cadeia pesada da IgY contém um domínio variável (V_H) e quatro domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4}), diferente da IgG de mamífero que tem três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) (Figura 1.6) (Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009). Em adição, a molécula de IgY é menos flexível quando comparada à IgG devido à ausência da região de dobradiça (Warr *et al.*, 1995). Na cadeia pesada da IgG, os domínios C_{H1} e o C_{H2} são separados por esta região de dobradiça, que dá considerável flexibilidade ao fragmento Fab (da expressão inglesa *Fragment antigen binding* - Fragmento que se liga ao antígeno). Em contraste, a cadeia pesada da IgY não possui esta região, possui somente resíduos de prolina e glicina nas regiões entre dos domínios C_{H1} - C_{H2} e C_{H2} - C_{H3} , que conferem certa flexibilidade à molécula (Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009).

Comparações das sequências dos domínios na IgG e na IgY têm mostrado que os domínios C_{H2} e C_{H3} da IgG são equivalentes aos domínios C_{H3} e C_{H4} da IgY, respectivamente. O equivalente do domínio C_{H2} da IgY não existe na cadeia pesada da IgG (Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009). Como na IgG, a porção Fc da IgY é o sítio de maior parte das funções biológicas efetoras. Esta contém dois carboidratos lateralmente às cadeias, em contraste da IgG que possui somente um carboidrato (Figura 1.6) (Schade *et al.*, 2005; Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009).

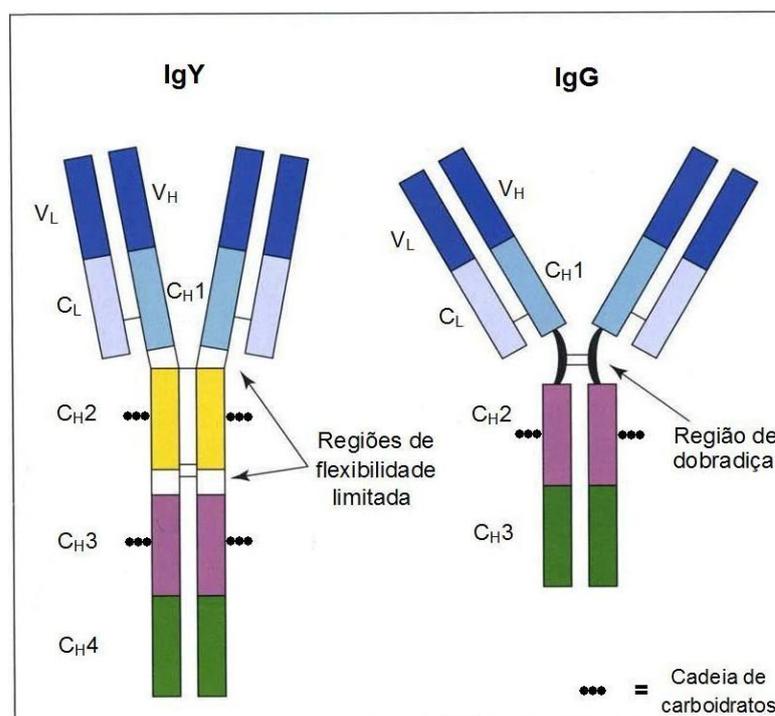


Figura 1.6 – Representação esquemática da IgY de aves e da IgG de mamíferos. (Adaptado de Warr *et al.*, 1995)

A IgY tem peso molecular de aproximadamente 180 kDa, ou seja, mais pesada que a IgG de mamíferos (aproximadamente 150 kDa) (Shimizu *et al.*, 1993). O peso molecular da cadeia pesada da IgY é de 70 kDa, enquanto a cadeia pesada da IgG de mamífero pesa 50 kDa. Ambos os anticorpos possuem o mesmo peso de cadeia leve: 21 kDa (Hatta *et al.*, 1993). O elevado peso molecular da IgY se deve ao número aumentado de domínios constantes e cadeias de carboidratos contidos na cadeia pesada (Warr *et al.*, 1995).

1.2.3.2. Estabilidade

A estabilidade da IgY frente à variação de pH tem sido estudada em várias condições. Verificou-se que a atividade da IgY diminuiu em pH 3,5 ou mais ácido e foi quase completamente perdida em pH 3 (Shimizu *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1993). A rápida diminuição da atividade da IgY em pH baixo indica mudança conformacional

e dano na porção Fab, incluindo o local de ligação ao antígeno. Sob condições alcalinas, a atividade da IgY não se alterou até atingir pH 11, reduzindo significativamente em pH 12 ou superior (Shimizu *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1993). Resultados semelhantes foram reportados por outros autores, tanto nas condições ácidas como alcalinas (Lösch *et al.*, 1986; Hatta *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002).

A IgY é relativamente resistente à tripsina ou à quimiotripsina, mas é bastante sensível à pepsina. Hatta e colaboradores demonstraram que quase toda atividade da IgY é perdida após incubação com pepsina e que 61% da atividade é perdida depois de oito horas de incubação com tripsina (Hatta *et al.*, 1993). A estabilidade da IgY contra a pepsina aparenta ser altamente dependente do pH e da razão enzima/anticorpo. Em pH 5 ou maior, IgY foi bastante resistente à pepsina e manteve sua ligação ao antígeno e atividade de aglutinação de células, no entanto, em pH 4,5 ou abaixo, ambas as atividades foram perdidas (Shimizu *et al.*, 1988). Os resultados de Hatta *et al.*, que também observaram o comportamento da IgY com pepsina sob diferentes tempos de incubação e pH, confirmaram a susceptibilidade da IgY a esta enzima em baixos valores de pH. A incubação de IgY com pepsina a pH 2 resultou em hidrólise completa da molécula do anticorpo, deixando somente pequenos peptídeos. Entretanto, incubação com pepsina a pH 4 manteve 91% e 63% da atividade após incubações de uma e quatro horas, respectivamente (Hatta *et al.*, 1993).

Sobre a estabilidade da IgY sob diferentes condições térmicas, Shin *et al.* encontraram que a IgY foi estável a 40°C, porém perdeu aproximadamente 20% da sua atividade a 60°C por 10 minutos (Shin *et al.*, 2002). Shimizu *et al.* e Hatta *et al.* encontraram resultados parecidos e demonstraram também que acima de 70°C a IgY perdeu grande parte de sua atividade (Shimizu *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1992; Hatta *et al.*, 1993). O anticorpo perdeu mais de 90% de sua atividade quando aquecido a 80°C (Chang *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2002). Pelo fato da IgY ser estável a 60°C, esta tolera o processo de pausterização para diminuição da carga microbiana (Shin *et al.*, 2002).

Congelamento ou liofilização da IgY não afetam sua atividade, a menos que esses processos sejam repetidos várias vezes (Shimizu *et al.*, 1988). Fu e colaboradores também demonstraram que a IgY pode ser liofilizada e as propriedades físicas, biológicas e de neutralização são mantidas. A atividade de ligação da imunoglobulina se manteve inalterada no teste imunoenzimático (ELISA), e testes de estabilidade demonstraram que a atividade de ligação não diminuiu significativamente, mesmo quando a IgY liofilizada era submetida a 90°C durante quinze minutos, ilustrando a estabilidade térmica da liofilização. A atividade também permaneceu inalterada sob condições ácidas de pH 2 a 7 após tratamento a 37°C por

duas horas. Ademais, a atividade também se manteve durante mais de cinco meses de armazenamento a -20°C , 4°C ou temperatura ambiente (Fu *et al.*, 2006).

A região Fc é a parte mais hidrofóbica na molécula do anticorpo, e como esta região é maior na IgY que na IgG, a molécula de IgY é mais hidrofóbica que a molécula de IgG (Dávalos-Pantoja *et al.*, 2000). A IgY também é relativamente estável a pressão, não havendo inativação até 4.000 kg/cm^2 (Shimizu *et al.*, 1994).

1.2.4. Rendimento

Frangas acumulam altos teores de IgY na gema e são consideradas eficientes produtoras de anticorpos (Gottstein and Hemmeler, 1985) e a quantidade total de IgY na gema do ovo é relativamente constante (0,6%) independente da raça da franga, do peso do ovo, da produção do ovo ou período experimental (Li *et al.*, 1998). Resultado semelhante sobre concentração de IgY durante a imunização de frangas, já havia sido relatado (Shimizu *et al.*, 1988; Sunwoo *et al.*, 1996).

Shin *et al.* estimaram que 1 mL de gema de ovo continha 9,4 mg de IgY, sendo que cada ovo tem aproximadamente 10 mL de gema (Shin *et al.*, 2002). Supondo que uma ave coloque aproximadamente 240 ovos (2.400 mL de gema de ovo) por ano, estima-se que uma ave imunizada teria um rendimento de aproximadamente 23 g de IgY por ano. Akita *et al.* e Chalghoumi *et al.* encontraram dados similares (Akita and Nakai, 1992; Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009). Importante ressaltar que esses resultados são de somente uma ave e uma franga poedeira pode colocar ovos durante dois anos com uma média de vinte ovos por mês (Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009).

O rendimento de IgY pode ser comparado a IgG obtida a partir de métodos de imunização convencionais; 200 mg de IgG podem ser obtidos mensalmente, enquanto que, pelos cálculos demonstrados, a IgY rende aproximadamente 2 g por mês, ou seja, a IgY possui rendimento dez vezes maior (Schade *et al.*, 1994). Svendsen e colaboradores obtiveram dados que corroboram estes valores, onde a produção de anticorpos em aves, utilizando a gema de ovo como fonte dos anticorpos, era de cinco a dez vezes maior que a produção em coelho (Svendsen Bollen *et al.*, 1996).

1.2.5. Conteúdo da gema

Água, lipídios e proteínas são os principais constituintes da gema do ovo, onde a água representa aproximadamente 50% do total. A parte lipídica é aproximadamente um terço da

gema e contém triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol. As proteínas compõem de 15 a 17% da gema, e podem ser separadas em duas frações principais pela centrifugação; a granular (fluido precipitado) e o plasma (fluido sobrenadante claro) (Li *et al.*, 1998; Kovacs-Nolan *et al.*, 2005).

A fração granular possui 22% das proteínas totais da gema, sendo composta por 70% de lipoproteínas de alta densidade (HDL: α - e β -lipovitelinias), 16% de fosvitina (glicofosfoproteína) e 12% de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Burley and Cook, 1961). A fração de plasma possui 78% das proteínas totais da gema, sendo composta por 86% de LDL e 14% de livetinas (McCully *et al.*, 1962). As livetinas são glicoproteínas globulares livres de lipídios, solúveis em água, e que são divididas em três classes: α -, β - e γ -livetinas (Bernardi and Cook, 1960). A IgY é a proteína predominante da γ -livetinas (Kovacs-Nolan and Mine, 2005; Nilsson, Hanrieder, *et al.*, 2008).

Mann e colaboradores afirmam que foram os primeiros a identificar algumas proteínas plasmáticas na gema do ovo (Mann and Mann, 2008). Nilsson *et al.* também encontraram algumas proteínas plasmáticas, tais como: fibrinogênio, hemopexina e o fator de coagulação IX (Nilsson, Hanrieder, *et al.*, 2008). Proteínas que são conhecidamente pertencentes à clara do ovo também já foram encontradas na gema (Nilsson *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2007; Mann and Mann, 2008). Exemplos destas proteínas encontradas tanto na clara como na gema são: ovoalbumina, ovomucóide, ovotransferrina, cistatina e ovoinibidores. Interessantemente, a ovotransferrina e a cistatina apresentam atividade antibacteriana, enquanto a ovomucóide e a ovoinibidor têm atividade antiviral, sendo que algumas destas proteínas mencionadas também são imunoestimulatórias (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005). As lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL) que estão presentes em alta quantidade na gema do ovo (Luo *et al.*, 2010), também foram relatadas pelo efeito antibacteriano (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005). Um número de apolipoproteínas foi detectado no purificado de IgY: apolipoproteína A1, apolipoproteína B, vitelogeninas 1 e 2, e apovitelinina 1 (Nilsson, Hanrieder, *et al.*, 2008). Estes dados demonstram que outras proteínas presentes no purificado de IgY podem gerar efeitos positivos adicionais em tratamentos que utilizem a IgY, além do efeito primário dos anticorpos (Nilsson, Hanrieder, *et al.*, 2008).

Determinar a concentração de colesterol no preparado de IgY para o fim da administração oral é interessante, uma vez que a alta concentração deste pode contribuir para elevação do colesterol plasmático (LDL e HDL) após a ingestão de qualquer produto contendo IgY. A quantidade de colesterol e triglicerídeos é baixa, onde a concentração de colesterol é aproximadamente dez vezes menor que o nível normal no soro humano, portanto,

de acordo com Nilsson e colaboradores, em uma possível imunoterapia, a ingestão diária de IgY não afetaria os níveis de colesterol e triglicerídeos (Nilsson, Hanrieder, *et al.*, 2008). Alguns autores compartilham deste pensamento, e descreveram que o consumo de ovo não necessariamente afeta os níveis de colesterol sérico (Dawber *et al.*, 1982; Qureshi *et al.*, 2007), podendo inclusive, gerar o efeito contrário, o consumo de ovo diminuiria os níveis de colesterol sérico (Song and Kerver, 2000).

1.2.6. Transferência da IgY para gema do ovo

Três classes de imunoglobulinas, que são distinguidas em concentração, estrutura e funções imunoquímicas, são encontradas nas aves: IgA, IgM e IgY. A IgA e IgM são similares às IgA e IgM de mamíferos no peso molecular, estrutura e mobilidade eletroforética. A IgY representa cerca de 75% do total de imunoglobulinas nas aves e as concentrações séricas de IgY, IgA e IgM são de 5,0 mg/mL, 1,25 mg/mL e 0,61 mg/mL, respectivamente (Leslie and Martin, 1973).

Os anticorpos são transferidos da ave para a progênie no estágio de formação do ovo, e desempenham um importante papel protetor para o embrião em desenvolvimento. A IgY é continuamente secretada durante a embriogênese, fornecendo evidências de imunização passiva proveniente da ave (Li *et al.*, 1998). Nas aves, somente o ovário e o oviduto esquerdo se desenvolvem. O ovário possui cinco ou seis folículos ovarianos em estágios de maturação, de F1 a F6, onde o estágio F6 é a fase inicial de maturação do folículo e o F1 é o folículo mais maduro e o próximo folículo a ovular, na iminência de ser expelido durante a postura (Figura 1.7). Logo que o F1 é ovulado, o folículo F2 passa a ser F1, o mesmo ocorre com todos na cadeia hierárquica, e um novo folículo é selecionado a ser o F6, proveniente do estroma com folículos pequenos (Conn, 2008).

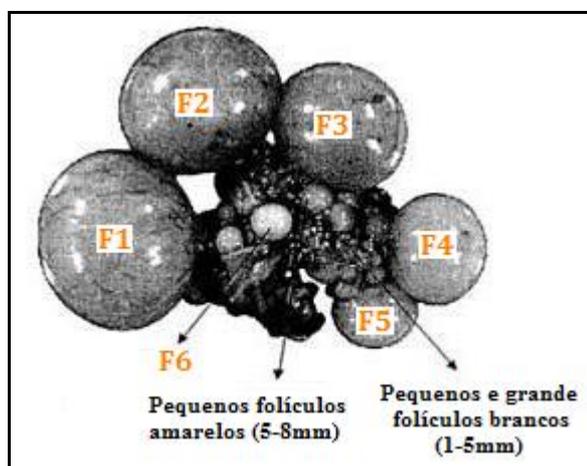


Figura 1.7 – Ovário de franga. Os folículos em estágio de pré-ovulação estão identificados de acordo com o tamanho, onde F1 é o maior folículo e o próximo a ser ovulado, seguido pelo folículo F2, o

segundo maior, e assim por diante. Pequenos folículos são classificados de acordo com o tamanho e a cor da gema. (Adaptado de Conn, 2008)

Patterson *et al.* e Rose *et al.* demonstraram que a IgY proveniente do sangue da galinha é secretada seletivamente por transporte ativo, através da membrana folicular (oolema) do ovário para a gema (oócito) dos folículos ovarianos em maturação (Patterson *et al.*, 1962b; Rose and Orlans, 1981). A transferência da IgY para os folículos ocorre via um receptor específico na superfície da membrana do saco vitelínico, que permite o transporte seletivo de todas as subpopulações de IgY apresentadas no sangue da ave (Tressler and Roth, 1987; Mohammed *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 2002). O receptor de membrana específico presente no saco vitelínico é o receptor Fc da gema do ovo (FcRY), homólogo a um receptor (PLA₂R) pertencente da família de receptores de manose de mamíferos (West *et al.*, 2004). O FcRY apresenta característica pH ácido-dependente, necessitando de condição ácida para se ligar à IgY (West *et al.*, 2004). Morrison *et al.* e West *et al.* identificaram várias regiões na molécula do anticorpo que são importantes para sua ligação aos receptores. Seus dados demonstraram que a região Fc e a região de flexibilidade são requeridas para esse transporte (Morrison *et al.*, 2002; West *et al.*, 2004). A região Fab não tem participação. O receptor FcRY se liga especificamente ao domínio C_H3-C_H4 da região Fc da IgY para realizar o transporte do anticorpo (Morrison *et al.*, 2002; West *et al.*, 2004; Kitaguchi *et al.*, 2008). A razão de proporção entre receptores e moléculas de IgY é de 2 para 1, respectivamente, ou seja, cada IgY se liga a dois receptores FcRY, onde cada receptor interage com uma das cadeias do dímero da molécula do anticorpo (Figura 1.8) (West *et al.*, 2004). A passagem transovariana da IgY demora aproximadamente de 3 a 6 dias (Patterson *et al.*, 1962a; Woolley and Landon, 1995). A quantidade de IgY transferida para a gema do ovo tem sido relatada como proporcional à concentração de IgY no soro da ave (Loeken and Roth, 1983; Al-Natour *et al.*, 2004; Hamal *et al.*, 2006). Tesar *et al.* sugeriram a possibilidade da homeostase da IgY no soro das aves ser regulada pelo receptor FcRY (Tesar *et al.*, 2008).

Kitaguchi e colaboradores descreveram que as imunoglobulinas monoméricas (IgY) são muito mais eficientemente incorporadas no folículo ovariano que as imunoglobulinas poliméricas, como a IgA, que forma complexos de dímeros, e a IgM, que forma pentâmeros (Janeway *et al.*, 2002; Kitaguchi *et al.*, 2008). A IgY é incorporada na gema aproximadamente oito vezes mais que as outras imunoglobulinas (Kitaguchi *et al.*, 2008). A possível explicação para a menor taxa de transferência de imunoglobulinas poliméricas para gema é o tamanho causado pela polimerização, resultando em baixa infiltração através da membrana folicular (Kitaguchi *et al.*, 2008). Estes autores propuseram um sistema de facilitação do transporte da IgY na membrana folicular, onde há um portão que bloqueia a

passagem das imunoglobulinas poliméricas (Figura 1.8). Este portão está localizado na membrana folicular do ovário, mas o local preciso ainda é desconhecido. Entre as imunoglobulinas monoméricas que passam pelo portão, a IgY liga-se preferencialmente ao receptor ou a proteína carreadora que reconhece a região Fc, enquanto as outras imunoglobulinas monoméricas ligam-se com menos eficiência, pois o receptor presente na membrana é o FcRY (West *et al.*, 2004; Kitaguchi *et al.*, 2008).

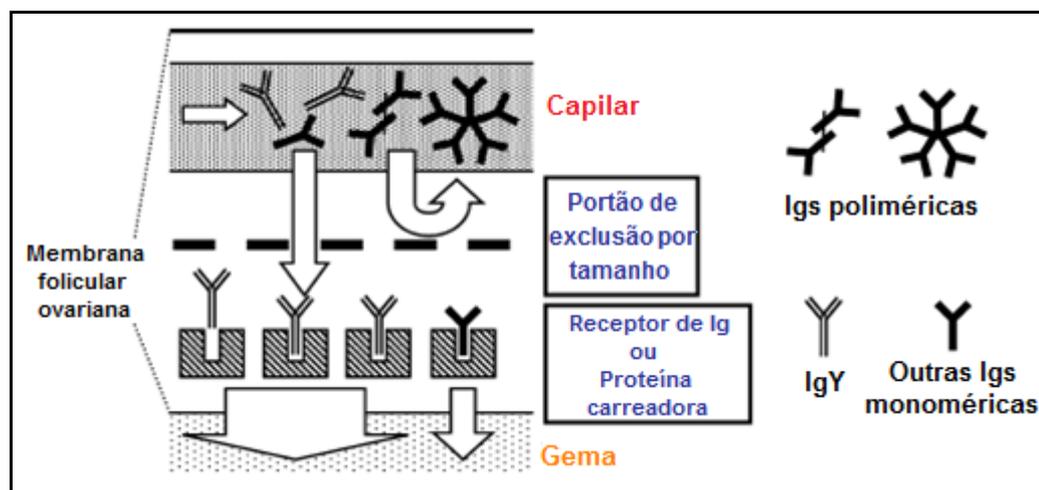


Figura 1.8 – Ilustração esquemática do transporte seletivo no folículo ovariano aviário. Imunoglobulinas presentes no capilar sanguíneo passam através da membrana folicular. A linha pontilhada representa o portão de exclusão por tamanho, onde imunoglobulinas poliméricas são bloqueadas e imunoglobulinas monoméricas têm passagem. Entre as imunoglobulinas monoméricas que passaram pelo portão, a IgY liga-se preferencialmente ao receptor ou a proteína carreadora que reconhece a região Fc, enquanto as outras imunoglobulinas monoméricas ligam-se com menos eficiência. (Adaptado de Kitaguchi *et al.*, 2008)

As imunoglobulinas IgA e IgM estão presentes na clara do ovo como resultado de secreção mucosa destes por células do oviduto (Figura 1.9) (Rose *et al.*, 1974). Nesta, as concentrações de IgA (~0.7 mg/mL) e IgM (~0.15 mg/mL) são relativamente pequenas enquanto a de IgY (8-25 mg/mL) na gema do ovo é considerada alta (Rose *et al.*, 1974; Hamal *et al.*, 2006). Apesar da IgA e da IgM serem predominantemente imunoglobulinas da clara, Yamamoto e colaboradores relataram que há a transferência de pequenas quantidades de ambas as imunoglobulinas da clara para gema em ovos que não foram fecundados (Yamamoto *et al.*, 1975).

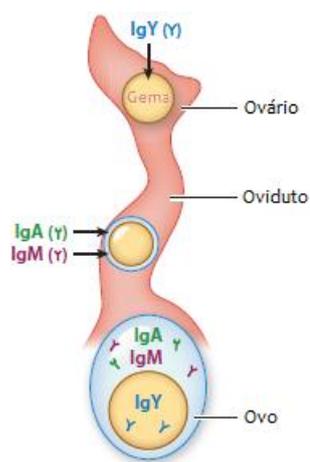


Figura 1.9 – Transferência de anticorpos para o ovo. Durante a formação do ovo, a IgY (azul) é transferida do sangue para o ovário (gema) pelos receptores específicos. IgA (verde) e IgM (roxo) são depositadas mais tardiamente na clara do ovo durante a passagem pelo oviduto. (Adaptado de Kovacs-Nolan and Mine, 2012)

1.2.7. Produção da IgY

O desenvolvimento e a produção de anticorpos IgY específicos podem ser alcançados pela imunização de aves poedeiras com o antígeno alvo. O antígeno pode ser apresentado ao sistema imune como estruturas complexas (bactéria, vírus e parasitas) ou simples (proteínas, polissacarídeos e toxinas) (Schade *et al.*, 2005). Entretanto, o resultado da resposta imune das aves imunizadas pode não ser muito previsível. Dois fatores muito importantes influenciam esta resposta: tipo de adjuvante usado e a via de administração do antígeno (Schade and Hlinak, 1996).

1.2.7.1. Adjuvante

Para a indução de altos e sustentáveis títulos de anticorpo utiliza-se adjuvante, apesar da imunização das aves sem o uso de qualquer adjuvante também resultar em títulos aceitáveis de anticorpo (Gutiérrez Calzado *et al.*, 2001). Existem mais de cem adjuvantes, que diferem em características químicas, sua eficácia na estimulação do sistema imune e efeitos colaterais (Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009). O adjuvante considerado padrão ouro em termos de indução da resposta imune específica é o adjuvante completo de Freund (CFA), que contém micobactérias mortas pelo calor e ressecamento (Lévesque *et al.*, 2007). Porém, recentemente, o CFA está sendo utilizado com menos frequência, pois tem sido associado à inflamação grave e necrose tecidual no local da inoculação em mamíferos (Wanke *et al.*, 1996). Em aves, o uso do CFA parece não causar lesões acentuadas como nos mamíferos. Os resultados de Gassmann *et al.* e Svendsen *et al.* sugerem que as galinhas apresentam maior resistência ao dano tecidual pelo CFA que coelhos, apesar dos resultados de Wanke *et al.* e

Olbrich *et al.* contradizerem esses dados (Gassmann *et al.*, 1990; Svendsen Bollen *et al.*, 1996; Wanke *et al.*, 1996; Olbrich *et al.*, 2002). Portanto, o substituto mais efetivo encontrado foi o adjuvante incompleto de Freund (IFA), que atualmente é o mais utilizado para produção de imunoglobulinas específicas (Lévesque *et al.*, 2007; Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009).

Ambos, o IFA e o CFA são adjuvantes lipofílicos, que armazenados no local da administração, liberam o antígeno lentamente permitindo a estimulação duradoura do sistema imune. No IFA, alguns componentes da micobactéria não são adicionados para evitar a necrose tecidual, tendo como consequência uma menor imunoestimulação (Lévesque *et al.*, 2007). Alguns autores testaram os dois adjuvantes: o CFA na primeira imunização e o IFA na segunda imunização (Kapoor *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Chalghoumi *et al.*, 2008). Nestes estudos, os resultados foram alcançados e não houve efeito adverso. A alternativa é a suplementação do IFA para potencializar a estimulação do sistema imune.

Outro adjuvante promissor é o uso de oligodesoxinucleotídeos contendo C-fosfatoguanosina (CpG-ODN) (Klinman *et al.*, 1999; Hemmi *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2004; Hemmi and Akira, 2005). Lévesque *et al.* concluíram que o uso de CpG-ODN na imunização das frangas resultou em um aumento de até 480% da concentração de anticorpos específicos presentes na gema, embora ocorresse um pequeno aumento nos custos do procedimento (Lévesque *et al.*, 2007). Em outro estudo, de Paula e colaboradores (2011) observaram que a combinação de CpG-ODN e IFA aumentou significativamente o título de anticorpos contra o vírus da hepatite A em aves imunizadas (de Paula *et al.*, 2011). A CpG-ODN é reconhecida pelas células do sistema imune pelos receptores *Toll-like* (TLR) 9. Os TLRs são receptores reconhecedores de padrões (PRR) que se ligam a certos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (Medzhitov and Janeway, 1997), e estão amplamente distribuídos nas células do sistema imune tais como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células B, bem como células epiteliais das mucosas e células endoteliais (Cario *et al.*, 2000; Faure *et al.*, 2001; Visintin *et al.*, 2001). O TLR 9 é expresso no compartimento endossomal das células citadas e reconhece sequências CG incluídas em certas sequências conservadas, tornando o CpG-ODN um promissor candidato a adjuvante (Dalpke *et al.*, 2002).

1.2.7.2. Via de inoculação

A rota mais comum para injeção do antígeno em aves é a via intramuscular. A imunização é habitualmente aplicada no músculo peitoral (Schade *et al.*, 2005). As galinhas podem também ser injetadas subcutaneamente na região cervical. Entretanto, em animais muito jovens, é preferível que a injeção seja administrada via intramuscular no músculo

peitoral, pois a injeção subcutânea é mais difícil de ser aplicada e pode causar dor e sofrimento (Schade and Hlinak, 1996). Além disso, Chang *et al.* encontraram que a imunização pela via intramuscular resultou no aumento do título de anticorpos específicos quando comparada com a imunização subcutânea (Chang *et al.*, 1999).

1.2.7.3. Purificação

A gema do ovo contém altas concentrações de anticorpos, mas a elevada concentração de lipídios é a maior limitação para o processo de purificação dos anticorpos. Existem várias formas de purificar a IgY da gema do ovo, como por exemplo, por sal, sulfato de dextrano, diluição xantana, goma, etanol, precipitação por polietileno glicol (PEG), cromatografia tiofílica, diluição em água, entre outros (Akita and Nakai, 1992; Hansen *et al.*, 1998). O método de diluição em água resulta em solução contendo lipídios e proteínas solúveis em água (Akita and Nakai, 1992). Este método é simples, rápido, adequado para produção em larga escala e eficiente para a obtenção de IgY, que é importante para uso medicinal que necessita de grandes quantidades (Akita and Nakai, 1993; Nilsson, Hanrieder, *et al.*, 2008).

A precipitação da gema do ovo por polietileno glicol, acidificação e o método de diluição por água são os mais comuns (Larsson and Sjöquist, 1990; Akita and Nakai, 1993; Svendsen *et al.*, 1995; Dávalos-Pantoja *et al.*, 2000). Esta primeira etapa na purificação da IgY envolve a extração dos lipídios e lipoproteínas. Uma vez que os lipídios são retirados da amostra, a IgY é geralmente purificada por precipitação sendo os mais utilizados o sulfato de amônio e novamente o polietileno glicol (Polson, 1990; Akita and Nakai, 1993; Hansen *et al.*, 1998). A pureza e o rendimento variam muito de método para método (Gee *et al.*, 2003). Fu *et al.* obtiveram pureza da IgY de 92% após purificação através do método de diluição por água e cromatografia (Fu *et al.*, 2006). A IgY isolada tinha elevado grau de pureza confirmado pela eletroforese em gel de poliacrilamida e apresentou boa atividade biológica como confirmado pelo *Western Blotting* (Fu *et al.*, 2006).

Apesar das claras vantagens da utilização de IgY na pesquisa e diagnóstico, o uso de rotina é muitas vezes considerado impraticável em razão das limitações existentes nos protocolos de purificação da IgY (Akerström *et al.*, 1985; Camenisch *et al.*, 1999). A alta concentração de lipídio na gema do ovo também interfere nas purificações que utilizam como método a afinidade, porém, tem sido feito muitos esforços para sintetizar ligantes de IgY para permitir a purificação por afinidade (Hansen *et al.*, 1998; Verdoliva *et al.*, 2000). As proteínas A e G são comumente empregadas neste tipo de purificação para anticorpos policlonais de

mamíferos, mas são incapazes de ligarem-se a IgY devido uma diferença na região Fc deste anticorpo (Akerström *et al.*, 1985; Camenisch *et al.*, 1999).

1.2.8. Aplicação

Tem crescido o interesse no uso da imunoglobulina Y de gema de ovos de galinhas para imunoterapia e imunodiagnóstico (Erhard *et al.*, 2000; Tini *et al.*, 2002; Nilsson, Hanrieder, *et al.*, 2008). O Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (IOC/Fiocruz) desenvolveu um kit de ELISA para diagnóstico do vírus da hepatite A utilizando IgY específica. O teste diagnóstico apresentou nível de sensibilidade de 95% e especificidade de 98,8% (Silva *et al.*, 2012).

A administração oral de IgY purificada pode ser usada em imunoterapia passiva contra infecções no trato gastrointestinal por bactérias e vírus. Deste modo, a IgY é uma alternativa a antibióticos para tratamento de patógenos entéricos antibiótico-resistentes em humanos e animais (Carlander *et al.*, 2000). Muitos estudos nos animais e no homem com IgY contra diferentes patógenos têm provado que esta imunoglobulina tem sido eficiente na prevenção e tratamento de infecções. Por exemplo, Di Lonardo *et al.* sugeriram que a tecnologia da IgY pode ser utilizada futuramente como uma ferramenta de diagnóstico para o papilomavírus humano (HPV) 16 em amostras clínicas (Di Lonardo *et al.*, 2001). Rollier *et al.* obtiveram sucesso na produção de IgY contra o vírus da hepatite B de patos (DHBV), análogo ao vírus da hepatite B (HBV) de humanos (Rollier *et al.*, 2000). Mine *et al.* relataram produção de IgY contra rotavirose bovina e humana, enquanto Carlander *et al.* relataram que a IgY contra *Escherichia coli* reduziu a mortalidade em leitões recém nascidos (Carlander *et al.*, 2000; Mine and Kovacs-Nolan, 2002). A salmonelose pôde ser prevenida tanto em bezerros como em ratos neonatos (Yokoyama, Peralta, *et al.*, 1998; Yokoyama, Umeda, *et al.*, 1998; Mine and Kovacs-Nolan, 2002).

O uso da IgY em humanos contra *Streptococcus mutans* diminuiu a incidência de cáries quando rinsado na boca (Hatta *et al.*, 1997) e IgY anti-*Helicobacter pylori* reduziu as infecções gástricas por *Helicobacter* (Shin *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003; Horie *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004). A IgY anti-*H. pylori* já foi utilizada como suplemento em iogurte (Horie *et al.*, 2004), o que demonstra a possibilidade de utilização da IgY em alimentos funcionais. Apesar de o mecanismo que previne a colonização não ter sido elucidado, é sugerido que a IgY anti-*H. pylori* iniba a aderência do *H. pylori* no epitélio gástrico (Shin *et al.*, 2002). Nilsson *et al.* trataram pacientes de fibrose cística com doses orais de IgY anti-*Pseudomonas* e este tratamento preveniu infecções por *Pseudomonas aeruginosa* e retardou a progressão

para infecção crônica (Kollberg *et al.*, 2003; Nilsson, Larsson, *et al.*, 2008). Mine e colaboradores comprovaram que a IgY foi eficiente para os seguintes agentes: coronavírus bovino, *Yersinia ruckeri*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus spp.* e *P. aeruginosa* (Mine and Kovacs-Nolan, 2002).

O principal modo de ação é a ligação dos anticorpos a certos componentes da superfície bacteriana como proteínas de membrana, lipopolissacarídeos (LPS), flagelo e fímbria (ou pili). A hipótese é que esses componentes de superfície de células podem ser facilmente reconhecidos pelos anticorpos e essa ligação pode levar a insuficiência das funções biológicas desses componentes, os quais desempenham papel importante no crescimento bacteriano (Sim *et al.*, 2000) e na ligação com as células intestinais (Yokoyama, Umeda, *et al.*, 1998). Desta forma, os anticorpos protegem contra adesão de bactérias e vírus às células do intestino (Sugita-Konishi *et al.*, 2000; Girard *et al.*, 2006; Chalghoumi, Théwis, *et al.*, 2009) e previnem a invasão das células epiteliais (Sugita-Konishi *et al.*, 2000).

A eficácia da IgY no tratamento da gastroenterite aguda por rotavírus já foi investigada em crianças com idade de 4 a 24 meses de vida em Bangladesh. Em um ensaio clínico duplo cego randomizado, pesquisadores avaliaram a eficiência terapêutica da IgY anti-rotavírus humano em crianças com diarreia aquosa por rotavírus. Foi observado que o tratamento com a IgY, resultou em discreta melhora da diarreia, que foi mensurada pela redução do volume de fezes associado ao *clearance* viral mais rápido (Sarker *et al.*, 2001). A IgY mostrou-se mais efetiva quando comparada a outro tratamento, como a administração de probióticos, pois eliminou o vírus mais rapidamente e encurtou o curso da doença, além dos probióticos levarem mais tempo para gerar alívio das manifestações clínicas (Xie *et al.*, 2013). Outros autores encontraram resultados similares em relação a imunoterapia com IgY para rotavíroses (Rahman *et al.*, 2012), portanto, esses dados indicam um desempenho promissor deste anticorpo no tratamento e atenuação da diarreia induzida por rotavírus em crianças.

A IgY é resistente à barreira gástrica (Lee *et al.*, 2002), porém, Chang *et al.*, Cho *et al.* e Kovacs-Nolan *et al.* demonstraram que o uso de microcápsulas pode ser um método útil e efetivo para proteger a IgY da inativação gastrintestinal na utilização da terapia oral por IgY (Chang *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2005; Kovacs-Nolan and Mine, 2005), além da proteína ovomucóide, presente na gema do ovo purificada, que a protege até certo ponto contra a degradação proteolítica pelas enzimas digestivas (Shah and Khan, 2004; Kovacs-Nolan *et al.*, 2005).

1.3. Modelos animais de infecção experimental

Um grande número de modelos animais tem sido utilizado para esclarecer o mecanismo de patogênese e imunidade do rotavírus do grupo A (RVA), tais como, cordeiros (Snodgrass and Wells, 1978), bezerros (Fernandez *et al.*, 1998), porcos gnotobióticos (Ward *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2011), coelhos (Ciarlet *et al.*, 1998), camundongos (Preidis *et al.*, 2012) e ratos (Ciarlet *et al.*, 2002). Considerando que primatas não humanos são os animais mais filogeneticamente correlacionados aos humanos, há uma lacuna de conhecimento sobre a susceptibilidade de macacos para o RVA, apesar de eles serem naturalmente infectados com RVA símio (Chege *et al.*, 1995; Otsyula *et al.*, 1996; McNeal *et al.*, 2005). Malherbe e Harwin identificaram inúmeras viroses presentes em macacos verde africano, entre elas, o rotavírus símio SA11, antes mesmo do vírus ser descrito como rotavírus (Malherbe and Harwin, 1963). Trabalhos demonstram a utilização de alguns modelos de infecção experimental para rotavírus em macacos utilizando tanto isolados de rotavírus humano como símio. McNeal e colaboradores inocularam com rotavírus símio macacos rhesus recém-nascidos. Apesar de não ter sido observada diarreia e os animais terem permanecido clinicamente saudáveis, todos os macacos eliminaram grande quantidade de rotavírus nas fezes após a inoculação (McNeal *et al.*, 2005). No Centro de Pesquisa Nacional de Primatas Yerkes, cinco espécies de primatas não humanos foram testados para presença de anticorpos específicos de rotavírus e 88% foram soropositivos, constatando assim, a infecção natural deste vírus em primatas não humanos (Jiang *et al.*, 2004).

É possível demonstrar a evidência da quebra de barreira entre espécies e a adaptação do vírus a diferentes espécies animais (Nakagomi and Nakagomi, 1993). No entanto, em 1974, Holmes e colaboradores não conseguiram induzir diarreia em *Macaca radiata* com isolado de rotavírus humano (Holmes *et al.*, 1974). O primeiro trabalho demonstrando a transmissão heteróloga do rotavírus humano a uma espécie de macaco ocorreu em 1977 na *Macaca nemestrina* (Mitchell *et al.*, 1977). Apesar do RVA não ser espécie-específico, na maioria dos isolados naturais obtidos de qualquer espécie, a virulência do protótipo humano de RVA tem sido associado à redução dos sinais clínicos em hospedeiros heterólogos (Nakagomi and Nakagomi, 1993; Iturriza-Gómara *et al.*, 2004). Isto pode ser comprovado em alguns estudos em que o rotavírus humano foi inoculado em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*), babuínos (*Papio*) e macacos verde africano (*Chlorocebus aethiops*) (Majer *et al.*, 1978; Leong and Awang, 1990; Chege *et al.*, 2005). A diarreia que é um sinal clínico evidente da rotavírose não foi observada, porém, a detecção do rotavírus nas fezes foi comprovada exclusivamente nos animais neonatos. Entretanto, em um zoológico de Bristol

(Reino Unido) foi reportado que dois macacos jovens, um chimpanzé (*Pan troglodytes*) e um gorila (*Gorilla beringei*), desenvolveram infecção natural provavelmente por rotavírus humano com manifestação de sinais clínicos, principalmente diarreia. Além de outros dois gorilas e dois orangotangos (*Pongo pygmaeus*), todos adultos ou adolescentes, como o mesmo quadro clínico dos jovens (Ashley *et al.*, 1978).

A IgY já foi avaliada como uma possível ferramenta de imunoterapia para rotavírus em alguns modelos animais. Vega e colaboradores realizaram um estudo onde bezerros recém nascidos eram inoculados com rotavírus bovino (BRV) e tratados com IgY anti-BRV que foi incluída na dieta dos animais, e a IgY mostrou-se uma estratégia promissora na prevenção da diarreia (Vega *et al.*, 2011). O mesmo grupo de pesquisa também avaliou a proteção contra diarreia por rotavírus em porcos gnotobióticos neonatos experimentalmente inoculados com rotavírus humano (HRV), e tratados com anticorpos IgY específicos administrados de forma profilática (Vega *et al.*, 2012). Testes em camundongos também foram realizados (Sarker *et al.*, 2007). Portanto, sugere-se que a estratégia de produção de IgY policlonal com finalidade de aplicação em medidas preventivas e de terapia passiva ao controle da diarreia por rotavírus, pode ser realizada de forma efetiva, de baixo custo e em grande quantidade (Sarker *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2013).

O macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) é proveniente do Sudeste Asiático e têm uma expectativa de vida de aproximadamente 30 anos em cativeiro (Blancher *et al.*, 2014). Atualmente é utilizado como modelo animal em vários campos da imunologia experimental, especialmente no desenvolvimento de drogas imunossupressoras para prevenção da rejeição em transplantes (Menninger *et al.*, 2002; Wiczorek *et al.*, 2006; Bigaud *et al.*, 2012), testes de vacinas candidatas para prevenção e tratamento de doenças infecciosas (Arikata *et al.*, 2012), e compreensão da fisiopatologia de doenças infecciosas (Walsh *et al.*, 1996; Willer *et al.*, 2010). O cynomolgus também é conhecido como o primeiro animal de ensaio clínico para o desenvolvimento da vacina contra a poliomielite (van Steenis *et al.*, 1980; Ghendon, 1993), além de inúmeros estudos relacionados ao vírus da pólio terem sido realizados neste modelo animal no passado (Faber and Silverberg, 1942; Faber *et al.*, 1943; Howe and Bodian, 1948).

1.4. Justificativa

Casos de gastroenterite reportados anualmente são atribuídos a um largo espectro de patógenos virais, bacterianos e parasitários. Entre os agentes etiológicos, o rotavírus é o mais importante sendo responsável por mais de dois milhões de episódios de diarreia entre crianças e quase 200 mil mortes anuais, principalmente em países em desenvolvimento (Tate *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2013).

Com a comercialização de duas vacinas licenciadas, houve redução da taxa de mortalidade, uma vez que ambas mostraram-se altamente eficazes. Contudo, o esquema de aplicação das doses é limitante, pois as imunizações necessitam ser administradas na idade específica recomendada pelo fabricante, caso contrário, a criança pode ter maior risco de intussuscepção. Assim, algumas crianças acabam não sendo imunizadas. Nestes casos, a imunização passiva local é uma estratégia bastante eficiente no controle da rotavírose, e a tecnologia da IgY seria uma alternativa econômica e prática neste controle (Vega *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo, este imunotratamento resultaria em uma menor eliminação de partículas infecciosas pelas fezes, já que o anticorpo estaria ligado aos vírus, neutralizando-os. Dessa forma, estas partículas excretadas teriam a capacidade de infecção reduzida, e possivelmente, evitaria que outros indivíduos fossem infectados, ou seja, a IgY teria um viés de prevenção.

Isto posto, a IgY específica contra infecções virais entéricas surge como um complemento adequado para o tratamento suporte padrão da gastroenterite infecciosa. Já foi demonstrado inclusive, que a IgY específica para antígenos de rotavírus é capaz de inibir *in vitro* a aderência deste vírus a células epiteliais intestinais (Rahman *et al.*, 2013). Há várias propriedades que tornam esta imunoglobulina atrativa para a imunoterapia oral. O trato digestivo é a porta de entrada para muitos agentes infecciosos, portanto, é lógico usar esta via para administração da IgY. Além do relativo baixo custo da produção de anticorpos através dos ovos de aves.

No presente estudo, a proposta foi o desenvolvimento de uma terapia anti-rotavírus baseada em anticorpos a ser aplicada ao modelo de infecção por rotavírus humano em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) pela administração oral e venosa do anticorpo policlonal IgY específico. Isto porque o estabelecimento do modelo de infecção experimental para rotavírus humano e gastroenterite aguda em primatas não humano, seria de extrema importância para realização de testes de imunoterapia utilizando a IgY ou até mesmo testes de vacinas candidatas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar anticorpos IgY específicos produzidos em aves imunizadas como agente imunoterápico para o rotavírus do grupo A utilizando macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) como modelo de infecção experimental, bem como verificar a performance da IgY anti-HAV para diagnóstico do vírus da hepatite A em fígado de cynomolgus infectado.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Produzir rotavírus do grupo A de humano (protótipo Wa) e de símio (SA11).
- ✓ Produzir anticorpos IgY específicos para rotavírus humano e símio do grupo A utilizando aves poedeiras.
- ✓ Caracterizar os anticorpos IgY anti-RVA produzidos.
- ✓ Estabelecer a concentração de IgY anti-RVA capaz de bloquear a atividade funcional do vírus por meio de ensaio de neutralização *in vitro*.
- ✓ Estabelecer o modelo de infecção heteróloga pelo rotavírus humano do grupo A em macacos cynomolgus.
- ✓ Verificar a performance (ou desempenho) da IgY anti-RVA em imunoterapia para rotavírus humano do grupo A em macacos cynomolgus.
- ✓ Verificar a performance (ou desempenho) da IgY anti-HAV em diagnóstico do vírus da hepatite A em fígado de cynomolgus infectado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Basicamente, o projeto contou com cinco etapas. A primeira delas foi a produção dos rotavírus humano e símio que foram utilizados durante todo o trabalho. Esta produção deu-se em cultura de células, e os vírus foram purificados e caracterizados. Na etapa seguinte, procedeu-se com a produção de anticorpos IgY específicos para rotavírus grupo A humano e símio em aves imunizadas, e a purificação destes anticorpos a partir da gema do ovo das aves. Após, algumas técnicas de caracterização do anticorpo foram realizadas, tais como, eletroforese em gel de poliacrilamida e *western blotting*, com o intuito de comprovar que a imunoglobulina purificada foi a IgY e com especificidade para o RVA. Ao término desta segunda etapa de produção do anticorpo, iniciou-se a terceira fase do projeto, que essencialmente teve como objetivo estabelecer o macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) como modelo de infecção experimental para RVA humano e a dose infectante de rotavírus necessária. Após este estabelecimento, foi iniciada a quarta etapa, na qual realizou-se a tentativa de imunoterapia em cynomolgus inoculados com rotavírus humano pela utilização dos anticorpos IgY anti-RVA produzidos. Para tal, foi determinada a quantidade ideal da imunoglobulina a ser administrada nos animais pelo teste de neutralização em cultura de células. Com esta determinação, iniciamos o desafio nos macacos. Tal metodologia permitiu o ensaio com os primatas não humanos. A quinta e última fase do trabalho foi independente das demais, uma vez que o objetivo foi demonstrar a aplicabilidade da IgY em outras metodologias. Portanto, foi desenvolvido um método de detecção do vírus da hepatite A (HAV) em cortes histológicos de fígado congelado de macacos cynomolgus previamente infectados, utilizando IgY anti-HAV, também previamente produzida (de Paula *et al.*, 2011).

Nas duas infecções experimentais com os cynomolgus, o vírus inoculado foi o rotavírus humano, no entanto, o RVA símio também foi utilizado para imunizar as aves, pois pretende-se testar a IgY anti-RVA em outros estudos, não apenas neste projeto de imunoterapia. O trabalho foi desenvolvido em conjunto nos Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (IOC/Fiocruz) e Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (IOC/Fiocruz).

3.2. Produção dos rotavírus

3.2.1. Propagação dos rotavírus em cultura de células

Os rotavírus do grupo A humano (RVA/human-tc/USA/Wa/1974/G1P[8]) e símio (RVA/Simian-tc/ZAF/SA11/1958/G3P[2]) utilizados neste projeto foram produzidos em cultura de células fetais de rim de macaco rhesus (*Macaca mulatta*), linhagem MA-104 (ATCC[®] CRL-2378). O meio de cultura para propagação foi o meio Eagle Hanks suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco[®], Eugene, OR, Estados Unidos), 1% de bicarbonato de sódio gaseificado, 0,3 g/L de triptose fosfato, 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco[®], Eugene, OR, Estados Unidos) e 1% de gentamicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos).

Para a propagação do RVA, o vírus foi ativado com tripsina na concentração de 10 µg/mL durante 30 min em banho maria a 37°C. Após esta ativação viral, as células foram inoculadas com 1,0 mL do RVA ativado (1×10^5 cópias RNA/mL) e incubadas em estufa a 37°C durante 1 hora sob agitação, para adsorção. Posteriormente, o inóculo foi retirado para adição de 30 mL do meio de manutenção (meio Eagle Hanks com 0,5 µg/mL de tripsina). As garrafas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 5 dias, período que foi observado efeito citopático em quase toda a monocamada. Ao término do tempo de incubação, as células restantes foram rompidas por três ciclos de congelamento e descongelamento para liberação das partículas virais. O material foi estocado a -70°C até a etapa de purificação.

Em todo o processo de propagação dos rotavírus foram produzidas 24 garrafas de cultura de 150 cm² (Corning, Nova Iorque, Estados Unidos) para cada vírus (Wa e SA11). Para isso, foram necessárias três produções virais, e a cada produção cultivou-se oito garrafas.

3.2.2. Purificação e concentração por gradiente de cloreto de céσιο

O meio sobrenadante das culturas foi utilizado para purificar os vírus. A primeira etapa da purificação foi centrifugação a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C na ultracentrífuga Beckman Coulter modelo L8-80M - rotor type 35 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, Estados Unidos). Como para cada vírus o saldo da produção foi de aproximadamente 750 mL, todo esse volume foi processado em várias centrifugações. Após cada centrifugação, o sobrenadante era descartado, o *pellet* mantido e após a adição de meio com vírus centrifugava-se novamente. Assim sendo, ao final de toda esta primeira etapa, formou-se uma concentração viral (*pellet*) com restos celulares. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em tampão tris/cálcio (100 mM Tris; 1,5 mM CaCl₂; pH 7,2) até completa liquefação. Em seguida foi

adicionado o mesmo volume de 1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluoropentano e pérolas de vidro. O material foi homogeneizado para desfazer bem o *pellet* e centrifugado durante 30 min a 1.500 x g, após, a fase aquosa superior foi coletada e passada cuidadosamente para outro tubo onde havia sacarose 45%. Não houve mistura das duas soluções. Este tubo foi centrifugado a 240.000 x g durante 1 hora a 4°C na ultracentrífuga Beckman Coulter modelo L8-80M - rotor SW 50.1 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, Estados Unidos). Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ressuspendido com um pequeno volume de tampão tris/cálcio. Essa suspensão foi adicionada cuidadosamente a um tubo novo contendo solução de cloreto de céσιο (CsCl) 500 mg/mL sem haver mistura das duas soluções. Esta etapa do gradiente de cloreto de céσιο foi importante na separação das partículas completas das partículas incompletas ou proteínas virais soltas. Este tubo foi centrifugado a 240.000 x g durante 20 horas a 4°C na ultracentrífuga Beckman Coulter modelo L8-80M - rotor SW 50.1. Após a centrifugação, observou-se a formação de anel formado no meio do tubo (Figura 3.1). Neste ponto, a densidade é de aproximadamente 1,375 g/cm³, onde as partículas virais completas se concentram. Para não haver mistura dos gradientes, o fundo do tubo foi perfurado com uma agulha permitindo que o líquido escape, de maneira gradativa e sequencial, pela densidade e daí separando em frações: dez frações do RVA Wa e oito do RVA SA11. Finalmente, as frações foram dialisadas com tampão tris/cálcio *overnight* a 4°C. Este processo de purificação do rotavírus pelo gradiente de cloreto de céσιο foi descrito previamente (Espejo *et al.*, 1981; Zárate *et al.*, 2000).

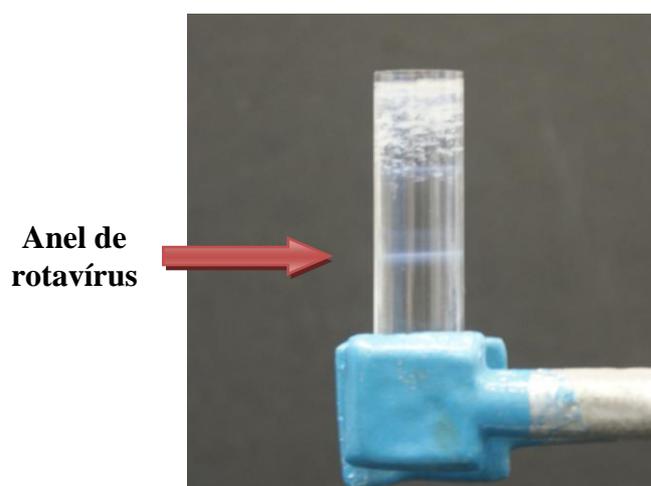


Figura 3.1 – Purificação e concentração do rotavírus pelo cloreto de céσιο. Representação do anel de vírus formado após a centrifugação para formação do gradiente de cloreto de céσιο. (Imagem do arquivo pessoal)

3.2.3. Caracterização dos rotavírus

Para caracterizar os vírus produzidos foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção dos 11 segmentos do RNA viral e uma para detecção das proteínas virais. A primeira foi executada em uma cuba grande e a segunda em uma cuba de mini-gel da Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos).

3.2.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida do ácido nucléico viral

Na eletroforese do RNA viral, cada fração da purificação foi aplicada em um poço separado, portanto, frações de 1 a 10 no RVA Wa e frações de 1 a 8 no RVA SA11. Antes da eletroforese, os dois vírus foram desnaturados com tampão contendo β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) por 5 min a 95°C. Após a desnaturação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel poliacrilamida bis-tris 7,5% a 30 mA por aproximadamente 4 horas. O gel foi impregnado por nitrato de prata 0,011 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) para visualização e avaliação dos segmentos presentes em cada fração. As duas frações que mais apresentaram vírus foram unidas, tanto para o RVA Wa (frações 5 e 6) como para o RVA SA11 (frações 4 e 5). Essas duas uniões passaram a ser denominadas de RVA Wa e RVA SA11, e as frações restantes foram descartadas, pois não apresentaram quantidade suficiente de rotavírus ou não continham as partículas íntegras. Essa inferência foi dada pela densidade em que elas se encontravam.

3.2.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas virais

Pela união das frações onde os vírus estavam concentrados, procedeu-se com a eletroforese das proteínas. O RVA Wa foi aplicado em 2 poços (10^6 e 10^7 cópias de RNA) do gel e o RVA SA11 em 5 poços (10^3 , dois de 10^5 e dois de 10^6 cópias de RNA). O padrão de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen™/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) foi o utilizado para identificar o perfil de migração das proteínas. Antes da eletroforese, os dois vírus com tampão de desnaturação com β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) foram desnaturados por 5 min a 95°C. Após a desnaturação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel poliacrilamida bis-tris 12% a 120 V por aproximadamente 90 min. O gel com as proteínas virais foi corado com coomassie® brilliant blue 0,1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) para visualização e avaliação das proteínas presentes no purificado.

3.2.4. Quantificação dos rotavírus

A quantificação do ácido nucléico viral (RNA), pela reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), foi um dos métodos utilizados para mensurar a quantidade de vírus presente em cada purificado. No entanto, a simples quantificação do ácido nucléico viral não é suficiente, pois para as infecções experimentais com os cynomolgus é necessário quantificar as partículas infectantes no inóculo. Portanto, foi realizada a quantificação do RVA Wa pelo ensaio de unidade de foco fluorescente (FFU), técnica que consiste na contagem de focos fluorescentes dos vírus que internalizaram as células. Estes vírus que entraram nas células são identificados por anticorpos específicos com fluoróforo que ligam-se aos antígenos virais.

3.2.4.1. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Utilizamos a reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) pelo TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Antes da transcrição reversa, realizou-se a extração do ácido nucléico pelo kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit[®] (Qiagen, Valencia, CA, EUA) a partir de 140 µL dos vírus. A extensão do cDNA foi procedida com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®] (Applied Biosystems[®]/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a partir de 10 µL do RNA extraído. Antes do processo, este foi desnaturado com 2 µL dimetil sulfóxido (DMSO) a 97°C durante 7 min e somente após, foi adicionado à mistura dos componentes do kit (10X RT Buffer; dNTP Mix - 100 mM; 10X RT Random Primers; e MultiScribe[™] Reverse Transcriptase - 50 U/µL). O qPCR a partir do cDNA já amplificado foi procedido utilizando *primers* específicos para o gene da NSP3 (NSP3F - nucleotídeos 963 ao 988 - 5'-ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG-3'; e NSP3R nucleotídeo 1.028 ao 1.049 - 5'-GGTCACATAACGCCCTATAGC-3'; genoma de referência do isolado ST3 [acesso GenBank: X81436] - Invitrogen[™]/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), que gerou um fragmento de 87 pares de base (bp), e uma sonda TaqMan[®] Probe (5'-VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB-3' nucleotídeo 995 ao 1.017; genoma de referência do isolado ST3 [acesso GenBank: X81436] - Applied Biosystems[®]/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) (Zeng *et al.*, 2008).

3.2.4.2. Ensaio de unidade de foco fluorescente (FFU)

Em uma lâmina Lab-Tek[®] Chamber Slide[™] System (Nalgene Nunc, Naperville, IL, Estados Unidos) contendo células MA-104 com 70-80% de confluência foi adicionado 100 µL de meio Eagle Hanks sem SFB, porém, com tripsina na concentração de 1 µg/ml. A 200 µL do rotavírus foi adicionado 1 µL de tripsina 2 mg/mL (concentração final de 10 µg/mL) e incubado em banho maria a 37°C durante 1 hora para ativação viral. Foram preparadas as diluições do rotavírus Wa (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}), e adicionado 100 µL de cada diluição viral nos poços da lâmina que já continham 100 µL de meio Eagle Hanks com 1 µg/mL de tripsina. A lâmina foi incubada durante 1 hora a 37°C sob leve agitação para adsorção viral. Após, o inóculo foi removido e em cada poço foi adicionado 200 µL de meio Eagle Hanks com 2% SFB com intuito de neutralizar qualquer tripsina residual que tenha permanecido nos poços, para evitar que novas partículas geradas sejam internalizadas por outras células. A placa permaneceu sob incubação em 37°C durante 22 horas.

Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Então, as células foram fixadas pela adição de paraformaldeído 4% e incubadas em gelo durante 10 min. As células fixadas foram lavadas novamente 3 vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Após, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% com albumina de soro bovino (BSA) 1% e incubadas em temperatura ambiente durante 10 min. As células foram lavadas novamente 3 vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Foi realizado o bloqueio com solução de bloqueio (BSA 4% com Tween[®] 20 0,1%) em temperatura ambiente durante 30 min com suave homogeneização. Ao término da incubação, a solução de bloqueio foi retirada e adicionou-se cada poço o anticorpo primário IgG monoclonal de camundongo anti-VP6 (Abcam[®], Cambridge, UK) diluído 1:100 em solução de bloqueio. A incubação foi em temperatura ambiente por 30 min com suave homogeneização. A solução do anticorpo primário foi removida e as células lavadas novamente 3 vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Após, foi adicionado em cada poço o anticorpo secundário IgG anti-IgG camundongo produzido em burro conjugado com Alexa Fluor[®] 488 (Abcam[®], Cambridge, UK) diluído 1:1.000 em solução de bloqueio. A incubação foi em temperatura ambiente por 30 min com suave homogeneização. A solução do anticorpo secundário foi removida e as células lavadas somente uma vez durante 5 min com PBS 1X sob agitação. Para finalizar, incubou-se as células durante cinco minutos com DAPI (4' 6-diamidino-2-fenilindol) na diluição de 1:5.000. A solução de DAPI foi removida e as células lavadas novamente 3 vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Após, a lâmina foi finalizada com glicerol sobre as células e lamínula.

A contagem dos focos fluorescentes foi realizada em um microscópio de fluorescência invertido ApoTome (Zeiss, Jena, Alemanha) e o cálculo do título viral pela fórmula a seguir. Todo o procedimento foi realizado com adaptações de acordo com o trabalho de Montero *et al.* e Arnold *et al.* (Montero *et al.*, 2008; Arnold *et al.*, 2009).

$$\text{N}^\circ \text{ focos} \times \frac{1}{\text{fator de diluição}} \times \frac{1}{\text{volume do inóculo em mL}} = \text{FFU/mL}$$
$$31 \times \frac{1}{10^{-7}} \times \frac{1}{0,1} = 31 \times 10^7 \times 10 = 3,1 \times 10^9 \text{ FFU/mL}$$

A concentração viral obtida do rotavírus Wa através da contagem de unidade de foco fluorescente foi $3,1 \times 10^9$ FFU/mL

3.3. Produção da imunoglobulina Y

3.3.1. Acomodação, alimentação e procedimentos com os animais

Foram utilizadas nove frangas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) clinicamente saudáveis, da raça Rhodia provenientes de matrizeiro comercial na cidade de Teresópolis/RJ, que estavam com 23 dias de vida e pesando de 0,068 a 0,170 kg. As aves foram vacinadas contra Fowlpox vírus e doença de New Castle e foram mantidas em acomodações adequadas no Biotério do Laboratório de Bioclimatização da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO) em Teresópolis/RJ. Todas as aves foram colocadas individualmente em gaiolas apropriadas, em regime de 12 horas de luz para 12 horas de escuridão, temperatura entre 18-20°C e umidade relativa de 70-80%. Água e ração foram oferecidas *ad libitum* sendo considerado o estágio de vida dos animais. O procedimento de imunização foi iniciado aos 38 dias de vida das aves e as mesmas já apresentavam peso de 0,255 a 0,387 kg. Semanalmente, as aves eram manipuladas a fim de monitorar o peso corporal.

Aos 138 dias de vida das aves, a postura de ovos começou. Os mesmos foram recolhidos durante 13 semanas e estocados em geladeira a 4°C até a fase de purificação da imunoglobulina Y. As frangas foram submetidas a eutanásia aos 229 dias de vida, 13 semanas após o início da postura dos ovos, por punção cardíaca (exsanguinação total) sob anestesia profunda por tiopental sódico, por via intravenosa, na dose de 40 mg/kg (Cristália, São Paulo, SP, Brasil).

Amostras do fígado, rim, baço, bursa de Fabricius, íleo e medula óssea dos animais foram fixados em formalina tamponada a 10%, incluídos em parafina, cortados com 4 μm , corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H-E) e analisados por microscopia ótica. Esse estudo foi realizado no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados em 30 de junho de 2011 pela Comissão de Ética no Trato com Animais da Fundação Educacional Serra dos Órgãos (CETA-UNIFESO) com número de licença 0331/11 (Anexo I).

3.3.2. Imunização das aves

As nove aves foram divididas em três grupos (I-III) com os seguintes protocolos de imunização: Grupo I – recebeu três imunizações, cada dose com uma mistura contendo 50 μL de rotavírus grupo A de humano (RVA Wa - $2,2 \times 10^5$ cópias de RNA) e rotavírus grupo A de símio (RVA SA11 – $2,0 \times 10^5$ cópias de RNA) associado com 80 μL de Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) e 20 μL CpG-ODN (1 mg/mL - 5'-TCGTCGTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' - BioCorp Inc., Montreal, Canadá) (Rankin *et al.*, 2001); Grupo II – recebeu a primeira imunização com uma mistura contendo 50 μL de tampão tris-cálcio, 80 μL de IFA e 20 μL CpG-ODN (1 mg/mL), a partir da segunda imunização as aves receberam imunógeno no inóculo, ou seja, uma mistura de 50 μL de RVA Wa ($2,2 \times 10^5$ cópias de RNA) e RVA SA11 (2×10^5 cópias de RNA) associado com 80 μL de IFA e 20 μL CpG-ODN (1 mg/mL); Grupo III – recebeu três imunizações com uma mistura contendo 50 μL de tampão tris-cálcio, 80 μL de IFA e 20 μL CpG-ODN (1 mg/mL) como controle negativo. Os rotavírus não foram inativados antes da inoculação. Os grupos I e II diferem no número de doses aplicadas nas aves com imunógeno (RVA), como pode ser observado no Quadro 3.1 que exhibe o esquema de inoculação dos grupos. Buscou-se avaliar a diferença de rendimento na produção de IgY, se o sistema imune fosse somente estimulado (primado) com os adjuvantes, ou seja, não administrando o RVA na primeira imunização. O volume total de 150 μL do inóculo foi inoculado, pela via intramuscular, no músculo peitoral em todos os grupos. A primeira imunização ocorreu aos 38 dias de vida dos animais, a segunda e a terceira imunizações ocorreram aos 74 e 103 dias de idade das aves, respectivamente.

Quadro 3.1 – Protocolo de imunização das aves para avaliação de rendimento.

Imunização	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	3 animais	3 animais	3 animais
1 ^a	RVA + IFA + CpG-ODN	IFA + CpG-ODN	IFA + CpG-ODN
2 ^a	RVA + IFA + CpG-ODN	RVA + IFA + CpG-ODN	IFA + CpG-ODN
3 ^a	RVA + IFA + CpG-ODN	RVA + IFA + CpG-ODN	IFA + CpG-ODN

RVA: Rotavírus grupo A humano e símio; CpG-ODN: Sequência nucleotídica; IFA: Adjuvante Incompleto de Freund

3.3.3. Método de purificação da IgY

Quando a postura de ovos começou aos 138 dias de vida das aves os ovos foram recolhidos e estocados em geladeira a 4°C até a purificação da IgY. Ficou estabelecido que os ovos fossem agrupados em *pools* por semana, ou seja, todos os ovos coletados na mesma semana formavam uma só amostra, separados por cada grupo de imunização. Os ovos foram coletados desde a primeira postura e a coleta foi encerrada exatamente após 13 semanas. O total de ovos recolhidos de todos os grupos neste período foi de 477 unidades.

O método de purificação da IgY empregado foi a precipitação em polietileno glicol (PEG) desenvolvido por Polson *et al.* (Polson *et al.*, 1985), procedimento que consiste em quatro etapas de precipitação da gema do ovo com PEG 6000 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) por centrifugação para separação das proteínas. Para iniciar o processo, a uma parte de gema de ovo foram adicionados 3,5% (p/v) de PEG 6000 e quatro partes de tampão fosfato salina (PBS) (pH 7,5). A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 min a temperatura ambiente e posteriormente centrifugada por 10 min (14.000 x g) a 25°C.

Após a centrifugação, a solução estava dividida em três fases (Figura 3.2). A fração semissólida (precipitada) composta de outras proteínas que não a IgY foi descartada. As frações de gordura (sobrenadante) e IgY (fase intermediária) foram decantadas por um funil com papel de filtro. A esta solução decantada, adicionamos PEG 6000 a uma concentração final de 12% (p/v). A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 min; posteriormente, foi centrifugada novamente (14.000 x g) por 10 min a 25°C. O sobrenadante (gordura) foi descartado e o precipitado (IgY) foi dissolvido novamente em PBS até o volume de 35 mL, com adição de PEG 6000 a uma concentração final de 12% (p/v). A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 min. Posteriormente, repetiu-se a centrifugação (14.000 x g) por 10 min a 25°C. Após, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado

dissolvido em 2,5 mL de etanol gelado 50% e 2,5 mL de PBS pH 7,4, para retirar o PEG residual. A solução foi centrifugada (10.000 x g) por 10 minutos a -5°C, descartando o sobrenadante ao final (PEG residual). Para finalizar a purificação, o precipitado contendo IgY foi ressuspenso em 2,5 mL de PBS pH 7,4.

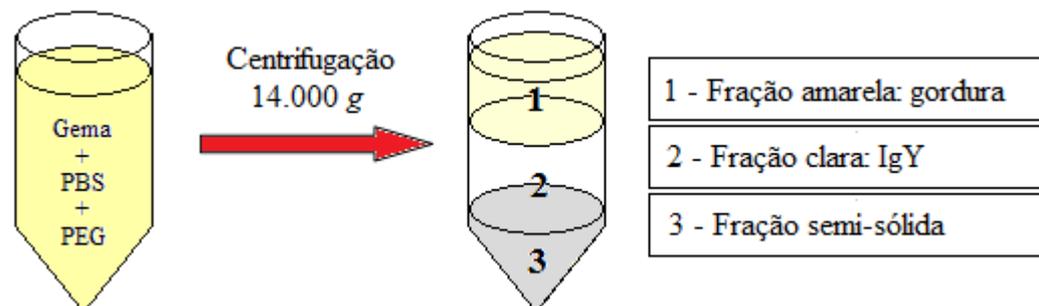


Figura 3.2 – Esquema representativo da primeira etapa de centrifugação da purificação por polietileno glicol (PEG). A centrifugação da mistura de gema do ovo, PEG 6000 e PBS forma um gradiente de três frações.

3.3.4. Quantificação de proteínas totais

Com o intuito de conhecer a concentração aproximada de IgY purificada da gema do ovo, foi realizada a dosagem de proteínas totais pelo método de *Lowry* pelo kit de dosagem de proteínas pelo ácido bicinonínico (BCA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos). O princípio consiste na formação do complexo proteína-cobre (Cu) em condição alcalina, seguida pela redução de Cu^{2+} para Cu^{1+} . A quantidade de cobre reduzido é proporcional a quantidade de proteína. O BCA forma um complexo com Cu^{1+} que deixa o meio de cor violeta. Portanto, para calibrar o aparelho que fará a leitura das amostras, uma curva padrão de 5 pontos com concentração de proteínas conhecida foi preparada. As amostras e a curva padrão foram incubadas a 37°C por 30 min com o BCA e a leitura foi realizada no espectrofotômetro GeneQuant PRO (GE Healthcare, Estados Unidos) no comprimento de onda de 562 nm.

3.3.5. Caracterização da IgY

A caracterização da imunoglobulina Y anti-rotavírus deu-se pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e *western blotting*. Na eletroforese, pode-se identificar se a proteína presente no produto purificado é a IgY, pelo perfil de peso molecular das cadeias leve e pesada da proteína. Consegue-se, também, observar se há a presença de outras proteínas interferentes, contudo, somente pelo SDS-PAGE não há a possibilidade de identificação da especificidade da IgY. Portanto, o

western blotting foi realizado para este propósito de caracterizar a especificidade da IgY purificada para o RVA humano (Wa) e símio (SA11).

3.3.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em uma cuba de mini-gel da Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos). Foram realizados três procedimentos, e em cada procedimento somente um grupo era testado e dois géis eram corridos para comportar as 13 semanas de cada grupo. Cada *pool* das semanas purificadas foi individualizado em um poço do gel. O padrão de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen™/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) foi o utilizado para identificar o perfil de migração das proteínas. Antes da eletroforese, o purificado foi diluído em 1:100 (1 µL do purificado, 49,5 µL de água Milli-Q autoclavada e 49,5 µL de tampão de desnaturação com β-mercaptoetanol - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) e desnaturados por 5 min a 95°C. Após a desnaturação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel poliacrilamida bis-tris 12% a 120 V por aproximadamente 90 min. O gel com as proteínas da IgY foi corado com coomassie® brilliant blue 0,1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) para visualização das proteínas presentes no purificado. Com a avaliação das proteínas pelo perfil de peso molecular das cadeias leve e pesada, foi verificado se a imunoglobulina presente seria ou não a IgY (Marshall, 1984).

3.3.5.2. Western blotting

Na técnica pelo *western blotting*, a eletroforese também teve que ser realizada antes da transferência para a membrana, porém, neste caso o produto que foi submetido à eletroforese foi o rotavírus. Uma vez que o intuito da técnica é avaliar a especificidade da IgY para o rotavírus, se fossemos aplicar a imunoglobulina no gel, esta teria que ser desnaturada e haveria mudança conformacional do anticorpo, com grande probabilidade de perda do potencial de reconhecimento antigênico durante a desnaturação.

A eletroforese foi realizada em uma cuba de mini-gel da Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos). No procedimento, foi verificada a especificidade da IgY tanto para o rotavírus símio como para o rotavírus humano, portanto, foi aplicado RVA SA11 em três poços do gel e três poços do RVA Wa, para serem testados os três grupos distintos de IgY. O padrão de peso molecular para proteínas pré-corado Kaleidoscope™ Standards (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos) foi o utilizado para identificar o perfil de migração das proteínas. Antes da eletroforese, os dois vírus (10 µL do vírus e 10 µL de tampão de

desnaturação com β -mercaptoetanol - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) foram desnaturados por 5 min a 95°C. Foram aplicadas 10^8 cópias RNA do RVA Wa e 10^5 cópias RNA do RVA SA11. Após a desnaturação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel poliacrilamida Bis-Tris 12% a 120 V por aproximadamente 90 min. Após o término da eletroforese, as proteínas virais presentes no gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose pela mesma cuba da Bio-Rad®.

A transferência ocorreu a 100 V por 120 min e após, a membrana foi incubada em solução de bloqueio 5% *overnight* em temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão fosfato salina Tween® 20 (PBS-T) 0,05% três vezes por 5 min em cada lavagem. A membrana foi cortada em tiras iguais de forma que cada tira continha todas as proteínas dos dois rotavírus. Cada tira foi incubada com um grupo da IgY na concentração de 0,5 mg/mL por 2 horas a 37°C sob leve agitação. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,05% por 5 min cada. A segunda incubação foi com IgG anti-IgY conjugada a peroxidase na diluição de 1:2.000 por 1 hora e 30 min a 37°C sob leve agitação. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,05% por 5 min cada. A solução de revelação composta por 0,025 g 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos), 500 μ L cloreto de cobalto (CoCl_2), 100 μ L de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 50 mL PBS (*q.s.p.*) foi feita durante a última lavagem. O PBS-T da última lavagem foi descartado e as bandas apareceram com as tiras mergulhadas na solução de revelação. A reação foi interrompida pela adição de água destilada (Towbin *et al.*, 1979).

3.4. Estabelecimento do modelo de infecção pelo RVA em macacos cynomolgus

Antes da realização da imunoterapia para o rotavírus com a IgY, o macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) foi estabelecido como modelo de infecção experimental por rotavírus. Esta etapa foi determinante na susceptibilidade do cynomolgus ao rotavírus humano.

3.4.1. Animais

Nove animais clinicamente saudáveis, de 2 anos e 8 meses a 8 anos e 9 meses, sorologicamente negativos para RVA (ELISA *in house*) e ausência de eliminação de RVA nas fezes (RT-PCR), provenientes do Serviço de Primatologia (SCPrim) do Centro de Criação de

Animais de Laboratório na Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/Fiocruz), foram alojados no Biotério de Experimentação em Primatas do CECAL. Um estudo retrospectivo assegurou que os animais eram livres do vírus da imunodeficiência símia (SIV) e retrovírus símio tipo D (SRV/D) (Andrade *et al.*, 2003). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados em 26 de setembro de 2011 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz) com número de licença LW-35/11 (Anexo II).

3.4.2. Procedimentos da infecção

Sete macacos cynomolgus com identificação alfanumérica tatuada no tórax (X9, AB7, V11, Z7, U13, T7 e AA7) receberam, pela via oral, 2,0 mL ($3,1 \times 10^6$ FFU/mL) de suspensão do rotavírus humano - RVA Wa (grupo desafio), e em 2 animais (V7 e X11) foram administrados oralmente 2,0 mL de solução isotônica salina e mantidos como não infectados (grupo controle). O dia da inoculação foi considerado o dia 0, portanto, para estabelecer os valores basais da bioquímica, hematologia e virais pré-inoculação, coletam-se amostras de sangue e fezes neste período. Durante 11 dias foram avaliados sinais clínicos de diarreia (fezes aquosas ou semilíquidas), vômito, ataxia e desidratação. A temperatura corporal foi aferida diariamente com termômetro digital infravermelho e temperaturas acima de $38,5^{\circ}\text{C}$ foram consideradas hipertermia. Amostras fecais foram coletadas diariamente do 1º ao 10º dia pós-inoculação (dpi). No 1º, 3º, 7º e 10º dpi todos os animais foram anestesiados com 15 mg/kg de cloridrato de cetamina (König, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 0,1 mg/kg de cloridrato de midazolam (Sandoz, Pymont, NSW, Austrália) para coletar amostras de sangue pela veia femoral e pesagem corporal. No dia 10 após a inoculação, todos os animais foram anestesiados com solução anestésica barbitúrica (tiopental sódico 50 mg/kg) e submetidos à eutanásia pela exsanguinação por punção cardíaca. O protocolo da infecção está demonstrado no Quadro 3.2.

Quadro 3.2 - Protocolo de infecção de *Macaca fascicularis* pelo RVA.

Grupo	Número de animais	Carga viral do inóculo	Avaliação da infecção
Desafio	7	$3,1 \times 10^6$ FFU/mL	1 – Clínica
Controle	2	Solução isotônica salina	2 – Bioquímica e hematológica 3 – Detecção viral

3.4.3. Análise hematológica e bioquímica

Os animais anestesiados pela via intramuscular com cloridrato de cetamina (10 mg/kg) foram submetidos à punção venosa femoral. Foram coletados dois tubos de sangue utilizando o sistema Vacutainer[®]: 1,5 mL em um tubo de EDTA (BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) para hemograma, e 1,5 mL em um tubo com gel separador (BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) para obtenção do soro. O soro foi utilizado para detecção do RNA viral, além da análise de padrões bioquímicos, tais como, sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cloro (Cl⁻). As amostras de sangue total e soro foram enviados para análise pelo Serviço de Controle de Qualidade Animal (CECAL/Fiocruz), além de uma lâmina de distensão sanguínea para contagem específica dos leucócitos. O hemograma foi processado no equipamento automatizado pocH-100iVDiff (Sysmex Europe GmbH, Hamburgo, Alemanha) e o soro foi processado no equipamento Vitros 250 (Ortho Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson, Auckland, Nova Zelândia).

3.4.4. Detecção do RVA nas amostras

3.4.4.1. Detecção do antígeno viral nas fezes

A detecção do antígeno viral nas fezes foi realizada pelo ensaio imunoenzimático comercial EIA RIDASCREEN[®] Rotavirus (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha) seguindo o manual do fabricante.

3.4.4.2. Detecção do RNA viral nas fezes e no soro

Para detecção do RNA viral, foi realizada a reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) do fragmento da VP6. Para confirmação da infecção viral, também foi realizado um teste quantitativo pela reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) pelo TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Antes da amplificação, a extração e a transcrição reversa do ácido nucléico foram realizadas de acordo com os procedimentos do item 3.2.4.1, a partir de 140 µL de amostras da suspensão fecal 10% e do soro dos animais. O PCR para amplificar o fragmento de 379 bp do genoma do RVA foi realizado utilizando *primers* específicos que amplificam o gene da VP6 (Iturriza Gómara *et al.*, 2002). A mistura dos reagentes era composta de 10X buffer; dXTP (2.5 mM); forward primer VP6 (20 µM) nucleotídeo 747 ao 766 (5`-

GACGGVGCRACTACATGGT-3`); reverse primer VP6 (20 µM) nucleotídeo 1.126 ao 1.106 (5`-GTCCAATTCATNCCTGGTGG-3`) - genoma de referência Rotavirus subgroup 1 gene VP6 (acesso GenBank: D00325.1); MgCl₂ (50 mM); e Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (5 U/µL) (Invitrogen[™]/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

O qPCR a partir do cDNA já amplificado foi procedido como descrito anteriormente no item 3.2.4.1.

3.4.4.3. Evidência de partículas virais infecciosas eliminadas nas fezes

Com o propósito de confirmar a presença de partículas infecciosas de rotavírus nas fezes dos macacos inoculados, estas foram utilizadas para inocular células MA-104. Foi selecionada uma amostra fecal RNA positiva de cada animal para ser utilizada como inóculo. O macaco V7 que pertencia ao grupo controle, também foi testado. Como o critério de seleção da amostra era a presença do ácido nucléico, os dias das amostras eram distintos para cada animal, como por exemplo, no macaco AB7 as fezes eram do 5º dpi; os macacos T7, V11 e Z7 eram do 7º dpi; e os animais AA7, X9, U13 e V7 eram do 6º dpi.

Em uma lâmina Lab-Tek[®] Chamber Slide[™] System (Nalgene Nunc, Naperville, IL, Estados Unidos) contendo células MA-104 com 70-80% de confluência foi adicionado 100 µL de meio Eagle Hanks sem SFB, porém, com tripsina na concentração de 1 µg/mL. As amostras de fezes foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 min com o objetivo de clarificar o inóculo. Após, a 100 µL desta suspensão fecal foi adicionado tripsina, para uma concentração final de 20 µg/mL, e incubado em banho maria a 37°C durante 1 hora para ativação viral. Ao término da incubação, as amostras foram adicionadas nos poços da lâmina que já continham 100 µL de meio Eagle Hanks com 1 µg/mL de tripsina. A lâmina foi incubada durante 1 hora a 37°C sob leve agitação para adsorção viral. Após a adsorção, o inóculo foi removido e em cada poço foi adicionado 500 µL de meio Eagle Hanks com 2% SFB. A placa permaneceu incubada em 37°C durante 18 horas.

Após o período de incubação para replicação viral, os poços foram lavados duas vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Então, as células foram fixadas pela adição de paraformaldeído 4% e incubadas em gelo durante 30 min. As células fixadas foram lavadas novamente 3 vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Após, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% com BSA 1% e incubadas em temperatura ambiente durante 10 min. As células foram lavadas novamente 3 vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Foi realizado o bloqueio com solução de bloqueio (BSA 4% com Tween[®] 20 0,1%) em temperatura ambiente durante 30 min com suave homogeneização. Ao término da

incubação, a solução de bloqueio foi retirada e adicionou-se cada poço o anticorpo primário IgG monoclonal de camundongo anti-VP6 (Abcam[®], Cambridge, UK) diluído 1:100 em solução de bloqueio. A incubação foi em temperatura ambiente por 30 min com suave homogeneização. A solução do anticorpo primário foi removida e as células lavadas novamente 3 vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. Após, foi adicionado em cada poço o anticorpo secundário IgG anti-IgG camundongo produzido em burro conjugado com Alexa Fluor[®] 488 (Abcam[®], Cambridge, UK) diluído 1:1.000 em solução de bloqueio. A incubação foi em temperatura ambiente por 30 min com suave homogeneização. A solução do anticorpo secundário foi removida e as células lavadas somente uma vez durante 5 min com PBS 1X sob agitação. Para finalizar, incubou-se as células durante 5 min com DAPI (4' 6-diamidino-2-fenilindol) na diluição de 1:5.000. A solução de DAPI foi removida e as células lavadas novamente 3 vezes durante 5 min cada com PBS 1X sob agitação. A lâmina foi finalizada com glicerol sobre as células e lamínula.

A infecção das células pelo rotavírus foi constatada pelo microscópio de fluorescência invertido ApoTome (Zeiss, Jena, Alemanha). Todo o procedimento foi realizado com adaptações de acordo com o trabalho de Arnold *et al.* e Montero *et al.* (Montero *et al.*, 2008; Arnold *et al.*, 2009).

3.5. Imunoterapia para RVA em macacos cynomolgus

Com o modelo de infecção experimental para o rotavírus já estabelecido, realizou-se a tentativa de imunoterapia para rotavírus no macaco cynomolgus. A imunoglobulina Y anti-RVA produzida no início do projeto foi utilizada nesta imunoterapia. Contudo, foi necessário definir a concentração ideal da IgY a ser administrada em cada animal como contrapartida terapêutica para a quantidade de inóculo administrada, portanto, realizou-se um ensaio de neutralização *in vitro* utilizando cultura de células. O intuito do ensaio foi avaliar qual a concentração de IgY capaz de neutralizar o inóculo, ou seja, capaz de impedir do vírus entrar nas células.

3.5.1. Ensaio de neutralização da IgY em cultura de células

A célula utilizada neste ensaio de neutralização *in vitro* foi a MA-104 (ATCC[®] CRL-2378), a mesma utilizada na produção dos RVA, ou seja, todos os insumos e procedimentos de crescimento e manutenção das células também foram os mesmos descritos na produção dos

rotavírus. No entanto, desta vez as células foram propagadas em placas de 24 poços e só o rotavírus humano (RVA Wa) foi testado.

A primeira etapa do ensaio foi a ativação do RVA Wa (concentração de $3,1 \times 10^7$ FFU/mL) em estufa a 37°C durante 30 min. Após a ativação, as diferentes concentrações da IgY foram incubadas com o vírus durante 1 hora e 30 minutos para ocorrer a interação entre o vírus e o anticorpo. Foram testadas as seguintes concentrações de IgY: 4,0 – 3,5 – 3,0 – 2,5 – 2,0 – 1,5 – 1,0 – 0,75 – 0,5 mg/mL. A IgY anti-RVA utilizada foi a do Grupo I semana 11 que estava com a concentração do purificado de 34 mg/mL.

Com o término da incubação e as células na confluência ideal para infecção, o “inóculo” composto do vírus com a IgY foi adicionado a cada poço correspondente e foi espalhado por toda monocamada de células. A placa foi incubada em estufa a 37°C durante 1 hora, para adsorção das partículas virais do rotavírus que não foram neutralizadas. Após esse período, o “inóculo” foi descartado e as células lavadas duas vezes com PBS 1X estéril. Estas lavagens são necessárias para que todo o vírus que não penetrou na célula seja retirado dos poços. O meio de manutenção Eagle Hanks com tripsina 0,5 µg/mL foi adicionado a cada poço, a placa foi mantida em estufa a 37°C durante 24 horas e após este tempo, foi submetida a 3 ciclos de congelamento e descongelamento para rompimento total das células e liberação do vírus no meio. A replicação do RVA Wa foi avaliada pela quantificação na técnica de PCR em tempo real, como descrito anteriormente no item 3.2.4.1. A partir do meio, fez-se a extração do RNA, a extensão do cDNA pela transcrição reversa e a amplificação pelo qPCR.

3.5.2. Animais

Nesta etapa de imunoterapia foram utilizados quatorze animais clinicamente saudáveis, de 10 meses a 27 anos (média de 6 anos), sorologicamente negativos para RVA (ELISA *in house*) e ausência de eliminação de RVA nas fezes (RT-PCR). Os animais tinham a mesma procedência dos macacos utilizados no estabelecimento do modelo e também ficaram alojados no Biotério de Experimentação em Primatas do CECAL. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados em 26 de setembro de 2011 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz) com número de licença LW-35/11 (Anexo II).

3.5.3. Procedimentos da infecção e imunoterapia

Os macacos foram divididos em 5 grupos com diferentes protocolos de inoculação e tratamento. Grupo controle negativo (CN): dois animais (B2 e J6) foram administrados oralmente com 10 mL de solução isotônica salina e mantidos como não infectados; Grupo controle positivo (CP): dois animais (AE15 e AE11) foram administrados oralmente com 10 mL de suspensão do rotavírus humano - RVA Wa ($3,1 \times 10^7$ FFU); Grupo prova do princípio (RVA + IgY): em dois animais (R9 e Q5) foram administrados oralmente 10 mL de suspensão do RVA Wa ($3,1 \times 10^7$ FFU) incubado anteriormente com IgY anti-RVA (2,5 mg) em estufa a 37°C durante 1 hora e 30 minutos; Grupo imunoterapia oral (IO): em quatro animais (AD15, AA3, AE5 e AE17) foram administrados oralmente 10 mL de suspensão do RVA Wa ($3,1 \times 10^7$ FFU) e após 2 horas foram administrados oralmente com 5 mL de IgY anti-RVA (2,5 mg); Grupo imunoterapia oral e intravenosa (IOIV): quatro animais (AD13, X5, AE1 e AE13) foram administrados oralmente com 10 mL de suspensão do RVA Wa ($3,1 \times 10^7$ FFU) e após 2 horas foram administrados oralmente com 5 mL de IgY anti-RVA (2,5 mg) e via intravenosa com 1 mL de IgY anti-RVA (2,5 mg). O dia da inoculação foi considerado o dia 0, portanto, para estabelecer os valores basais da bioquímica, hematologia e virais pré-inoculação, coletamos amostras de sangue e fezes neste período. Durante 5 dias foram avaliados sinais clínicos de diarreia (fezes aquosas ou semilíquidas), vômito, ataxia e desidratação. A temperatura corporal foi aferida diariamente termômetro digital infravermelho e temperaturas acima de 38,5°C foram consideradas hipertermia. Amostras fecais e de sangue foram coletadas diariamente do 1º ao 4º dia pós-inoculação (dpi), portanto, em todos os dias, os animais foram anestesiados com 15 mg/kg de cloridrato de cetamina (König, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 0,1 mg/kg de cloridrato de midazolam (Sandoz, Pymont, NSW, Austrália) para coletar amostras de sangue pela veia femoral e pesagem corporal. No dia 4 após a inoculação, todos os animais foram anestesiados com solução anestésica barbitúrica (tiopental sódico 50 mg/kg) e submetidos à eutanásia pela exsanguinação por punção cardíaca. O protocolo da infecção está demonstrado no Quadro 3.3.

Quadro 3.3 - Protocolo de imunoterapia pelo RVA em *Macaca fascicularis*.

Grupo	Animal	Idade (anos)	Peso (kg)	Carga viral do inóculo	IgY
Controle Negativo (CN)	B2	27a 0m	3,650	∅	∅
	J6	19a 1m	3,380		
Controle Positivo (CP)	AE15	0a 10m	1,330	3,1x10 ⁷ FFU	∅
	AE11	1a 0m	1,340		
Prova do Princípio (RV + IgY)	R9	11a 8m	5,840	3,1x10 ⁷ FFU	2,5 mg - Oral
	Q5	13a 2m	4,500		
Imunoterapia Oral (IO)	AD15	1a 10m	1,600	3,1x10 ⁷ FFU	2,5 mg - Oral
	AA3	5a 3m	3,970		
	AE5	1a 2m	1,250		
	AE17	0a 10m	1,130		
Imunoterapia Oral e Intravenoso (IOIV)	AD13	1a 11m	1,150	3,1x10 ⁷ FFU	2,5 mg – Oral 2,5 mg – Intravenoso
	X5	7a 3m	6,650		
	AE1	1a 3m	1,550		
	AE13	1a 0m	1,200		

a: ano; m: mês.

3.5.4. Análise hematológica e bioquímica

Os animais anestesiados pela via intramuscular com cloridrato de cetamina (10 mg/kg) foram submetidos à punção venosa femoral. Foram coletados três tubos de sangue utilizando o sistema Vacutainer[®]: 1,5 mL em um tubo de EDTA (BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) para hemograma, 1,5 mL em um tubo com gel separador (BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) para obtenção do soro, e 1,5 mL em um tubo de citrato (BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) para análise de marcadores imunológicos, como por exemplo, células do sistema imune. O soro foi utilizado para detecção do RNA viral, análise do perfil de citocinas, além da análise de padrões bioquímicos, tais como, sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cloro (Cl⁻). As amostras de sangue total e soro foram enviados para análise pelo Serviço de Controle de Qualidade Animal (CECAL/Fiocruz), além de uma lâmina de distensão sanguínea para contagem específica dos leucócitos. O

hemograma foi processado no equipamento automatizado pocH-100iVDiff (Sysmex Europe GmbH, Hamburgo, Alemanha) e o soro foi processado no equipamento Vitros 250 (Ortho Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson, Auckland, Nova Zelândia). As análises de citocinas, marcações celulares (células CD4⁺ e CD8⁺) e perfis de migração e ativação celular estão sendo realizadas no próprio laboratório em um projeto a parte. As amostras de sangue total dos animais J6, AE17 e AE13 coagularam na coleta, portanto, não houve como fazer a contagem de células. O animal Q5 foi a óbito no último dia, conseqüentemente, não foi possível retirar sangue para fazer a contagem de células.

3.5.5. Detecção do RNA viral nas amostras de fezes e soro

Para detecção e quantificação do RNA viral, foi realizada a reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) pelo TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Antes da transcrição reversa, a extração do ácido nucléico foi realizada. Para fezes, foi utilizado o método de extração pela sílica (Boom *et al.*, 1990) com modificações (Leite *et al.*, 1996) a partir de 400 µL de amostras da suspensão fecal 10%. A extração do soro foi realizada pelo kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Basileia, Suíça) a partir de 100 µL. A extensão do cDNA foi procedida com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®] (Applied Biosystems[®]/Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a partir de 10 µL do RNA extraído. Antes do processo, este foi desnaturado com 2 µL dimetil sulfóxido (DMSO) a 97°C durante 7 min e somente após, foi adicionado à mistura dos componentes do kit (10X RT Buffer; dNTP Mix - 100 mM; 10X RT Random Primers; e MultiScribe[™] Reverse Transcriptase - 50 U/µL). A detecção e quantificação do RNA viral a partir do cDNA já amplificado foi realizado pelo qPCR como descrito anteriormente no item 3.2.4.1.

3.6. Aplicação da IgY em diagnóstico

Para demonstrar a funcionalidade da IgY em outras aplicações, testamos uma IgY específica para o vírus da hepatite A (HAV) em um teste diagnóstico, em que a IgY havia sido produzida em um estudo anterior do nosso laboratório (de Paula *et al.*, 2011). A detecção do HAV foi realizada pela imunofluorescência indireta em cortes histológicos de fígado congelado de macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). As amostras de fígado utilizadas

no teste também foram obtidas de um estudo prévio realizado pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (Amado *et al.*, 2010), onde os cynomolgus foram infectados experimentalmente com o isolado de HAV brasileiro (HAF-203; GenBank AF268396).

As amostras de fígado congelado foram recobertas em resina Tissue-Tek[®] (Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart, Estados Unidos) em baixas temperaturas (gelo seco). Em seguida, os fragmentos foram cortados em criostato com uma espessura de 4 µm e aplicados em lâminas, fixados com acetona gelada (4°C) e congelados a -70°C. As lâminas foram bloqueadas com solução de bloqueio contendo 2,5% de BSA e 8% de soro fetal bovino (SFB) por 2 horas em câmara úmida a 37°C. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS (pH 7,2). Posteriormente, os cortes foram incubados durante 1 hora e 30 min com anticorpo primário IgY anti-HAV (0,337 mg/mL) diluído em 1:120 em câmara úmida a 37°C. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS. Finalmente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário IgG anti-IgY produzido em cabra/Alexa Fluor[®] 488 (2 mg/mL) diluído em 1:1.200 (Molecular Probes[®]/Life Technologies[™], Eugene, OR, Estados Unidos) por 1 hora e 30 min em câmara úmida a 37°C. As lâminas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS. O azul de Evans foi utilizado como contracolorante dos cortes histológicos e a lâmina foi finalizada com SlowFade[®] Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen[™]/Life Technologies[™], Carlsbad, Estados Unidos) e lamínula. As imagens da imunofluorescência foram obtidas pelo microscópio confocal LSM Zeiss 510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) do Laboratório de Patologia (IOC/Fiocruz).

Em um experimento paralelo, a título de controle do procedimento, o anticorpo primário foi substituído por uma IgY não específica (0,314 mg/mL) diluída 1:120 para checar a especificidade da marcação nos fígados infectados. E, para o propósito de comparação, uma IgG anti-HAV comercial (0,1 mg/mL) diluída 1:20 (United States Biological, Swampscott, MA, Estados Unidos) também foi testada como anticorpo primário, como previamente descrito (Amado *et al.*, 2010).

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0. Os dados foram relatados como média ± desvio padrão e os níveis de significância foram avaliados utilizando ANOVA. A diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Produção do inóculo de rotavírus humano

A produção dos rotavírus em cultura de células MA-104 apresentou alto rendimento e a purificação em cloreto de cézio destacou-se não só na retirada de resíduos celulares e impurezas, como também na alta concentração do vírus. As frações resultantes da purificação por cloreto de cézio foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida do ácido nucléico para observar em quais havia maior concentração do vírus. Vê-se na Figura 4.1 que as frações 5 e 6 do RVA Wa apresentaram as maiores concentrações do vírus, enquanto no RVA SA11 houve acentuação das frações 4 e 5. Assim, essas duas frações de cada vírus foram unidas e ambas foram quantificadas. A concentração do RVA Wa foi $2,2 \times 10^{10}$ cópias de RNA/mL e o RVA SA11 foi $1,9962 \times 10^8$ cópias de RNA/mL. Sendo assim, foi atingido o objetivo da obtenção de duas suspensões virais altamente concentradas.

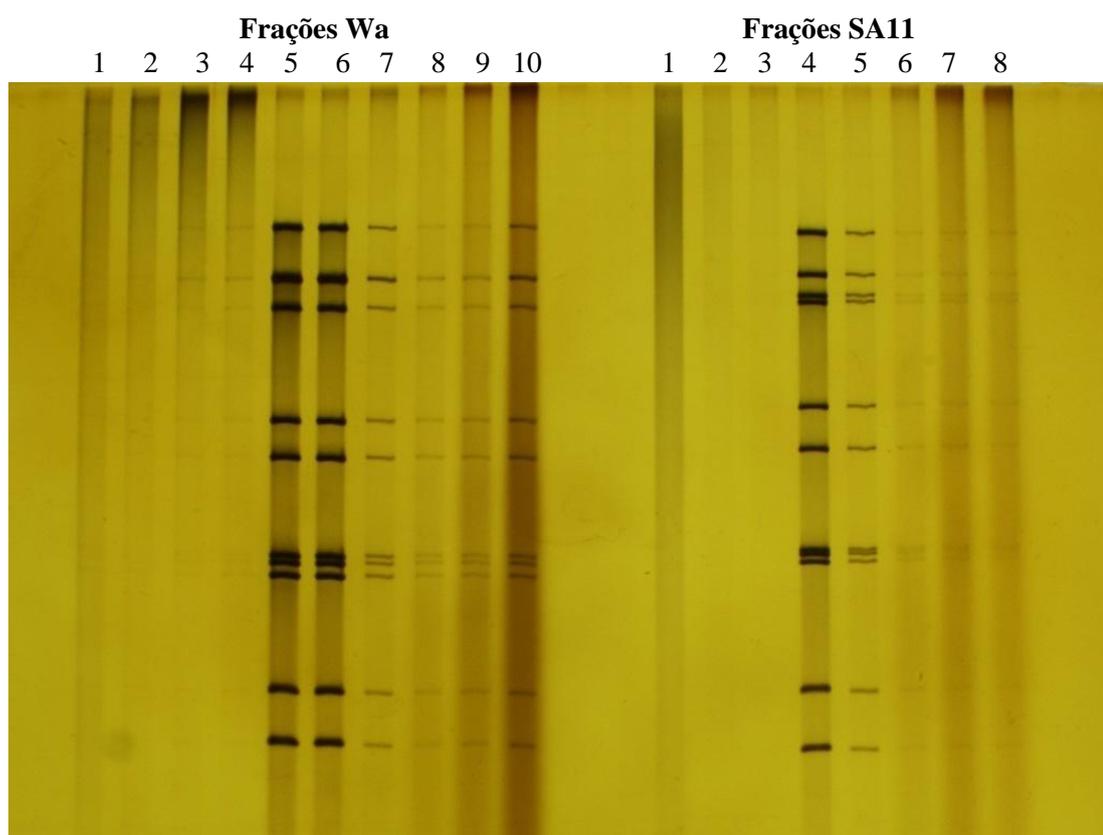


Figura 4.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida do RNA viral das frações purificadas dos rotavírus do grupo A humano (RVA Wa) e símio (RVA SA11).

Isoladamente a análise dos 11 segmentos do RNA é insuficiente para caracterizar que o vírus esteja completo, ou seja, com toda sua partícula formada. Portanto, a eletroforese em gel de poliacrilamida também foi realizada com a finalidade de observar a presença das proteínas virais. Na Figura 4.2 podem ser observadas duas proteínas, VP4 e VP7.

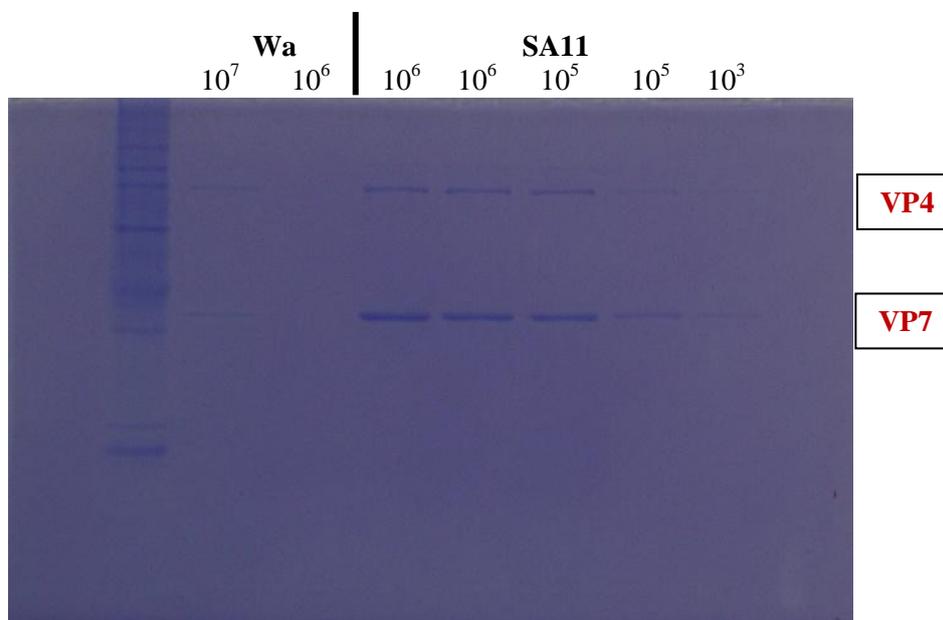


Figura 4.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas virais dos rotavírus do grupo A humano (RVA Wa) e símio (RVA SA11).

Para o rotavírus humano Wa, além da quantificação do vírus pelo PCR em tempo real quantitativo (RT-qPCR), foi realizada a quantificação pelo ensaio de unidade de foco fluorescente (FFU). Neste método a quantidade de partículas infectantes pôde ser aferida, além de confirmar que no inóculo que foi administrado nas aves e nos macacos havia partículas completas e infectantes. Conseguiu-se visualizar foco fluorescente até a diluição de 10^{-7} , como pôde ser observado na Figura 4.3, portanto, a contagem destes focos foi realizada nesta última diluição e calculou-se a dose de partículas infectantes (Arnold *et al.*, 2009). A concentração viral obtida do rotavírus Wa através da contagem de unidade de foco fluorescente foi $3,1 \times 10^9$ FFU/mL.

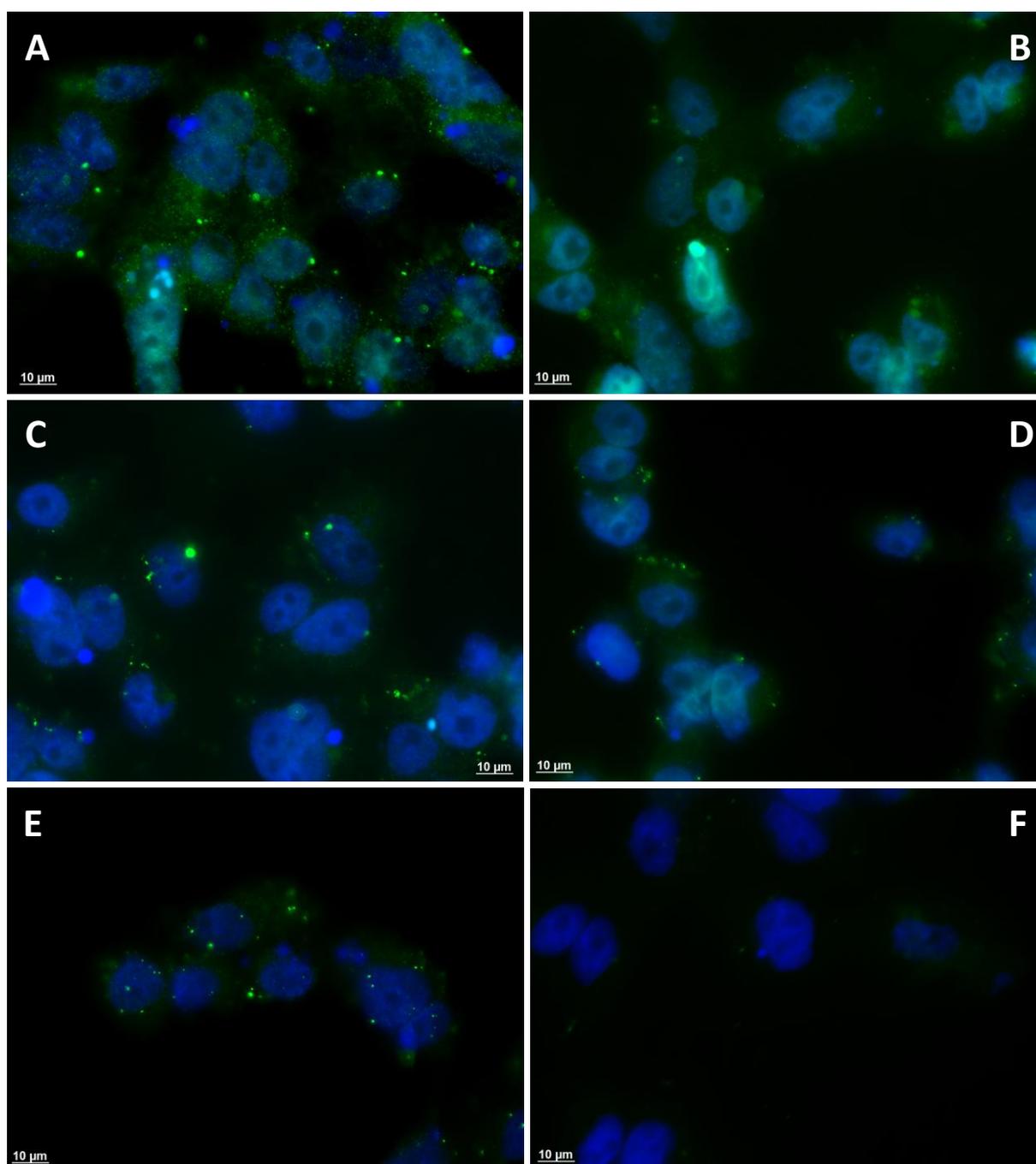


Figura 4.3 – Quantificação do rotavírus do grupo A humano (RVA Wa) pelo ensaio de unidade de foco fluorescente (FFU). [A] Diluição do RVA em 10^{-3} ; [B] Diluição do RVA em 10^{-4} ; [C] Diluição do RVA em 10^{-5} ; [D] Diluição do RVA em 10^{-6} ; [E] Diluição do RVA em 10^{-7} ; [F] Diluição do RVA em 10^{-8} .

4.2. Produção da IgY anti-RVA nas aves (*Gallus gallus domesticus*)

4.2.1. Observação clínica

As frangas foram observadas duas vezes ao dia (pela manhã e à tarde) dentro de suas gaiolas durante os dias que se seguiram à inoculação. Visualizam-se as características gerais e

as de comportamento. Em nenhum animal foi observado quaisquer manifestações clínicas. A área da inoculação não provocou dor, desconforto ou dano tecidual.

4.2.2. Pesagem das aves

Com o objetivo de investigar o estresse causado nos animais e a toxicidade dos adjuvantes utilizados nas imunizações, a variação de peso dos animais foi verificada entre os grupos durante o experimento. No Gráfico 4.1, observamos a média de peso das aves em cada grupo por imunização. Não houve diferença na cinética de crescimento comparando as aves inoculadas ou não com os rotavírus.

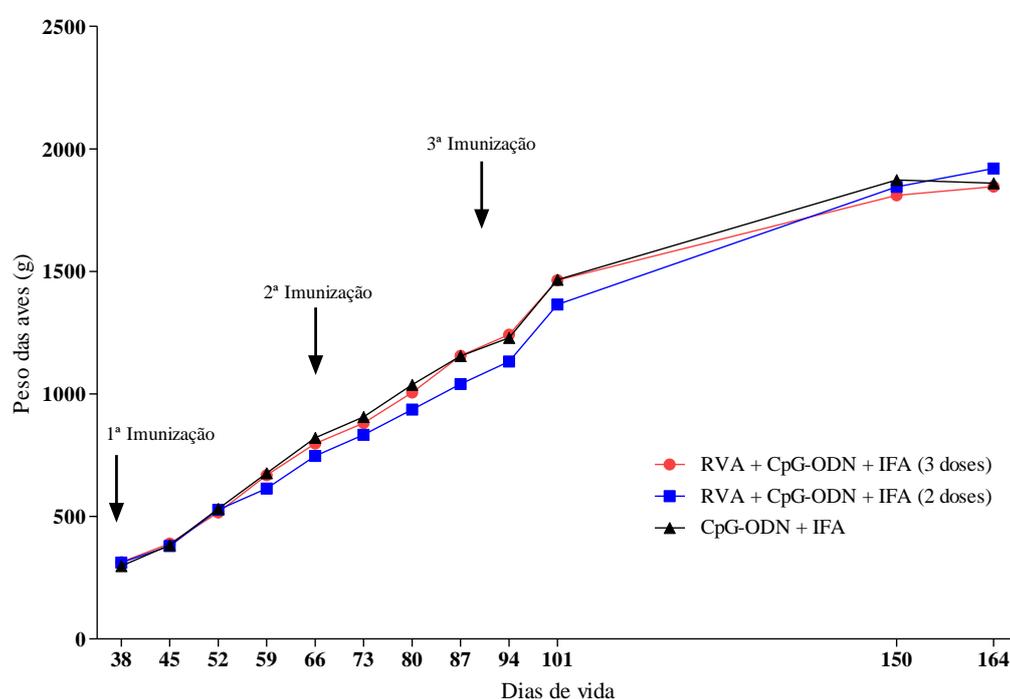


Gráfico 4.1 – Média do peso corporal das frangas de cada grupo após as imunizações. Grupo I: RVA + CpG-ODN + IFA (3 doses); Grupo II: RVA + CpG-ODN + IFA (2 doses); Grupo III: CpG-ODN + IFA.

4.2.3. Histopatologia

Todos os animais apresentaram no fígado áreas de congestão e esteatose difusa com discreta alteração da arquitetura acinar. No baço, apenas congestão foi visualizada. Os rins apresentaram-se histologicamente normais.

4.2.4. Dosagem das proteínas totais purificadas

Pelo método de *Lowry* quantificamos a concentração total de proteínas purificadas da gema do ovo durante as 13 semanas de coleta. A concentração de cada amostra pode ser vista

na Tabela 4.1. Na primeira semana somente as aves do Grupo I haviam iniciado o ciclo de postura, portanto, não houve quantificação dos Grupos II e III. Nas primeiras semanas de coleta a quantidade de proteína não foi tão alta, principalmente no Grupo II. No entanto, a partir da 5ª semana de postura, o Grupo II alcançou o mesmo patamar de concentração dos outros dois grupos, com o pico de concentração na 9ª semana e manteve-se alto até a última semana (Gráfico 4.2). O Grupo I que recebeu três imunizações com imunógeno (RVA) apresentou concentração de proteínas totais mais alta em relação aos outros grupos praticamente durante toda a coleta dos ovos (Gráfico 4.2). O Grupo III teve dosagem bem abaixo dos outros grupos até a 10ª semana, a concentração elevou a partir da semana 11, se igualando aos demais grupos (Gráfico 4.2). A maior concentração alcançada foi a do Grupo I na 10ª semana com 59,5 mg/mL de proteínas totais (Tabela 4.1). A concentração média dos Grupos I, II e III foram 37,35 mg/mL, 31,58 mg/mL e 27,46 mg/mL, respectivamente. Houve diferença entre os grupos imunizados com significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4.1 – Concentração das proteínas totais purificadas da gema em cada grupo nas 13 semanas de coleta dos ovos.

	Grupo I (mg/mL)	Grupo II (mg/mL)	Grupo III (mg/mL)
Semana 1	18	*	*
Semana 2	32	7	30
Semana 3	32	11	20
Semana 4	42	24	21
Semana 5	20	19	16
Semana 6	32	38	24
Semana 7	42	38	34
Semana 8	34	36	15
Semana 9	46	49	26
Semana 10	59,5	35	19
Semana 11	34	36	38
Semana 12	44	40	52,5
Semana 13	50	46	34

Grupo I: RVA + CpG-ODN + IFA (3 doses); Grupo II: RVA + CpG-ODN + IFA (2 doses); Grupo III: CpG-ODN + IFA. *Não há amostra.

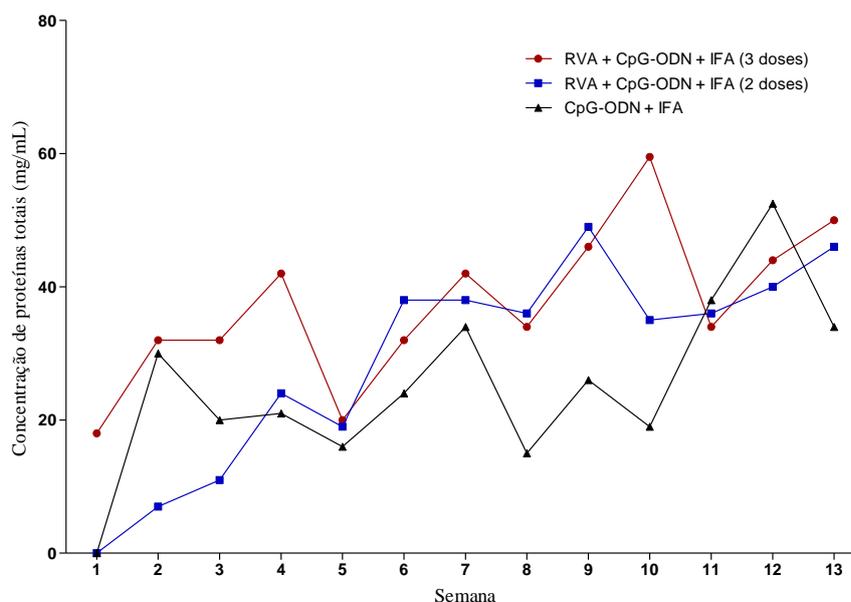
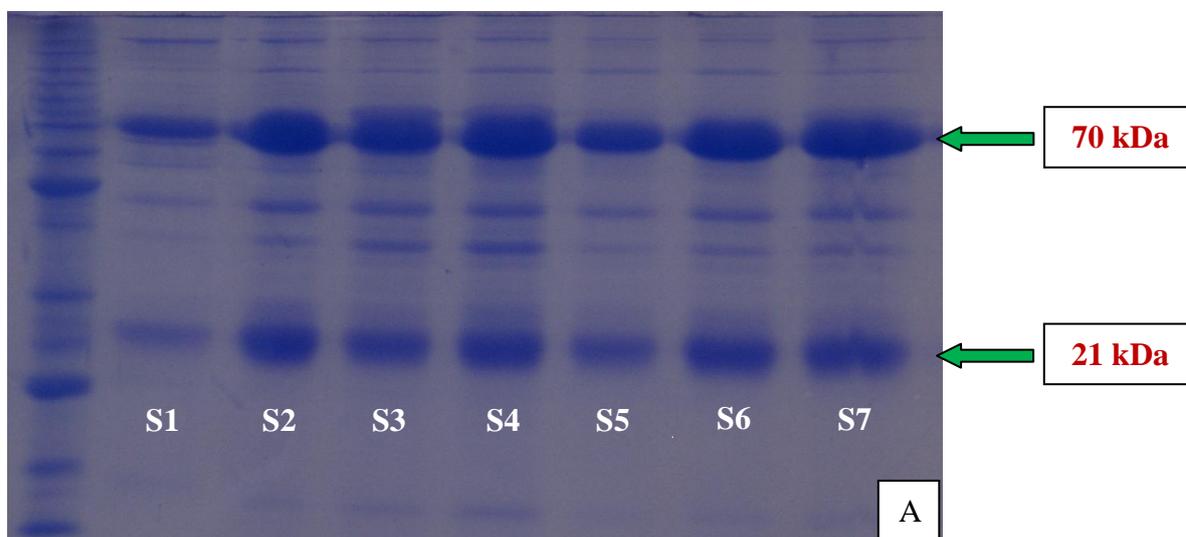


Gráfico 4.2 – Concentração das proteínas totais purificadas da gema em cada grupo nas 13 semanas de avaliação. Grupo I: RVA + CpG-ODN + IFA (3 doses); Grupo II: RVA + CpG-ODN + IFA (2 doses); Grupo III: CpG-ODN + IFA.

4.2.5. Caracterização da IgY anti-RVA purificada

4.2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O padrão eletroforético das proteínas purificadas da gema do ovo está de acordo com o padrão da IgY (Figura 4.4), onde o peso molecular da cadeia leve é 21 kDa e a cadeia pesada de 70 kDa (Hatta *et al.*, 1993). Pode-se constatar também que nas amostras havia outras proteínas além da IgY, porém, em quantidade bem inferior. Em todos os grupos as bandas mais espessas eram as das cadeias da IgY, ou seja, em maior quantidade que as demais proteínas.



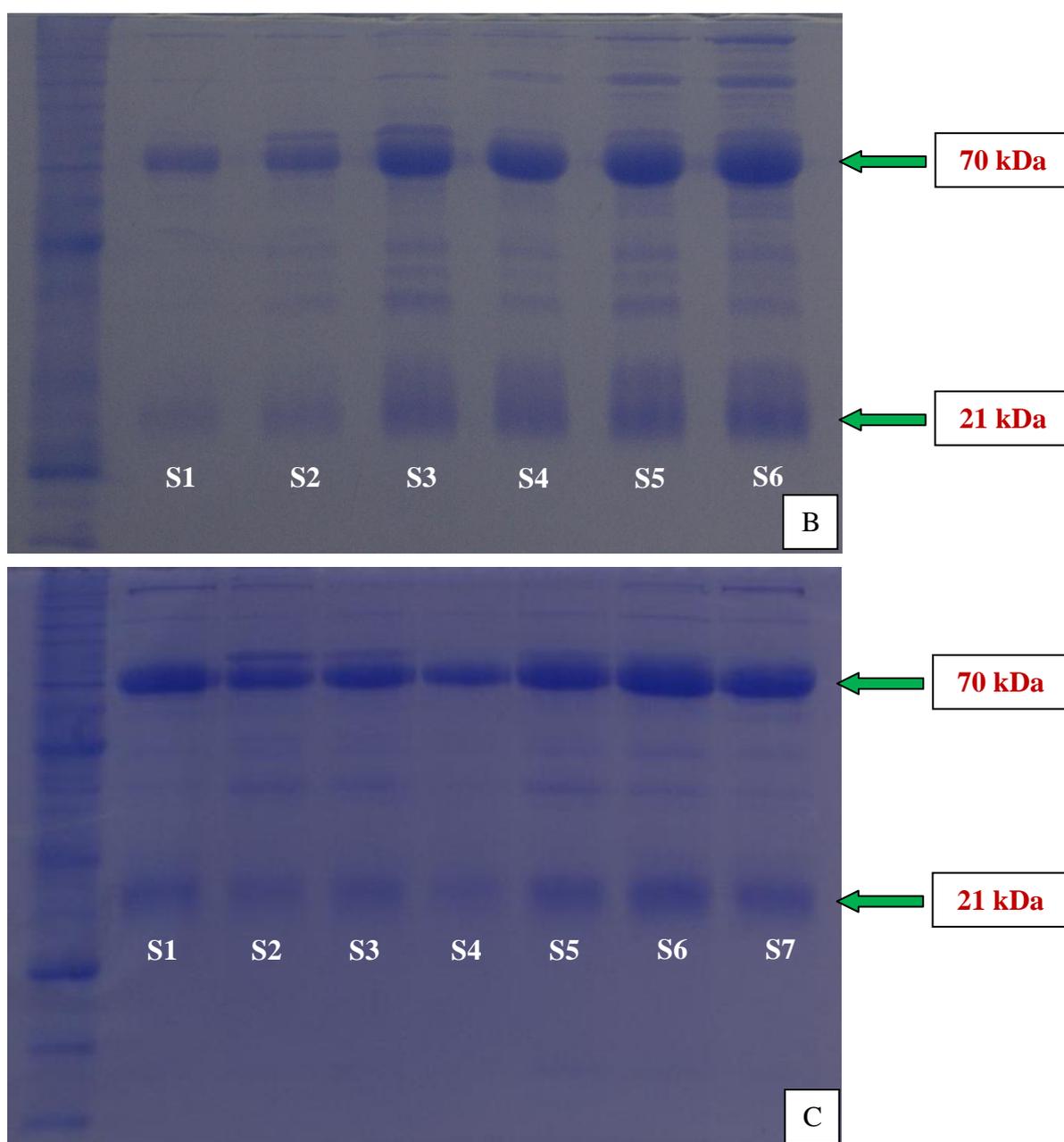


Figura 4.4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da IgY. [A] Grupo I (3 doses do imunógeno); [B] Grupo II (2 doses do imunógeno); [C] Grupo III (controle); **PM:** peso molecular.

4.2.5.2. *Western blotting*

No *western blotting*, a IgY purificada de cada grupo foi incubada com as proteínas virais que foram transferidas para a membrana de nitrocelulose. Nos grupos que receberam o rotavírus como imunógeno (I e II) muitas proteínas do vírus foram reveladas. No entanto, o Grupo III (controle) quando incubado com as proteínas virais, nenhuma proteína do RVA foi revelada. Deste modo, identificamos especificidade do anticorpo purificado para o rotavírus, tanto símio como humano. Esses resultados constam na Figura 4.5.

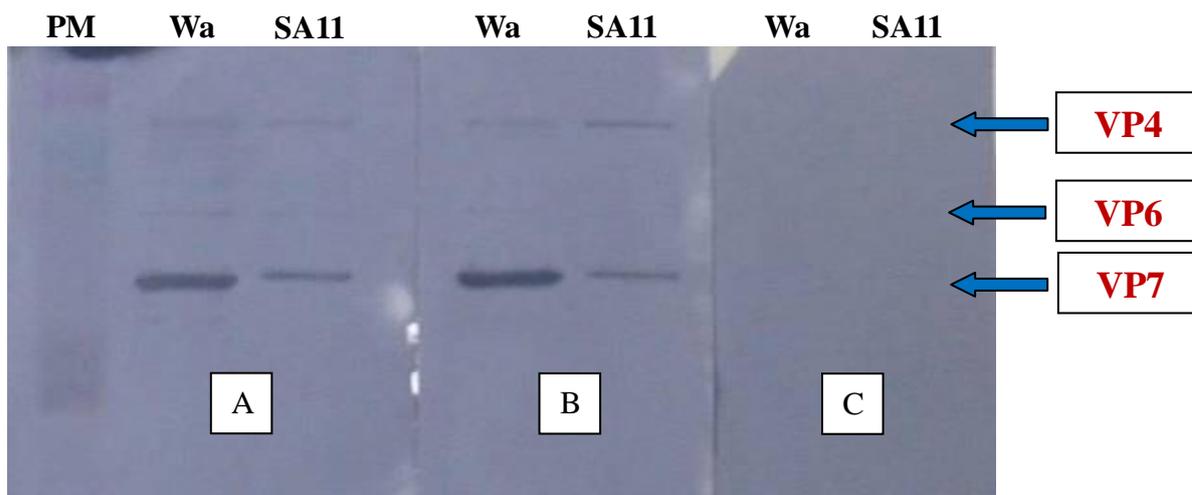


Figura 4.5 – *Western blotting* da IgY anti-RVA. Presença de bandas específicas para o rotavírus apenas nas membranas referentes aos Grupos I e II. Na coluna referente ao Grupo III não há banda específica. [A] Grupo I (3 doses do imunógeno); [B] Grupo II (2 doses do imunógeno); [C] Grupo III (controle). **PM**: peso molecular; **Wa**: rotavírus humano; **SA11**: rotavírus símio.

4.3. Estabelecimento do modelo de infecção pelo RVA em macacos cynomolgus

4.3.1. Observação clínica

Os sinais clínicos característicos da infecção pelo RVA: hipertermia ($\geq 38,5^{\circ}\text{C}$), vômitos, anorexia e perda de peso foram investigados durante o estudo. Diarreia foi observada durante o curso da infecção. Apenas o cynomolgus T7 teve duração por três dias (do 7° ao 9° dpi) e no animal AB7 por dois dias (2° e 3° dpi), ambos do Grupo Desafio. Três animais (Z7, T7 e AA7) apresentaram hipertermia, todos do Grupo inoculado com RVA, apresentando temperaturas de $38,6^{\circ}\text{C}$ (7° dpi), $38,5^{\circ}\text{C}$ (1° dpi) e $39,0^{\circ}\text{C}$ (1° dpi), respectivamente (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Temperatura dos macacos cynomolgus durante os 11 dias de estabelecimento do modelo experimental.

	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)									
	0 dpi	1 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi
Grupo Controle										
V7	36,0	36,9	37,0	37,2	36,0	36,5	36,4	36,6	37,0	37,5
X11	37,5	38,2	37,2	38,1	36,6	37,1	38,2	37,0	36,8	37,1
Grupo Desafio										
AB7	36,0	37,7	36,5	37,5	36,9	37,0	37,4	36,6	37,1	36,4
Z7	36,8	37,3	36,7	38,1	37,8	38,2	38,6	37,5	37,3	36,5
V11	37,5	38,4	37,4	38,0	36,1	36,9	36,7	37,0	37,2	37,0
U13	37,4	37,7	36,8	37,7	36,5	37,1	37,4	37,9	37,2	37,0
T7	38,2	38,5	37,2	37,9	37,0	37,0	37,1	37,3	36,9	36,8
AA7	36,6	39,0	36,1	37,0	37,9	37,6	37,5	37,5	37,1	37,4
X9	37,4	38,1	37,6	37,7	37,2	37,5	37,4	37,1	37,3	37,2

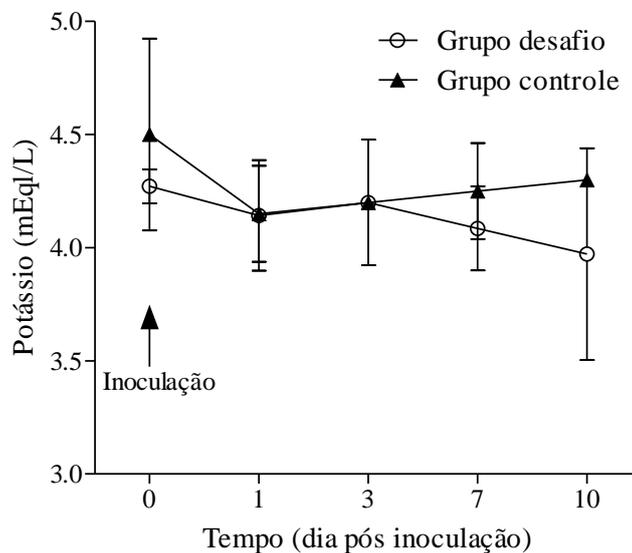
Os números em vermelho representam os episódios de hipertermia.

4.3.2. Dados hematológicos e bioquímicos

Houve queda nos níveis séricos de potássio (K^+) do 7° ao 10° dpi no grupo dos animais inoculados do Grupo Desafio comparativamente em relação ao Grupo Controle (Gráfico 4.3a). Dividindo o Grupo Desafio em dois, em animais com hipopotassemia e sem hipopotassemia, visualiza-se que dos três cynomolgus do Grupo Desafio com hipopotassemia (T7, AB7 e AA7), dois deles tiveram diarreia. No Gráfico 4.3b constata-se que nestes três

animais a hipocalemia (do 1° ao 10° dpi) foi bem significativa quando comparada com os demais animais, Grupo Desafio sem hipopotassemia e Grupo Controle.

[a]



[b]

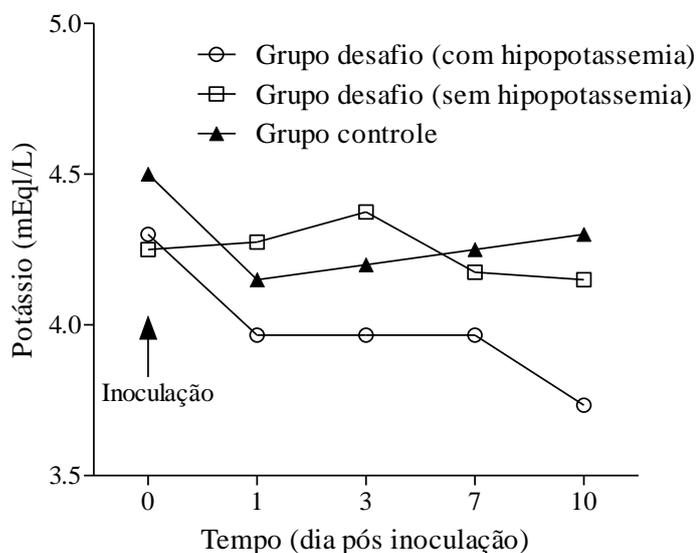
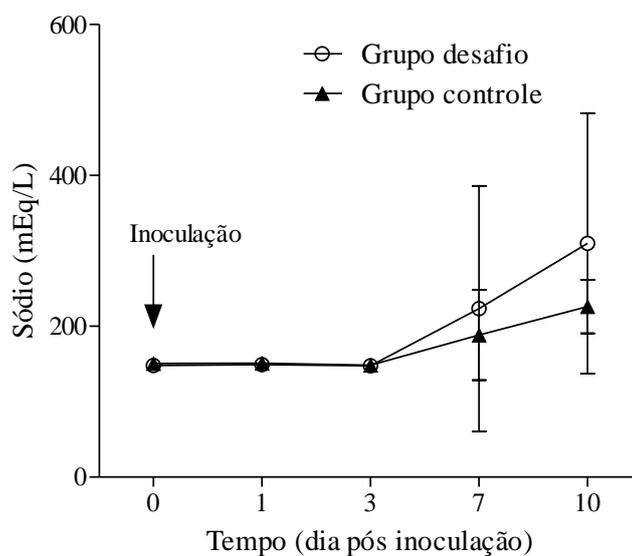


Gráfico 4.3 – Níveis séricos de potássio nos macacos cynomolgus. [a] Diferença dos níveis séricos de potássio entre os macacos do Grupo Desafio e os macacos do Grupo controle. A seta representa o momento da inoculação. [b] Divisão do Grupo Desafio entre animais com e sem hipopotassemia. Diferença dos níveis de potássio sérico entre os macacos do Grupo desafio sem hipopotassemia, os macacos do Grupo Desafio com hipopotassemia (T7, AB7 e AA7), e os macacos do Grupo Controle. A seta representa o momento da inoculação.

Os níveis séricos de sódio (Na^+) e cloro (Cl^-) (Gráfico 4.4), bem como as contagens hematológicas não tiveram alterações entre os dois grupos. Uma elevação na contagem de linfócitos foi observada somente em um animal, AB7, do 7º dpi até o final da infecção ($5,6 \times 10^3$ linfócitos/mL) (Gráfico 4.5).

[a]



[b]

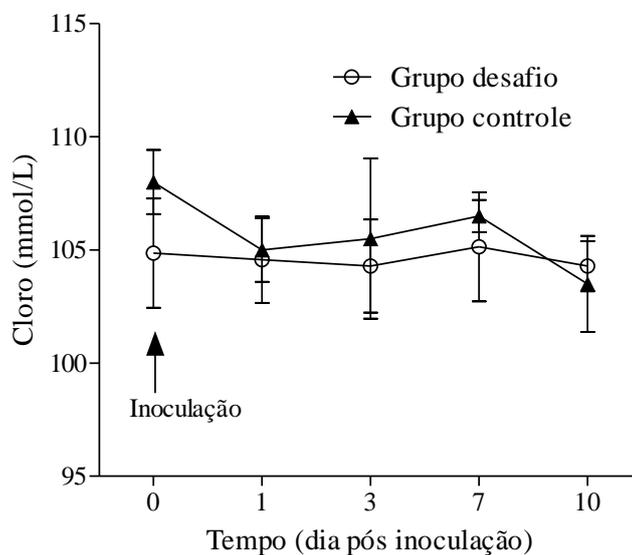


Gráfico 4.4 – Comparação dos níveis séricos de sódio [a] e cloro [b] entre os macacos cynomolgus do Grupo Desafio e os macacos do Grupo Controle. A seta representa o momento da inoculação.

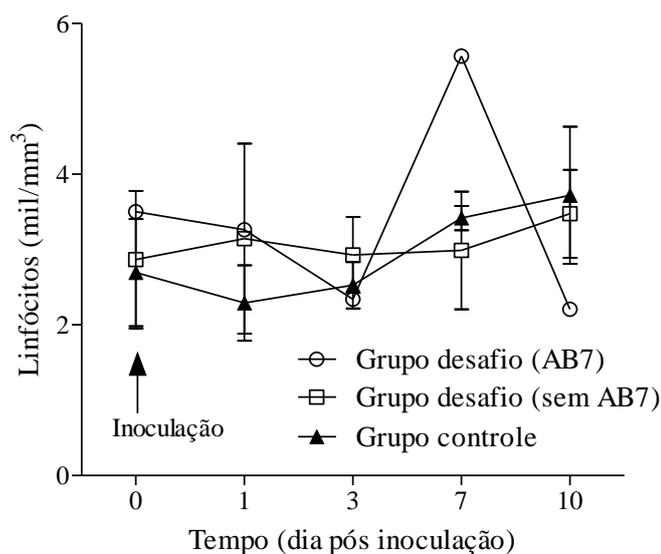


Gráfico 4.5 – Contagem de linfócitos dos macacos cynomolgus. Linfocitose ($5,6 \times 10^3$ linfócitos/mL) do animal AB7 (Grupo Desafio) quando comparado com os demais animais. A seta representa o momento da inoculação.

4.3.3. Detecção do RVA nas amostras

A confirmação da replicação do RVA nos enterócitos dos macacos ocorreu pela detecção contínua do RNA viral nas fezes e por um curto período da detecção do RNA viral no soro, no entanto, cabe ressaltar que esses achados não foram associados aos episódios de diarreia. Todos os macacos inoculados do Grupo Desafio tiveram eliminação de RVA em suas fezes. Esta eliminação viral nas amostras de fezes obedeceu a um padrão intermitente. A primeira detecção do RNA viral ocorreu entre 1° e 3° dpi e persistiu do 7° ao 10° dpi. Os macacos do Grupo Desafio apresentaram um intervalo de um a dois dias sem detecção do RNA viral em suas fezes, cinco deles (AB7, T7, X9, AA7 e Z7) tiveram este intervalo duas vezes. Durante o curso da infecção, a média de detecção viral no grupo desafio foi de 10^3 cópias de RNA/mg de fezes. O RNA viral foi detectado no soro em 5 dos 7 animais do Grupo Desafio no 1° e 3° dpi. Em quatro dos cinco macacos, a detecção foi em somente um dia, no entanto, no macaco Z7, houve detecção nesses dois dias. Os dias e a concentração de vírus encontrada nas fezes e nos soros estão presentes na Tabela 4.3. Os testes de ELISA não detectaram nenhuma amostra positiva para RVA.

Tabela 4.3 – Macacos cynomolgos inoculados com RVA por via oral. Quantificação de RVA nas fezes e soro em diferentes tempos após a inoculação, detecção realizada pelo RT-qPCR.

	Grupo Controle			Grupo Desafio					
	V7	X11	Z7	AB7	V11	T7	X9	U13	AA7
Idade	6a 10m	5a 8m	4a 6m	2a 8m	6a 8m	8a 9m	5a 9m	7a 2m	3a 5m
DPI	Fezes (cópias RNA/mg)								
0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	5.709x10 ³	(-)	6.137x10 ³	(-)
2	(-)	(-)	5.691x10 ³	3.0x10 ³	6.5x10 ⁶	1.749x10 ³	(-)	4.646x10 ³	5.4x10 ³
3	(-)	(-)	5.211x10 ³	(-)	3.6x10 ³	8.229x10 ³	3.531x10 ³	4.594x10 ³	1.041x10 ⁴
4	(-)	(-)	(-)	4.714x10 ³	1.068x10 ⁴	(-)	4.269x10 ³	(-)	3.669x10 ³
5	(-)	(-)	(-)	3.686x10 ³	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	4.217x10 ³	3.12x10 ³	9.909x10 ³	4.251x10 ³	2.160x10 ³	8.674x10 ³	1.174x10 ⁴
7	(-)	(-)	1.01x10 ⁴	2.451x10 ³	1.239x10 ⁴	1.903x10 ³	(-)	(-)	4.149x10 ³
8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	3.497x10 ³	(-)	(-)	3.36x10 ³	(-)	6.703x10 ³
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	3.051x10 ³	(-)	(-)	(-)
DPI	Soro (cópias RNA/mL)								
0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1	(-)	(-)	1.455x10 ³	(-)	(-)	(-)	1.589x10 ³	2.253x10 ³	(-)
3	(-)	(-)	9.549x10 ²	2.157x10 ³	9.206x10 ²	(-)	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

DPI: Dia(s) pós-inoculação; (-): Não detectado; a: ano; m: mês.

Limite mínimo de detecção RT-qPCR é de 4,4x10² copias de RNA/mg ou mL (Freeman *et al.*, 2008).

A infecção de células MA-104 com amostras fecais foi realizada para confirmar que a detecção nas fezes não era meramente RNA livre, mas sim, partículas infecciosas completas. Os sete animais inoculados foram confirmados com a presença de partículas infecciosas nas fezes pela replicação viral na cultura de células. As fezes do macaco V7, um dos macacos controle, não apresentou infecção das células (Figura 4.6).

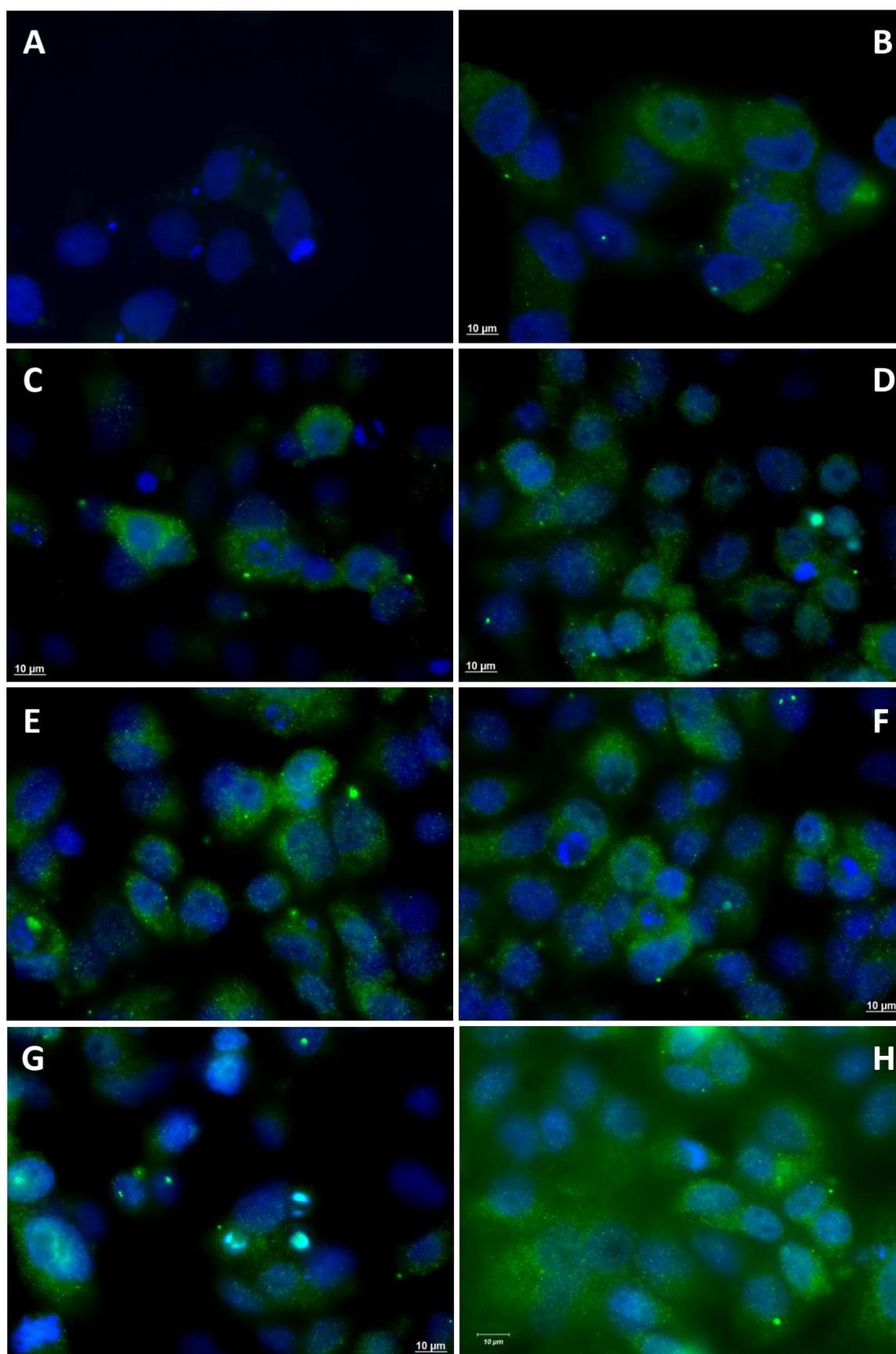


Figura 4.6 – Evidência de excreção de partículas infecciosas de rotavírus nas fezes dos macacos. Imunofluorescência indireta da cultura de células infectada com rotavírus das fezes dos macacos. [A] V7 (6° dpi - macaco controle); [B] AA7 (6° dpi); [C] T7 (7° dpi); [D] U13 (6° dpi); [E] Z7 (7° dpi); [F] X9 (6° dpi); [G] V11 (7° dpi); [H] AB7 (5° dpi).

Estes dados apresentados do estabelecimento do macaco cynomolgus como modelo de infecção experimental foram submetidos à revista Intervirology em forma de artigo científico, e estão sob análise da revista para publicação.

4.4. Imunoterapia para RVA em macacos cynomolgus

4.4.1. Ensaio de neutralização em cultura de células

Para obtenção da concentração ideal de IgY anti-RVA necessária para neutralizar o vírus, procedeu-se com um ensaio de neutralização *in vitro*. Além da quantidade adequada de anticorpo, esta metodologia ajudou a confirmar a especificidade e eficácia da IgY no bloqueio da penetração do RVA nas células MA-104. Os resultados indicaram que os anticorpos de IgY foram eficazes na neutralização até a concentração de 2,0 mg/mL. A replicação viral começou a ocorrer na diluição de 1,5 mg/mL da IgY, como demonstrado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Teste de neutralização do rotavírus com IgY anti-rotavírus.

	Concentração IgY	Cópias de RNA/ μ L	Neutralização
RVA + IgY α -RVA	4,0 mg/mL	ND	sim
	3,5 mg/mL	ND	sim
	3,0 mg/mL	ND	sim
	2,5 mg/mL	ND	sim
	2,0 mg/mL	ND	sim
	1,5 mg/mL	1,94	não
	1,0 mg/mL	6,61	não
	0,75 mg/mL	5,19	não
	0,5 mg/mL	3,24	não
Controle positivo da infecção (RVA)		5,05x10 ²	-

ND = Não detectado

4.4.2. Observação clínica

Clinicamente apenas o cynomolgus Q5 do Grupo Prova do Princípio (RVA + IgY) apresentou diarreia com fezes líquidas durante todos os dias da experimentação após a inoculação. A gastroenterite foi grave ao ponto do animal não ter controle da eliminação fecal. Quando anestesiado e sedado, para coleta de sangue, os episódios diarréicos eram

frequentes. Esta diarreia não foi observada em nenhum outro animal. No 4º dpi, o animal foi a óbito. Procedeu-se com a necropsia para retirada de fragmentos do intestino para detecção do rotavírus.

Pela temperatura corporal os animais AE15 e AE1 revelaram hipertermia. O AE15 do grupo de macacos controle inoculados com RVA, apresentou 38,5°C no 1º e 2º dpi. O cynomolgus AE1 do grupo inoculado com RVA e tratado com IgY oral e intravenosa (IOIV), indicava 38,6°C no 1º dpi. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Temperatura dos macacos cynomolgus durante os 5 dias de imunoterapia.

		Temperatura (°C)				
		0 dpi	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi
CN	B2	38,0	38,2	38,3	36,9	37,6
	J6	37,4	38,4	38,2	36,4	37,3
CP	AE11	36,9	37,7	38,3	36,4	37,9
	AE15	37,8	38,5	38,5	37,0	37,1
RVA + IgY	R9	36,1	37,5	37,7	37,5	37,2
	Q5	37,9	37,8	38,1	36,0	-
IO	AD15	37,6	37,4	37,2	36,7	-
	AA3	37,1	37,9	37,4	37,6	37,6
	AE5	37,9	37,5	36,4	37,0	37,9
	AE17	38,1	37,6	38,4	36,0	37,3
IOIV	AD13	38,4	37,8	37,9	36,5	38,0
	X5	36,3	36,6	38,2	37,8	37,2
	AE1	37,6	38,6	38,0	37,0	37,2
	AE13	37,9	37,1	36,6	36,7	36,6

CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo; RVA + IgY: Prova do Princípio; IO: Imunoterapia Oral; IOIV: Imunoterapia Oral e Intravenosa. Os números em vermelho representam os episódios de hipertermia.

4.4.3. Dados hematológicos e bioquímicos

A análise bioquímica basicamente levou em consideração a dosagem de eletrólitos (K^+ , Na^+ e Cl^-). Nesta análise, observou-se diminuição acentuada dos níveis séricos de sódio e cloro somente do grupo da Prova do Princípio (RVA + IgY). O potássio deste grupo também

teve valores inferiores aos demais grupos. Na análise individual de cada animal, observou-se que o macaco Q5 foi responsável pela queda acentuada desses níveis no grupo RVA + IgY desde o 1º dpi. Para o sódio e o cloro, a queda foi acentuada até o 4º dpi. Este foi o único macaco que teve diarreia dentre todos os animais. Esses dados podem ser visualizados no Gráfico 4.6.

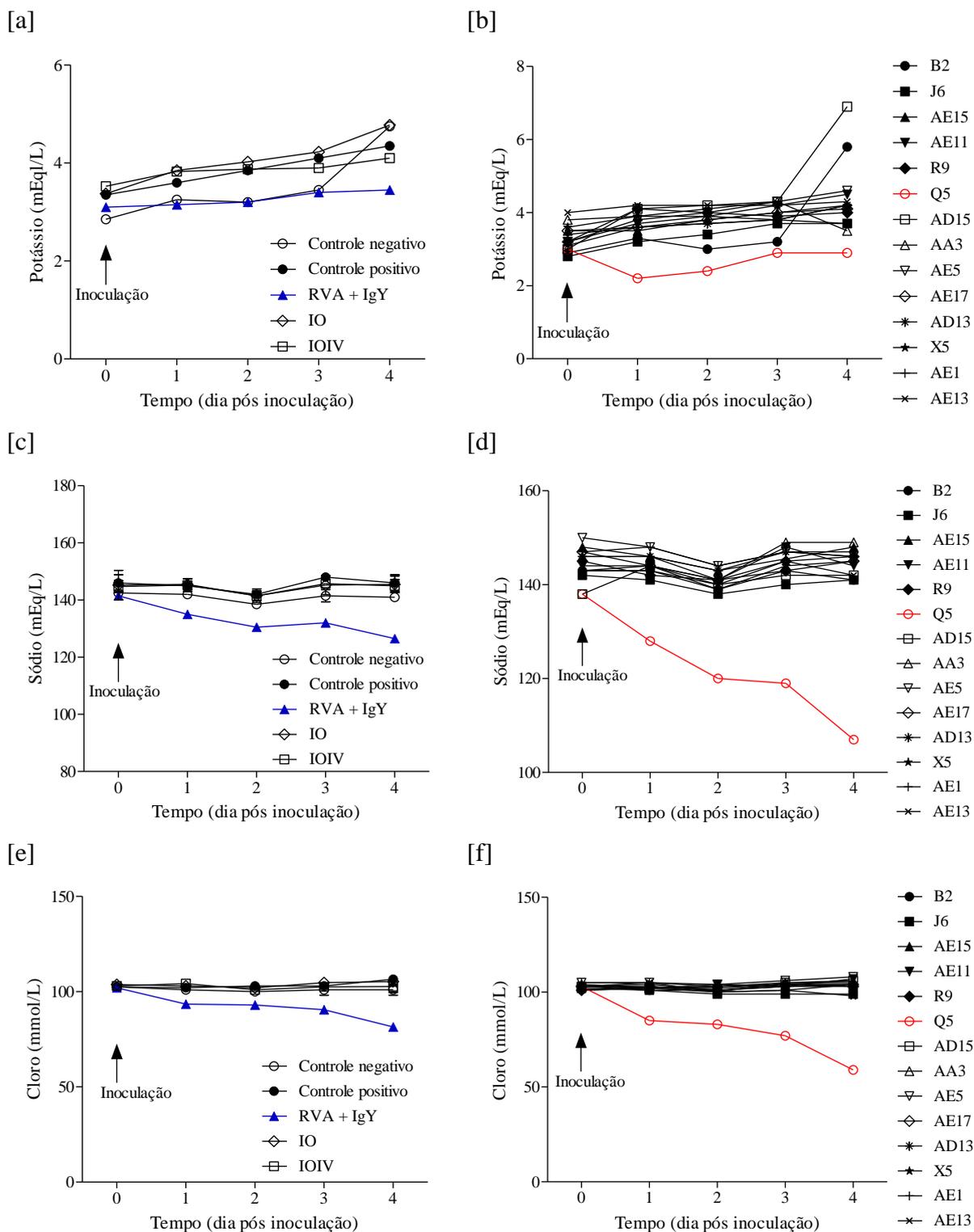
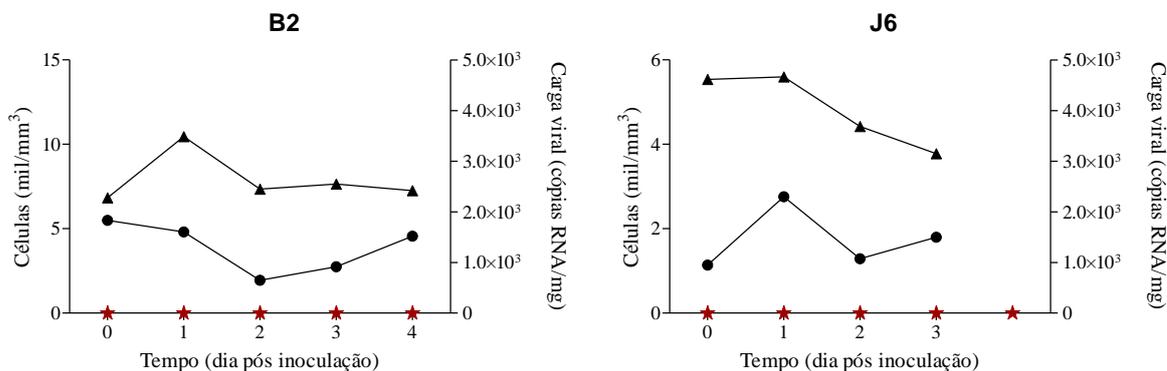


Gráfico 4.6 – Níveis séricos de potássio [a] e [b], sódio [c] e [d], e cloro [e] e [f] nos macacos cynomolgus. Os gráficos [a], [c] e [e] representam os níveis dos três eletrólitos referidos, respectivamente, nos cinco grupos testados. Observa-se que para os três eletrólitos, o grupo da prova

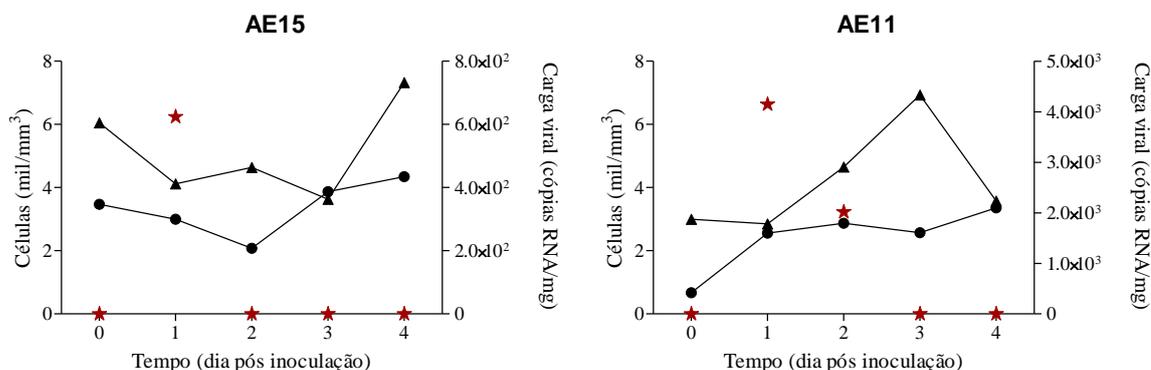
do princípio (RVA + IgY – linha azul) apresentou leve queda ou valores mais baixos que os demais grupos após a inoculação. Quando se analisou individualmente os animais, nos gráficos [b], [d] e [f], observa-se que o macaco Q5 (linha vermelha) foi o responsável por essa queda no grupo RVA + IgY, pois foi o animal único que perdeu muita quantidade de eletrólitos, principalmente sódio e cloro. A seta representa o momento da inoculação.

Foi observado que o aumento na contagem dos neutrófilos segmentados e linfócitos ocorreu nos animais AE15 (4º dpi), AE11 (2º e 3º dpi), R9 (2º dpi), Q5 (2º e 3º dpi), AD15 (2º dpi), AE17 (2º dpi) e AD13 (2º e 3º dpi); e diminuição na contagem de neutrófilos segmentados nos cynomolgus AA3 (1º ao 4º dpi), AE5 (1º ao 4º dpi), X5 (2º e 3º dpi) e AE13 (1º ao 3º dpi). A contagem de linfócitos apresentou elevação no AE15 (3º e 4º dpi), AE11 (1º ao 4º dpi), R9 (1º dpi), AA3 (1º ao 4º dpi), AE5 (1º ao 4º dpi), AE17 (2º e 3º dpi), AD13 (2º e 3º dpi), X5 (4º dpi), AE1 (1º ao 4º dpi) e AE13 (1º ao 3º dpi). Esses dados podem ser visualizados no Gráfico 4.7.

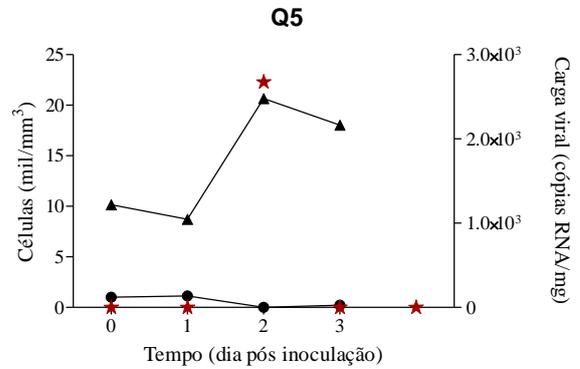
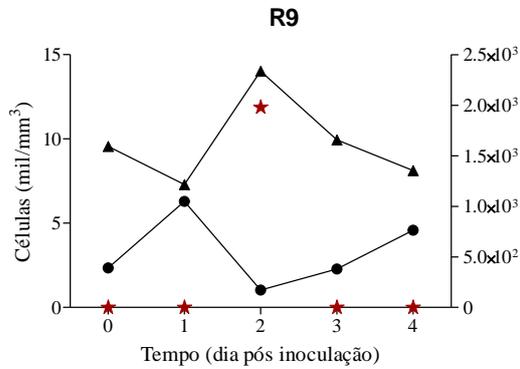
Grupo Controle Negativo



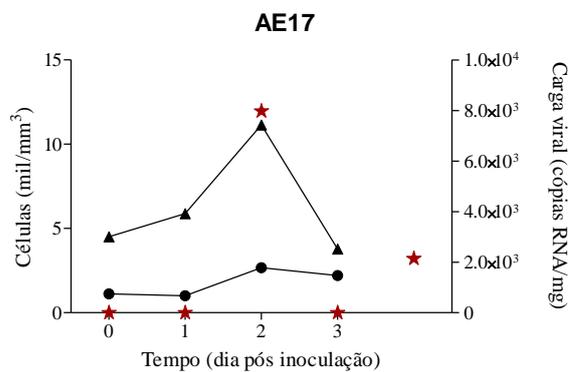
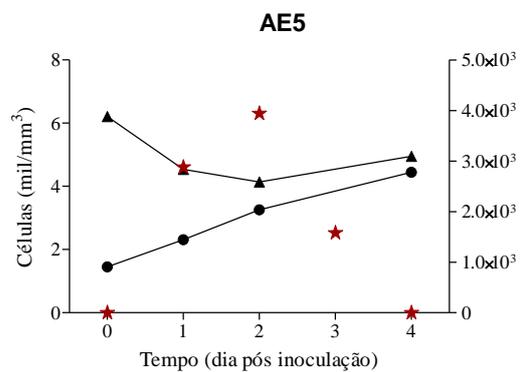
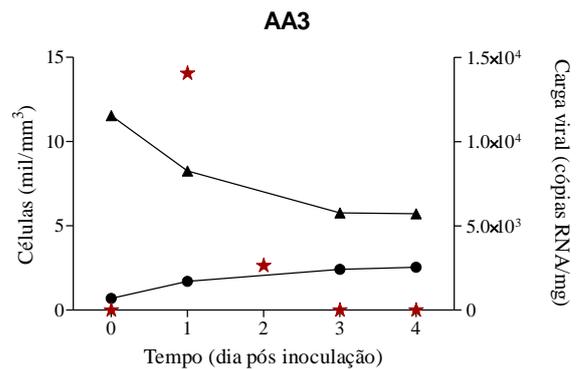
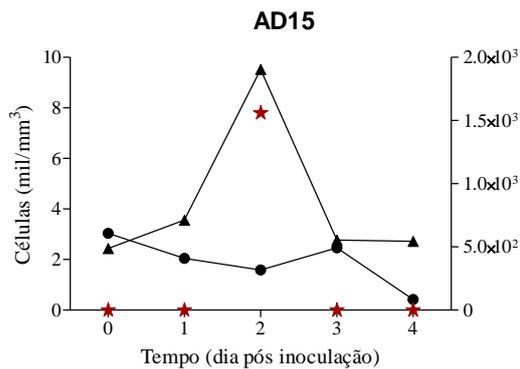
Grupo Controle Positivo



Grupo Prova do Princípio (rotavírus + IgY)



Grupo Imunoterapia Oral



Grupo Imunoterapia Oral e Intravenosa

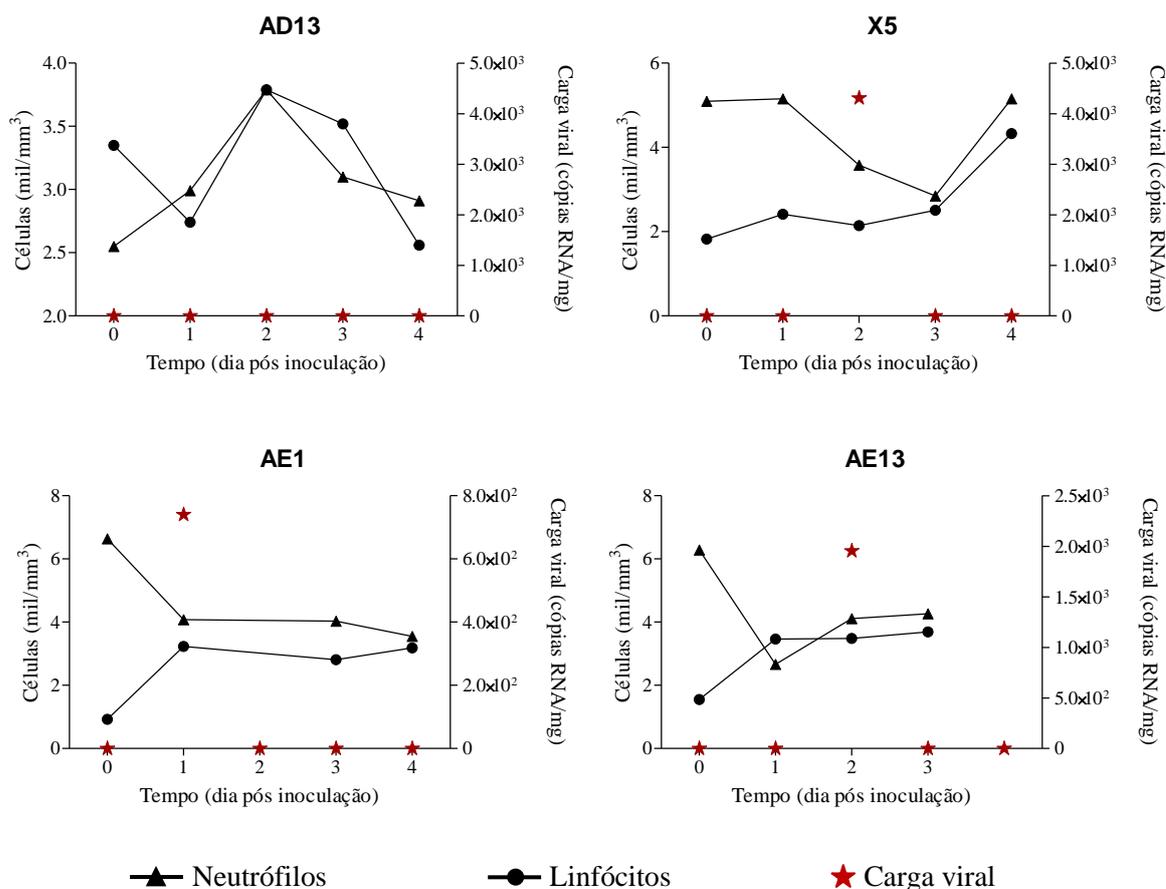


Gráfico 4.7 – Contagem de linfócitos e neutrófilos dos macacos cynomolgus. Cada animal está individualizado em um gráfico.

4.4.4. Detecção do RVA nas amostras

Fezes e soro foram coletados durante os cinco dias de experimentação para detecção do RNA viral. Os animais pertencentes ao grupo Controle Negativo não tiveram RNA viral detectado nas fezes. Contudo, todos os animais que receberam inóculo contendo rotavírus de alguma forma tiveram eliminação do RNA viral em suas fezes, exceto o macaco AD13. Semelhante ao que ocorreu na primeira infecção experimental, a primeira detecção do RNA viral ocorreu no 1º ou 2º dpi, e na maioria dos animais o RNA viral foi encontrado de um a dois dias, exceto o AE15, que teve detecção do 1º ao 3º dpi, portanto, três dias de eliminação viral. No entanto, diferente do que foi observado no experimento anterior, não houve intermitência na eliminação viral nas fezes, mesmo porque o período de experimentação durou apenas cinco dias. O RNA viral não foi detectado no soro em nenhum dos animais. Os dias e a quantidade de vírus encontrada nas fezes podem ser observados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Quantificação de RVA nas fezes dos macacos cynomolgus pelo RT-qPCR.

Grupo	Macaco	Fezes (cópias RNA/mg)				
		0 dpi	1° dpi	2° dpi	3° dpi	4° dpi
Controle Negativo	B2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	J6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Controle Positivo	AE15	(-)	6,24x10 ²	(-)	(-)	(-)
	AE11	(-)	4,15x10 ³	2,02x10 ³	(-)	(-)
Prova do Princípio (RVA + IgY)	R9	(-)	(-)	1,98x10 ³	(-)	(-)
	Q5	(-)	(-)	2,68x10 ³	(-)	(-)
Imunoterapia Oral (IO)	AD15	(-)	(-)	1,56x10 ³	(-)	(-)
	AA3	(-)	1,41x10 ⁴	2,64x10 ³	(-)	(-)
	AE5	(-)	2,88x10 ³	3,94x10 ³	1,58x10 ³	(-)
	AE17	(-)	(-)	7,98x10 ³	(-)	2,14x10 ³
Imunoterapia Oral e Intravenosa (IOIV)	AD13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	X5	(-)	(-)	4,31x10 ³	(-)	(-)
	AE1	(-)	7,40x10 ²	(-)	(-)	(-)
	AE13	(-)	(-)	1,96x10 ³	(-)	(-)

dpi: dia(s) pós-inoculação; (-): não detectado.

Limite mínimo de detecção RT-qPCR é de 4,4x10² cópias de RNA/mg ou mL (Freeman *et al.*, 2008).

4.5. Aplicação da IgY em diagnóstico

A IgY anti-HAV ligou especificamente aos antígenos virais presentes nas células de revestimento sinusoidal (SLC) e de modo difuso nos hepatócitos nos parênquimas do fígado dos macacos infectados (Figura 4.7B e C). Ademais, nenhuma ligação inespecífica ou *background* foi visualizado quando a IgY anti-HAV foi utilizada. No teste de controle da especificidade da IgY, não houve ligação do anticorpo com o HAV nas biópsias de fígado infectadas. Marcação específica do antígeno-anticorpo não foi observada (Figura 4.7A). Em comparação à IgG anti-HAV comercial, a IgY anti-HAV produzida apresentou resultados mais claros e evidentes. A ligação dos antígenos virais foi fraca com a IgG (Figura 4.7D).

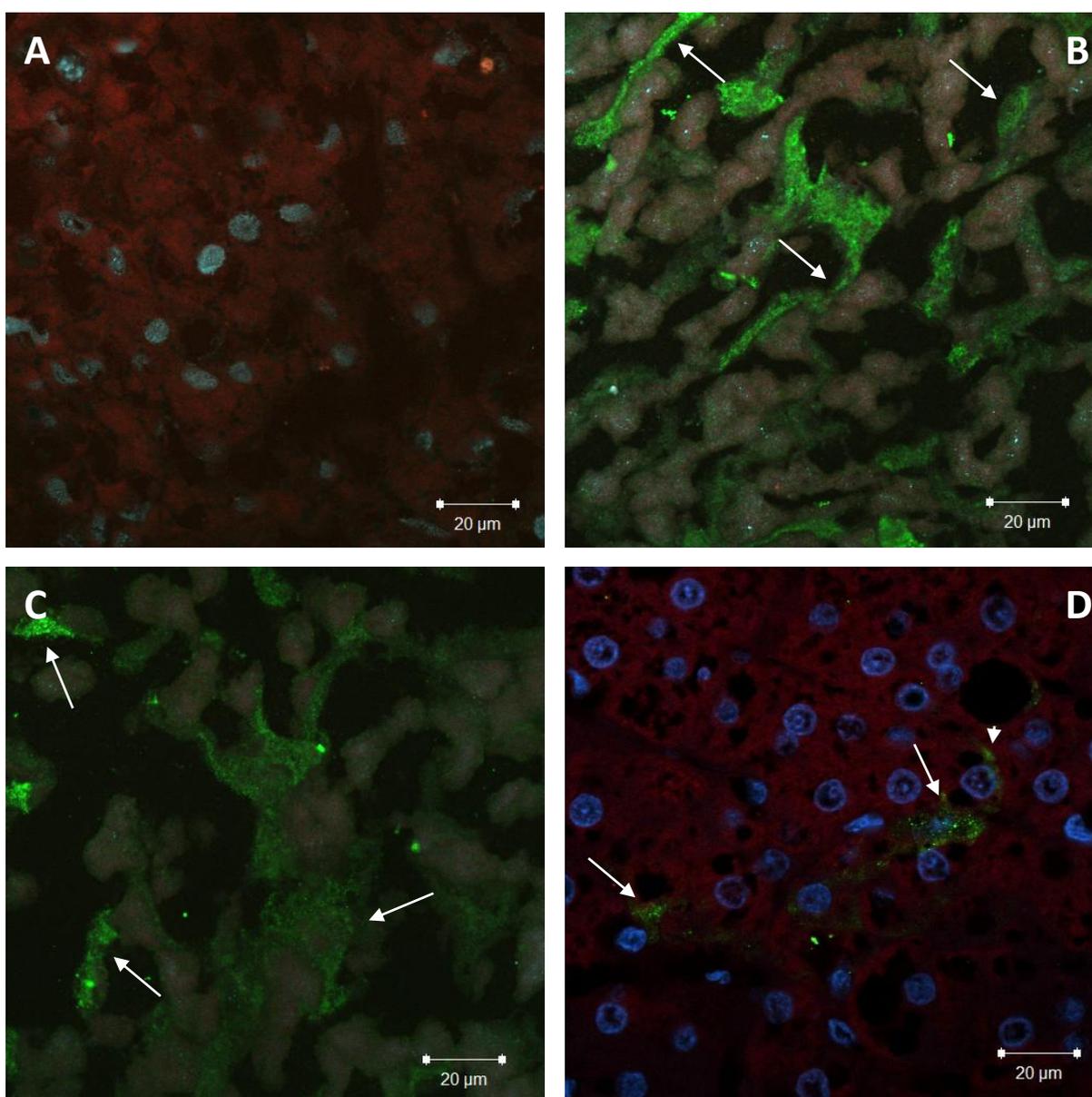


Figura 4.7 – Imunofluorescência indireta utilizando IgY para detecção do antígeno da hepatite A no fígado de macacos cynomolgus inoculados com HAV. [A] Ausência de células marcadas por fluorescência utilizando uma IgY não específica em fígado infectado com HAV (controle). [B] e [C] IgY anti-HAV como anticorpo primário ligando especificamente aos antígenos virais no citoplasma das células de revestimento sinusoidal (setas). [D] IgG anti-HAV comercial como anticorpo primário ligando especificamente aos antígenos virais nos hepatócitos (cabeça de seta) e no citoplasma das células de revestimento sinusoidal (setas).

Estes dados relativos ao diagnóstico do vírus da hepatite A em fígado congelado foram publicados na revista científica Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Anexo III).

5. DISCUSSÃO

A produção de anticorpos tem importante papel no diagnóstico e imunoterapia; e frequentemente essas funções exigem grandes quantidades de anticorpos. As imunoglobulinas utilizadas são principalmente anticorpos monoclonais e policlonais provenientes de camundongos e coelhos, respectivamente, que têm oferta limitada. Mais especificamente, no caso dos policlonais, podem causar possíveis riscos à saúde e reações cruzadas indesejáveis e alergias. A produção limitada da IgG pelo pequeno rendimento torna a produção do anticorpo muito dispendiosa. Neste trabalho consideramos os benefícios teóricos descritos na literatura relacionados à tecnologia da IgY para a produção de anticorpos policlonais e sua aplicação na pesquisa biomédica e na imunoterapia. Espera-se no futuro que a tecnologia da IgY desempenhe uma importância maior na pesquisa, diagnóstico e na imunoterapia (Tini *et al.*, 2002).

Para a inoculação das frangas (*Gallus gallus domesticus*) e produção da IgY anti-RVA, foi necessária a produção dos rotavírus símio (SA11) e humano (Wa). Esses vírus foram propagados em cultura de células, em grande quantidade, uma vez que todas as etapas do trabalho exigiam ser da mesma produção viral. Se para cada etapa, o vírus fosse propagado em momentos distintos, de certa forma, o rotavírus poderia apresentar diferenças de uma produção para a outra, mesmo que pequenas, fruto de mutações pontuais que ocorrem continuamente devido à alta taxa de erro durante a replicação (Desselberger, 2014). Com estas alterações, a IgY produzida poderia não ter especificidade para o rotavírus inoculado na imunoterapia. Assim, pode-se assegurar que não há risco do vírus que foi inoculado nos primatas não humanos ser diferente do vírus que foi utilizado para produzir a IgY nas aves.

O método de concentração pelo gradiente de cloreto de céσιο refinou bastante os dois vírus, deixando-os concentrados e puros. O RVA Wa com $2,2 \times 10^{10}$ cópias de RNA/mL ou $3,1 \times 10^9$ FFU/mL, e o RVA SA11 com $1,9962 \times 10^8$ cópias de RNA/mL. A ausência de restos celulares e proteínas provenientes da cultura de células foram decisivas para a etapa de inoculação do vírus nas aves. As proteínas conservadas de mamíferos exibem alta imunogenicidade nas aves (Gassmann *et al.*, 1990), portanto, estes antígenos interferentes gerariam uma resposta imunológica nas aves de alto impacto, por se tratar de células de mamíferos, com isso, as aves também produziriam IgY para outros antígenos que não os antígenos do rotavírus.

A produção de anticorpos anti-rotavírus nas aves representa uma alternativa eticamente correta para substituir os mamíferos, portanto, este modelo se enquadra ao

princípio dos 3R: reposição, redução e refinamento, do inglês *replacement, reduction and refinement* (Russell and Burch, 1959). Dentre as aves desta casuística, o início da postura dos ovos ocorreu aos 138 dias de vida, sem manifestações clínicas, mesmo na curva de crescimento normal das aves submetidas à imunização. Áreas de esteatose difusa e congestão no fígado foram observadas em todos os animais, incluindo os do grupo controle. Estes são considerados achados histológicos inespecíficos e podem estar relacionados à dieta comercial rica em gordura (Ayala *et al.*, 2009).

A primeira imunização ocorreu somente quando as aves atingiram 38 dias de vida para evitar a susceptibilidade das aves ao estresse e conseqüentemente, redução na postura de ovos (Lévesque *et al.*, 2007), além do sistema imune estar mais maduro para melhor produção de imunoglobulinas. A última imunização ocorreu aos 103 dias de idade das aves (35 dias antes do início da postura). As aves do Grupo I foram as primeiras a iniciar a postura seguida dos Grupos II e III que começaram na segunda semana. Tão logo começou a postura, a dosagem de proteínas totais do material extraído das gemas foi realizada pelo método de *Lowry*. Em todos os grupos imunizados, o pico máximo de concentração de proteínas totais aconteceu na 9ª semana (Grupos II e III) e 10ª semana (Grupo I) de postura dos ovos, e após redução da concentração, estabilizou-se até a 13ª semana. Esses dados assemelham-se aos descritos por Loeken e colaboradores (Loeken and Roth, 1983). Dentre os três grupos, o Grupo I foi o de maior quantidade de proteína produzida e maior média 37,35 mg/mL. Em segundo, o Grupo II e em terceiro o Grupo III. Este resultado não representa necessariamente que estas amostras com alta dosagem indiquem a concentração de IgY, pois não há como diferenciar qual a proteína quantificada pelo método empregado.

Portanto, a caracterização pela eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada com o intuito de confirmar que todas as amostras purificadas continham de fato a imunoglobulina Y. Na análise das proteínas na eletroforese pelo perfil de peso molecular (PM) das cadeias leve e pesada, pode-se inferir que a imunoglobulina presente no purificado da gema é a IgY. A cadeia leve da IgY tem peso molecular de 21 kDa e a cadeia pesada 70 kDa, enquanto, o PM das cadeias leve e pesada da IgG são 22 kDa e 50 kDa, respectivamente (Hatta *et al.*, 1993). Ainda pela eletroforese, observou-se a presença de outras proteínas, contudo, em quantidades bem inferiores. Ressalta-se que as amostras eram diluídas cem vezes e, mesmo assim, as bandas correspondentes as cadeias pesada e leve da IgY apresentaram-se mais espessas que as bandas das demais proteínas. Esses achados reforçam que a maior parte das proteínas quantificadas no método de *Lowry* era de fato a IgY. A presença de outras proteínas

além da IgY após purificação já havia sido descrita anteriormente (Klimentzou *et al.*, 2006; Nilsson, Hanrieder, *et al.*, 2008).

O grupo que recebeu as três imunizações com imunógeno (RVA) apresentou maior rendimento em título de anticorpo IgY. Os resultados mencionados são semelhantes aos descritos por Schade e colaboradores, no qual o título de anticorpos pode aumentar significativamente se as aves receberem reforço de imunização, conhecido como *booster* (Schade *et al.*, 2005). Este fato foi claramente exemplificado nas aves que receberam apenas duas doses do RVA: produziram anticorpos em títulos altos, embora menores daquelas que receberam uma terceira imunização, comprovando-se o efeito *booster*. Em um estudo anterior, foi observado um elevado rendimento na produção de IgY para o vírus da hepatite A (HAV) quando aves eram imunizadas obedecendo o mesmo esquema de imunização (de Paula *et al.*, 2011).

Nesta pesquisa, objetivou-se uma produção de altos títulos de anticorpos específicos para o RVA pela coadministração de adjuvante incompleto de Freund (IFA) com oligodesoxinucleotídeo sintético (CpG-ODN). A obtenção de altos níveis de anticorpos específicos com a utilização de adjuvantes foi descrito anteriormente por Lévesque *et al.* (Lévesque *et al.*, 2007). CpG-ODN são agonistas sintéticos de receptores *Toll-like 9* e potentes indutores da imunidade inata e adquirida (Vincent *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que o CpG-ODN pode funcionar como adjuvante eficaz para vacinas contra uma variedade de patógenos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas (Davis *et al.*, 1998; Moldoveanu *et al.*, 1998; Eastcott *et al.*, 2001; Mahmood *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009). O bem-estar dos animais é uma obrigação ética. A utilização de frangas domésticas em experimentos na substituição mamíferos representa o comprometimento com os princípios humanitários da experimentação animal (Russell and Burch, 1959). Além disso, a imunização de aves oferece vantagens: a imunização com CpG-ODN como adjuvante foi bem tolerada e a coleta dos ovos, em contraste a sangria de animais, é não invasiva (Gassmann *et al.*, 1990).

Notou-se ainda nesta tese que, a quantidade de IgY não é a única variável preponderante da produção. É necessário que parte desta IgY presente nas amostras tenha especificidade para o antígeno alvo: os rotavírus do grupo A humano e símio. Os métodos discutidos até então não tinham esta característica de avaliação da especificidade, pois as aves realizam normalmente deposição de IgY no óvulo para proteção caso seja fecundado. Em virtude disso, pela realização da dosagem de proteínas e a eletroforese constatou-se, que há IgY nestes purificados de gema, mas não necessariamente, esta IgY é específica para o rotavírus. Isto pode ser observado no Grupo III, que também teve altas concentrações de

proteínas e identificação da IgY no purificado, contudo, não recebeu qualquer tipo de imunógeno nas três imunizações. Portanto, o *western blotting* foi realizado para avaliar a especificidade da IgY purificada ao RVA em cada grupo. O vírus foi desnaturado, corrido em gel de poliacrilamida e posteriormente transferido para uma membrana de nitrocelulose. Nos Grupos I e II houve ligação da IgY purificada às proteínas dos vírus presentes na membrana, enquanto a IgY do Grupo III não se ligou, aparentemente não demonstrando especificidade aos vírus. Assim, pôde-se confirmar que a IgY presente no purificado da gema é específica para o rotavírus, pois as bandas foram reveladas no peso molecular das proteínas virais VP7, VP6 e VP4, que pesam respectivamente, 37,4 kDa, 44,8 kDa e 86,7 kDa (Estes and Kapikian, 2007).

A caracterização dos anticorpos específicos em conjunto com a neutralização em cultura de célula demonstra que as aves produziram anticorpos IgY anti-RVA e, a seguir, transportado para a gema dos ovos. Embora o título de anticorpos tenha variado de acordo com a formulação do inóculo utilizado em cada grupo, forneceu uma quantidade consistentemente alta de anticorpos, onde cada grupo foi responsável pela postura de aproximadamente 180 ovos durante 13 semanas. Considerando que a gema do ovo de galinha contém de 100 a 150 mg de anticorpos IgY, esta quantidade de ovos pode resultar em 24 a 36 g de IgY ao ano por galinha (Mine and Kovacs-Nolan, 2002; Pauly *et al.*, 2009). A fração de anticorpos IgY específicos representa de 2 a 10% da IgY total obtida (Schade *et al.*, 1994).

O rendimento da IgY específica aumentou ao longo do tempo, de modo que o título de anticorpos permaneceu elevado, mesmo após bastante tempo decorrido das imunizações, além da capacidade demonstrada pela IgY de neutralização, onde bloqueou a atividade funcional do RVA *in vitro*. A neutralização ocorreu até a concentração de 2,0 mg/mL da IgY. Mesmo nas concentrações mais baixas de IgY, de 1,5 à 0,5 mg/mL, houve uma menor infecção pelo rotavírus das células em relação ao controle positivo com diminuição de 10^2 cópias de RNA/ μ L, ou seja, dois logs. Na concentração de 1,5 mg/mL, a quantidade de RVA encontrada após a neutralização foi muito baixa (1,94 cópias RNA/ μ L), porém, deve-se considerar como uma diluição sem eficiência em neutralizar o rotavírus. Dai e colaboradores encontraram resultado semelhante com a IgY específica para rotavírus, onde obtiveram neutralização na concentração de 1,0 mg/mL (Dai *et al.*, 2013). Esses resultados demonstram que a IgY anti-RVA proveniente da gema do ovo pode ser útil em imunoterapia passiva, uma vez que as imunoglobulinas parecem ser eficazes para profilaxia pré-exposição e tratamento pós-exposição ao rotavírus (Dai *et al.*, 2013). Portanto, este ensaio de neutralização além da caracterização da especificidade, permitiu determinar a concentração mínima necessária para

administração durante a imunoterapia nos primatas não humanos. Como houve neutralização até 2,0 mg/mL, foi utilizada a quantidade absoluta de 2,5 mg da IgY anti-RVA como margem de segurança.

Contudo, antes de qualquer ensaio de imunoterapia para rotavírus em macacos utilizando a IgY, foi necessário o estabelecimento do modelo em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Macacos de várias faixas de idade, inclusive adultos jovens, apresentaram-se suscetíveis ao rotavírus humano, com uma infecção experimental. A limitação de fornecimento de macacos cynomolgus infantis pelo Serviço de Primatologia (SCPrim) do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), determinou a presente pesquisa a comprovar experimentalmente a infecção com rotavírus em macacos juvenis, adultos jovens e adultos.

A gastroenterite aguda (GA) induzida pelo rotavírus humano foi acompanhada pela eliminação viral nas fezes dos macacos AB7 (juvenil – 2 anos e 8 meses) e T7 (adulto – 8 anos e 9 meses). Os animais desafiados desenvolveram uma infecção subclínica, que de um modo geral, coincidem com outro estudo que demonstrou uma infecção efetiva em 4/6 macacos neonatos inoculados com RVA Wa, no qual somente um apresentou diarreia (Majer *et al.*, 1978). Leong e colaboradores demonstraram padrão dose dependente de infecção por RVA e GA exclusivamente em macacos cynomolgus neonatos (24 horas de vida) (Leong and Awang, 1990). Nos macacos juvenis ou adultos não houve confirmação da infecção (Majer *et al.*, 1978; Leong and Awang, 1990). Esta susceptibilidade de recém-nascidos ao RVA humano também foi descrita em macacos rhesus (*Macaca mulatta*), macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*) e babuínos (*Papio*) (Wyatt *et al.*, 1976; Chege *et al.*, 2005). Apesar do RVA não ser espécie-específico, na maioria dos isolados naturais obtidos de qualquer espécie, a virulência do protótipo humano de RVA tem sido associada à redução dos sinais clínicos em hospedeiros heterólogos (Nakagomi and Nakagomi, 1993; Iturriza-Gómara *et al.*, 2004). Mesmo os macacos rhesus neonatos infectados com RVA homólogo não apresentaram sinais de diarreia ou desidratação, permanecendo clinicamente normais, apesar de eliminarem grandes quantidades de RVA em suas fezes (McNeal *et al.*, 2005).

Nesta pesquisa, a detecção do RVA foi evidenciada nas fezes durante o período da experimentação, enquanto no grupo controle negativo, todas as amostras foram negativas. A primeira detecção do RNA viral em cada animal ocorreu no 1º, 2º ou 3º dia pós-infecção (dpi). Depois de um intervalo de um ou dois dias sem eliminação viral, uma segunda detecção foi observada, ocorrendo no 4º ou 6º dpi. Acredita-se que o primeiro período de excreção viral represente parte do inóculo sendo naturalmente eliminado (período de incubação após

inoculação oral do RVA), enquanto a segunda detecção seja um indicativo da replicação no intestino e o período de eliminação nas fezes. Comparativamente, depois do período de incubação, o macaco AB7 teve eliminação viral persistente, cinco dias, e o macaco U13 eliminou somente por um dia. Os aspectos mencionados foram semelhantes aos observados em voluntários com doença induzida por rotavírus, com início da gastroenterite de 2 a 6 dias após a ingestão do vírus, e com duração da diarreia de 1 a 4 dias (Anderson and Weber, 2004). A eliminação viral continua ocorrendo por até 10 dias após ingestão do vírus mesmo após o desaparecimento dos sinais clínicos (Pickering *et al.*, 1988).

Nos animais AB7, T7, X9 e AA7, a eliminação viral foi intermitente, ou seja, houve outro intervalo sem vírus nas fezes após a segunda detecção. Esta intermitência ocorre tanto em crianças sintomáticas quanto assintomáticas (Mukhopadhy *et al.*, 2013). Apesar da detecção do RNA do rotavírus nas fezes, a carga viral não foi elevada, com média aproximada de 10^3 cópias de RNA/mg. A maior quantificação atingida foi de 10^4 cópias de RNA/mg. Vollet *et al.* descreveram que adultos eliminam menos rotavírus nas fezes que crianças (Vollet *et al.*, 1979). Além disso, indivíduos assintomáticos infectados por rotavírus eliminam quantidades menores de vírus em relação a indivíduos que apresentam diarreia (Mukhopadhy *et al.*, 2013).

Apesar de a eliminação viral ter ocorrido por vários dias após a inoculação, a simples detecção do ácido nucléico do rotavírus nas fezes não comprova que eram partículas completas. Mesmo que pouco provável, estas detecções poderiam ser somente o RNA viral livre sendo liberado no intestino e conseqüentemente nas fezes. Portanto, a realização da infecção de células MA-104 com amostras fecais foi realizada e a posterior marcação da proteína viral VP6 pela imunofluorescência indireta evidenciou que houve eliminação de partículas de rotavírus viáveis nas fezes, ou seja, partículas completas e infecciosas. Os sete animais inoculados eliminaram partículas infecciosas nas fezes, provavelmente produto da replicação do rotavírus nos enterócitos. Vale ressaltar que os dias selecionados das amostras (5º, 6º e 7º dpi) foram escolhidos no segundo período de eliminação viral nas fezes, portanto, é pouco provável que este vírus eliminado seja do inóculo. Assim sendo, podemos admitir que ocorreu a replicação viral no intestino dos animais, daí a infecção, mesmo nos macacos que não desenvolveram nenhum episódio de diarreia.

A detecção do RNA no soro ocorreu em 5/7 cynomolgus inoculados, porém, não sendo detectado nos animais do grupo placebo. Esta detecção foi transitória, de um ou dois dias na maioria dos animais desafiados. Comparativamente, 50 a 90% das crianças com infecções pelo RVA também apresentaram antigenemia e presença do RNA viral no soro

(Blutt *et al.*, 2003; Blatt *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2013; Hemming *et al.*, 2014). Apesar da relevância clínica reduzida, a presença do RNA viral no sangue periférico representa a capacidade do vírus de transpor a barreira intestinal, confirmando a viremia do RVA humano nos macacos cynomolgus. Visto que a viremia pode contribuir para a disseminação do vírus no trato digestivo. Há descrições da presença do RNA viral no sistema nervoso central, fluído cérebro-raquídeo e coração de crianças infectadas com o rotavírus, além da presença de proteínas não estruturais detectadas no fígado e rim de crianças imunocomprometidas infectadas (Gilger *et al.*, 1992; Nishimura *et al.*, 1993; Ushijima *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 2001; Blatt *et al.*, 2003; Blatt *et al.*, 2007; Glass *et al.*, 2014). O RVA provavelmente ultrapassa o trato intestinal na criança e acessa a corrente sanguínea pelas células epiteliais especializadas que recobrem folículos linfóides das placas de Peyer (células M) (Blutt *et al.*, 2003). Embora o macaco T7 tenha apresentado expressiva gastroenterite aguda, este animal não desenvolveu viremia, indicando que antigenemia e viremia não são determinantes críticos para a ocorrência de diarreia (Ray *et al.*, 2006; Blatt *et al.*, 2007). Adicionalmente, ainda não se demonstrou de forma conclusiva em seres humanos que a identificação de RNA e antígenos do RVA no soro estejam associados à presença de vírus íntegros no sangue (Blutt *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2013).

O teste imunoenzimático (EIA) falhou na detecção dos antígenos de RVA no soro ou nas fezes dos animais inoculados, confirmando estudos prévios e inconclusivos sobre a detecção do RVA em primatas não humanos juvenis e adultos ao RVA humano (Majer *et al.*, 1978; Leong and Awang, 1990). Recentemente, métodos moleculares mais sensíveis têm facilitado o diagnóstico do RVA (Dung *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013). No presente estudo, os resultados foram confirmados com o RT-PCR e RT-qPCR (Gautam *et al.*, 2013). O ELISA comercial (RIDASCREEN[®] Rotavirus - R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha) utilizado tem um limite de detecção mínimo de 10^6 partículas virais (Wilde *et al.*, 1991) e segundo Yolken *et al.*, testes comerciais são confiáveis, práticos e econômicos, mas requerem no mínimo 10^4 a 10^7 partículas virais para gerar um resultado positivo (Yolken and Wilde, 1994). Portanto, o ELISA é altamente eficaz para amostras de fezes com grande quantidade de rotavírus, que normalmente são bem mais altas que o limite mínimo de detecção do método, mas não é apropriado para espécimes que a concentração de rotavírus é baixa (Ray *et al.*, 2006). Neste sentido, outros autores reportaram que macacos adultos assintomáticos podem eliminar RVA em quantidades tão baixas que são indetectáveis na maioria dos testes de rotina (Barnes *et al.*, 2003). Em uma mesma amostra, a detecção do RNA e a positividade pelo ELISA nem sempre são concordantes, acredita-se que fatores como fragmentação e a baixa concentração de antígenos dificultariam a identificação pelo ELISA ainda que fosse possível

detectar o genoma viral, ou parte deste, com o uso de técnicas de PCR (Blutt *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2010). Portanto, a carga viral reduzida que foi observada nos cynomolgus justifica a ausência de positividade do antígeno de RVA pelo ELISA neste modelo, como observado em outras infecções heterólogas com os vírus das hepatites A e E (Amado *et al.*, 2010; de Carvalho *et al.*, 2013).

Indicadores hematológicos e bioquímicos em primatas não humanos podem ser alterados por várias condições clínicas (MacKenzie *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2009; Lugo-Roman *et al.*, 2010). Na gastroenterite, os níveis de eletrólitos e contagem de células sanguíneas podem variar de acordo com a intensidade da diarreia, em consequência da passagem de água e eletrólitos para o lúmen intestinal e eliminação destes nas fezes. Por esta razão, o sangue foi coletado de todos os animais durante a experimentação para análise dos eletrólitos (potássio, cloro e sódio). A observação da queda progressiva dos níveis de concentração sérica de potássio (K^+) nos macacos T7, AB7 e AA7, do 1º dpi até o final da experimentação, foi coincidente com os episódios de diarreia relatados em dois desses animais durante a infecção experimental. As alterações observadas coincidem com as relatadas por outros autores (del Castillo *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1999). No entanto, nenhuma alteração foi observada nos níveis de sódio (Na^+) e cloro (Cl^-) dos macacos, como frequentemente ocorre em crianças com gastroenterite (Sack *et al.*, 1978; Molla *et al.*, 1981). A elevação na contagem de linfócitos foi outra alteração hematológica identificada no macaco AB7 do 7º ao 10º dpi; uma elevação de curta duração de células T também havia sido relatada em porcos gnotobióticos infectados com rotavírus humano (Ward *et al.*, 1996).

Analisando todos estes aspectos, estes resultados confirmam que macacos cynomolgus de várias idades desenvolveram uma infecção com vírus heterólogo, o RVA humano. De uma maneira geral, os animais apresentaram uma infecção subclínica com episódios esporádicos de gastroenterite, que induziram alterações eletrolíticas, com RNA viral detectável e detecção de partículas virais em pequenas quantidades nas fezes. Portanto, os macacos cynomolgus foram utilizados como modelo para avaliar a eficiência da terapia passiva pelo uso de IgY de infecções pelo RVA humano. Há muito tempo, as imunoglobulinas são utilizadas como forma profilática ou de terapia passiva contra o rotavírus em inúmeros modelos animais, inclusive em humanos. Em um estudo realizado em Melbourne na Austrália, IgG humana anti-RV modificou o curso da infecção e da doença causada por rotavírus em bebês recém nascidos, atrasando a excreção viral e com pequena redução na duração e na quantidade de rotavírus eliminado nas fezes (Barnes *et al.*, 1982). Rochi e colaboradores também descreveram a utilização da IgG intravenosa em dois bebês recém nascidos (Rochi *et al.*, 1981). Nestes

casos, o uso do colostro é aparentemente o melhor método de prevenção da doença, no entanto, em situações de alto risco, onde este não está disponível, a administração profilática da imunoglobulina pode ser uma alternativa viável (Barnes *et al.*, 1982).

Além da utilização em métodos de diagnóstico e pesquisa, a administração oral de IgY foi avaliada como uma possível ferramenta de imunoterapia para rotavírus em crianças (Sarker *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2013) e em alguns modelos animais, tais como, bezerros (Kuroki *et al.*, 1994; Özpınar *et al.*, 1996; Kuroki *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 2011), porcos gnotobióticos (Vega *et al.*, 2012; Vega *et al.*, 2013) e camundongos (Ebina, 1996; Sarker *et al.*, 2007). No entanto, em primatas não humanos esta imunoglobulina nunca havia sido testada para o rotavírus.

Na análise de eletrólitos, sódio e cloro tiveram diminuição nos níveis do Grupo Prova do Princípio (RVA + IgY) desde o 1º dpi até o final da infecção, contudo, a queda foi acentuada no 4º dpi para os dois eletrólitos. O potássio manteve-se estável por todo o período da infecção em todos os grupos, não houve alteração. Quando a análise foi individualizada por animal, o macaco Q5 foi o único que apresentou uma grande perda de eletrólitos ao longo da infecção experimental. Os níveis de sódio e cloro foram discrepantes em relação aos demais animais, com queda muito acentuada. Provavelmente a alteração não seja apenas em função da injúria pelo rotavírus. Ressalte-se que o macaco Q5 apresentou diarreia intensa com fezes líquidas durante todos os dias e não resistiu até o término da infecção.

Os animais aparentavam estar clinicamente sadios e sem sintomatologia de gastroenterite, exceto o macaco Q5. A contagem de linfócitos teve elevação em quase todos os macacos inoculados com rotavírus, exceto Q5 (grupo RVA + IgY) e AD15 (grupo IO). Porém, apenas apresentaram elevação acentuada os cynomolgus R9 (Grupo RVA + IgY) e AD13 (Grupo IOIV) por somente uma vez, ou seja, a elevação foi de curto prazo, como anteriormente descrito por Ward e colaboradores (Ward *et al.*, 1996). Infecções virais são frequentemente associadas com aumento na contagem de linfócitos, como foi observado para o rotavírus (Tabin and Nusslé, 1980).

Todos os grupos de animais inoculados com o rotavírus tiveram detecção do RNA viral em suas fezes, exceto o macaco AD13. Como foi observado no estabelecimento do cynomolgus como modelo de infecção experimental, nos primeiros dias de eliminação do vírus nas fezes, provavelmente o próprio inóculo sendo excretado nas fezes. Somente na segunda eliminação após o intervalo, que de fato era comprovadamente o vírus que havia replicado nos enterócitos. Esta segunda fase de eliminação viral não foi observada na imunoterapia porque a experimentação durou apenas cinco dias. Assim sendo, a detecção do

RNA do rotavírus nas fezes nos macacos que receberam RVA na imunoterapia, encontra consonância com o achado da primeira experimentação. Esta detecção pode parecer incoerente nos grupos tratados, principalmente no Grupo Prova do Princípio (RVA + IgY), pois foi administrado aos animais inóculo previamente neutralizado com IgY anti-RVA na concentração necessária para bloquear a infecção, e mesmo assim, houve detecção do RNA viral nas fezes. Contudo, isto não representa que houve de fato a infecção, e sim que foi detectado RNA viral nas fezes. O vírus pode ter passado pelo intestino sem infectar enterócitos por estar neutralizado pela IgY.

O grupo tratado com IgY pela via oral e intravenosa (IOIV) eliminou rotavírus durante menos tempo em comparação ao grupo tratado somente pela via oral (IO), sendo detectado nas fezes somente por um dia em 3 dos 4 macacos. Já no grupo IO os 4 macacos tiveram vírus nas fezes de dois a três dias. Portanto, tem-se a compreensão que a IgY sendo administrada diretamente no trato gastrointestinal é menos eficaz que a administração concomitante pelas vias oral e venosa. De alguma forma, a IgY no sangue pode impedir a disseminação do rotavírus, uma vez que foi detectada viremia na primeira experimentação com rotavírus em *cynomolgus*. Houve também constatação de diarreia em dois animais e alterações bioquímicas em três. Desta forma, ressalta-se que nesta segunda experimentação, utilizamos maior número de animais e mais jovens, era plausível a expectativa que houvesse casos de gastroenterite em alguns animais, fato que não ocorreu. Não há confirmação, mas isto pode ser devido ao imunotratamento.

Diferente da primeira infecção experimental, que visava o estabelecimento da infecção do rotavírus, portanto, a simples identificação do rotavírus nas fezes e no soro responderia a pergunta se houve ou não infecção, na imunoterapia dos macacos *cynomolgus*, o objetivo foi avaliar se a replicação viral no intestino dos animais tratados seria menor que nos animais não tratados. Por essa diferença, foi decidido que esta segunda experimentação teria o período de apenas cinco dias de duração, pois no estabelecimento do modelo, observou-se que o período de incubação do rotavírus foi aproximadamente até o 5º dpi. Após este dia, houve o início da eliminação viral produtiva nas fezes. Contudo, somente a detecção viral nas fezes e as análises bioquímica e hematológica seriam resultados muito simples para poder determinar se houve efetividade no imunotratamento com a IgY. A eficácia poderá ser mensurada pela detecção do rotavírus e talvez da IgY, por imunofluorescência indireta, nos fragmentos de intestino delgado que foram coletados durante a necropsia. Uma menor detecção viral no intestino dos animais tratados seria uma visão bem mais realista da replicação, além do poder de visualização do vírus internalizado no enterócito. Nesta detecção, serão utilizados

anticorpos anti-VP6 e anti-NSP4, uma proteína estrutural e uma proteína não estrutural, respectivamente, portanto, está última só está presente durante a replicação. Deste modo, se a NSP4 for visualizada na imunofluorescência, haverá a certeza de replicação viral, não só a internalização do rotavírus nos enterócitos.

A quantificação das citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5 e IL-6, e das células T CD4⁺ e CD8⁺ pela caracterização fenotípica por citometria de fluxo, também possibilitaria uma análise mais profunda de que tipo de resposta imune foi gerada pelo rotavírus e se houve algum tipo de resposta diferente entre os grupos dependendo do tratamento. Posto isso, a análise dos resultados da imunoterapia ainda não estão concluídos.

Alguns fatores limitantes do estudo precisam ser discutidos, e o primeiro deles é sobre o inóculo de rotavírus. Nas duas infecções experimentais com macacos cynomolgus, a replicação viral no intestino apresentou pequenas quantidades de vírus pela detecção fecal. Além do vírus utilizado ser heterólogo, fato que contribui para uma infecção atenuada (McNeal *et al.*, 2005), outro fator que pode ter contribuído para tal infecção reduzida, é do vírus que foi inoculado ser originado de cultura de células. Passagens seriadas de um vírus selvagem virulento, frequentemente quando propagado *in vitro*, resulta na perda da virulência quando inoculado em um animal hospedeiro natural. Inclusive, as vacinas virais atenuadas são produzidas por passagens seriadas em cultura de células (Tsugawa *et al.*, 2014). No presente estudo, o vírus semente que foi cedido pelo Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental/IOC era de uma produção anterior e foi novamente propagado em cultura de células MA-104 para obtenção de alta quantidade do rotavírus utilizado em todo o projeto.

O segundo fator limitante corresponde a resistência da IgY à passagem pelo trato gastrointestinal. A gema de ovo purificada possui algumas proteínas além da IgY (Nilsson *et al.*, 2007) e uma dessas proteínas, a ovomucóide da galinha, presente no purificado da gema do ovo, protege até certo ponto contra a degradação proteolítica da IgY pelas enzimas digestivas (Shah and Khan, 2004; Kovacs-Nolan *et al.*, 2005). Lee e colaboradores demonstraram que tanto a IgG quanto a IgY quando encapsuladas demonstraram menos atividade no estômago após administração em camundongos do que quando não encapsulados. No entanto, no intestino delgado 3 horas e 30 minutos depois da administração foi observada atividade do anticorpo significativamente maior nos grupos encapsulados (Lee *et al.*, 2012). Com isso, talvez seja necessária uma melhoria no processo de administração do anticorpo no modelo animal, de forma que a imunoglobulina seja protegida da ação das enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal.

E uma terceira questão a ser discutida é sobre a imunização passiva de animais com anticorpos de outras espécies. Gefen e colaboradores descreveram que esta imunização desencadeia a resposta imune no indivíduo (Gefen *et al.*, 2010). Nos macacos utilizados no presente estudo, este tipo de resposta à IgY não foi analisada, porém, é provável que tenha sido estimulado o sistema imunológico contra IgY administrada, principalmente nos animais tratados pela via intravenosa. Vega *et al.* descreveram que a IgY administrada oralmente em porcos induziu resposta por anticorpos IgG no soro e por anticorpos IgA e IgG na mucosa intestinal (Vega *et al.*, 2012). A produção de anticorpos IgG anti-IgY em um primeiro momento não geraria grandes complicações ao indivíduo tratado, porém, em uma segunda tentativa de tratamento, a imunoglobulina seria rapidamente depurada do organismo, deste modo, não permitindo tratamentos repetidos (Gefen *et al.*, 2010; Vega *et al.*, 2012). Uma abordagem interessante é o uso de capeadores da região Fc do anticorpo que têm o intuito de reduzir ou bloquear o reconhecimento imunológico do animal tratado. Alguns autores desenvolveram uma nova molécula capeadora produzida pela reação de duas moléculas endógenas, manosamina e biotina, para formar a manose-biotina aduta (MBA), do inglês *mannose-biotin adducts* (Vaya *et al.*, 2009). A MBA tem sido descrita como um agente de mascaramento para redução imunogênica e sua funcionalidade como um agente mascarador para imunização passiva com anticorpos de espécies diferentes já foi demonstrada com anticorpos IgG (Vaya *et al.*, 2009; Gefen *et al.*, 2010).

Para demonstrar a funcionalidade da IgY também no diagnóstico, um teste de imunofluorescência indireta para detecção do vírus da hepatite A em fígado foi procedido e a eficácia da IgY no diagnóstico foi comprovada. Quando comparada com uma IgG comercial, a IgY foi mais contundente na detecção viral, e cabe ressaltar que a quantidade de IgG utilizada foi o dobro da quantidade de IgY, 0,005 mg/mL e 0,0025mg/mL, respectivamente. Esta foi a primeira vez que o uso da IgY foi demonstrado no diagnóstico do HAV pela imunofluorescência indireta. Adicionalmente, em um estudo prévio, foi evidenciado o uso da IgY anti-HAV como anticorpo de captura em um ELISA *in house* (Silva *et al.*, 2012). Saniee e colaboradores também provaram a eficiência da IgY na imunofluorescência direta para busca de *H. pylori* (Saniee *et al.*, 2013). Outros autores descreveram uma imunofluorescência indireta marcando o fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) em células de macacos da linhagem COS-7 (Camenisch *et al.*, 1999). Portanto, nossos resultados reforçam a importância do uso da IgY como um método alternativo e específico para o diagnóstico da hepatite A em cortes histológicos de fígado congelado.

O desenvolvimento de novos métodos de produção de anticorpos que sejam de menor custo, de produção simples e boa qualidade é uma urgente necessidade da saúde pública, uma vez que as imunoglobulinas são indispensáveis na produção de testes diagnósticos, na utilização em pesquisa científica e em imunoterapia. A produção de imunoglobulina Y torna este objetivo menos dispendioso e mostra-se como uma alternativa eficaz e confiável. O macaco como modelo de infecção experimental para o rotavírus apresentou algumas limitações clínicas, no entanto, a replicação intestinal ocorreu, portanto, a IgY pôde ser testada neste modelo animal. O estudo como um todo teve suas limitações, principalmente nas infecções utilizando os macacos cynomolgus. As três limitações discutidas (vírus proveniente de cultura de células, resistência da IgY ao trato gastrintestinal e elicitação de resposta imune do hospedeiro à IgY) necessitam ser pensadas em futuros experimentos com tentativa de imunoterapia, independente do agente infeccioso a ser tratado. As respectivas soluções seriam: utilizar um vírus clarificado de fezes para inocular os animais, realizar o encapsulamento do anticorpo, e a utilização da molécula de MAB no capeamento da região Fc da imunoglobulina Y. Os resultados da imunoterapia ainda não são consistentes para confirmar a importância da IgY no imunotratamento, mas a menor detecção de vírus excretado nas fezes dos animais tratados talvez indique eficácia. Este trabalho contribui para disseminar a tecnologia da IgY para desempenhar um papel ainda maior na pesquisa, no diagnóstico e imunoterapia.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Os rotavírus humano e símio produzidos apresentaram alto rendimento após purificação e concentração, além de demonstrarem potencial infeccioso.
- ✓ A produção de IgY específica para o rotavírus do grupo A pela imunização de frangas poedeiras é um procedimento possível, relativamente simples e adaptado à produção em larga escala.
- ✓ A imunoglobulina Y anti-RVA específica mostrou-se capaz de bloquear a atividade funcional do vírus por meio de ensaio de neutralização *in vitro*.
- ✓ Macacos *cynomolgus* infantis, juvenis e adultos desenvolveram infecção subclínica, porém, produtiva, com um vírus heterólogo, o rotavírus grupo A humano. Representando assim um modelo eficiente para avaliação de novas estratégias de imunoterapia passiva pelo uso de imunoglobulinas.
- ✓ A avaliação da imunoterapia para o rotavírus pela utilização de IgY não está concluída, sua eficácia ainda não está comprovada, contudo, os resultados obtidos sugerem que a IgY pode ter potencial imunoterapêutico.
- ✓ A funcionalidade da imunoglobulina Y em diagnóstico foi comprovada. O seu uso na detecção do vírus da hepatite A em cortes histológicos de fígado congelado por imunofluorescência indireta foi eficaz.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(CDC), C. f. D. C. a. P. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 48, n. 27, p. 577-81, Jul 1999. ISSN 0149-2195. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428095> >.

(CDC), C. f. D. C. a. P. Foodborne outbreak of Group A rotavirus gastroenteritis among college students--District of Columbia, March-April 2000. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 49, n. 50, p. 1131-3, Dec 2000. ISSN 0149-2195. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11190116> >.

(CDC), C. f. D. C. a. P. Rotavirus surveillance--worldwide, 2001-2008. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 57, n. 46, p. 1255-7, Nov 2008. ISSN 1545-861X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19023263> >.

(WHO), W. H. O. **The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers**. 4th edition. 2005. 44.

Adams, W. R.; Kraft, L. M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. **Science**, v. 141, n. 3578, p. 359-60, Jul 1963. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14011026> >.

Ahmed, K. et al. Circulating rotaviral RNA in children with rotavirus antigenemia. **J Negat Results Biomed**, v. 12, p. 5, 2013. ISSN 1477-5751. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23369078> >.

Ahmed, M. U. et al. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. **J Med Virol**, v. 72, n. 1, p. 149-55, Jan 2004. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635024> >.

Aiyegbo, M. S. et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e61101, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671563> >.

Akerström, B. et al. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **J Immunol**, v. 135, n. 4, p. 2589-92, Oct 1985. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4031496> >.

Akita, E. M.; Nakai, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. **J Food Sci**, v. 57, n. 3, p. 629-34, 1992.

Akita, E. M.; Nakai, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **J**

Immunol Methods, v. 160, n. 2, p. 207-14, Apr 1993. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8459107> >.

Al-Natour, M. Q. et al. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. **Avian Dis**, v. 48, n. 1, p. 177-82, 2004 Jan-Mar 2004. ISSN 0005-2086. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077812> >.

Alam, M. M. et al. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. **Arch Virol**, v. 152, n. 1, p. 199-208, Jan 2007. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16900303> >.

Allen, S. J. et al. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 11, p. CD003048, 2010. ISSN 1469-493X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21069673> >.

Amado, L. A. et al. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. **Int J Exp Pathol**, v. 91, n. 1, p. 87-97, Feb 2010. ISSN 1365-2613. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096073> >.

Anderson, E. J.; Weber, S. G. Rotavirus infection in adults. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 2, p. 91-9, Feb 2004. ISSN 1473-3099. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871633> >.

Andrade, M. R. et al. Prevalence of antibodies to selected viruses in a long-term closed breeding colony of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in Brazil. **Am J Primatol**, v. 59, n. 3, p. 123-8, Mar 2003. ISSN 0275-2565. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12619046> >.

Angel, J.; Franco, M. A.; Greenberg, H. B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 7, p. 529-39, Jul 2007. ISSN 1740-1534. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571094> >.

Angel, J.; Franco, M. A.; Greenberg, H. B. Rotavirus immune responses and correlates of protection. **Curr Opin Virol**, v. 2, n. 4, p. 419-25, Aug 2012. ISSN 1879-6265. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677178> >.

Arias, C. F. et al. RNA silencing of rotavirus gene expression. **Virus Res**, v. 102, n. 1, p. 43-51, Jun 2004. ISSN 0168-1702. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068879> >.

Arikata, M. et al. Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys carrying Mafa-A1*052:02.

PLoS One, v. 7, n. 5, p. e37220, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623997> >.

Armah, G. E. et al. Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human rotavirus G9 as a major cause of diarrhea in children. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 6, p. 2317-22, Jun 2003. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791843> >.

Arnold, M.; Patton, J. T.; McDonald, S. M. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. **Curr Protoc Microbiol**, v. Chapter 15, p. Unit 15C.3, Nov 2009. ISSN 1934-8533. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885940> >.

Arnoldi, F. et al. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. **J Virol**, v. 81, n. 5, p. 2128-37, Mar 2007. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182692> >.

Ashley, C. R. et al. Rotavirus infections of apes. **Lancet**, v. 2, n. 8087, p. 477, Aug 1978. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/79844> >.

Assis, A. S. et al. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. **J Pediatr (Rio J)**, v. 89, n. 5, p. 470-6, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1678-4782. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23871499> >.

Ayala, I. et al. Hyperlipidemic chicken as a model of non-alcoholic steatohepatitis. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 234, n. 1, p. 10-6, Jan 2009. ISSN 1535-3702. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997102> >.

Azevedo, M. S. et al. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **J Virol**, v. 79, n. 9, p. 5428-36, May 2005. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827157> >.

Bagchi, P. et al. Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. **J Virol**, v. 84, n. 13, p. 6834-45, Jul 2010. ISSN 1098-5514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392855> >.

Ball, J. M. et al. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 101-4, Apr 1996. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600515> >.

Barnes, G. L. et al. Excretion of serotype G1 rotavirus strains by asymptomatic staff: a possible source of nosocomial infection. **J Pediatr**, v. 142, n. 6, p. 722-5, Jun 2003. ISSN 0022-3476. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838204> >.

Barnes, G. L. et al. A randomised trial of oral gammaglobulin in low-birth-weight infants infected with rotavirus. **Lancet**, v. 1, n. 8286, p. 1371-3, Jun 1982. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6177981> >.

Barnes, G. L.; Townley, R. R. Duodenal mucosal damage in 31 infants with gastroenteritis. **Arch Dis Child**, v. 48, n. 5, p. 343-9, May 1973. ISSN 1468-2044. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4574038> >.

Bernardi, G.; Cook, W. H. An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. **Biochim Biophys Acta**, v. 44, p. 86-96, 1960.

Bernstein, D. I. et al. Induction and persistence of local rotavirus antibodies in relation to serum antibodies. **J Med Virol**, v. 28, n. 2, p. 90-5, Jun 1989. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2544681> >.

Bigaud, M. et al. Sotrastaurin (AEB071) alone and in combination with cyclosporine A prolongs survival times of non-human primate recipients of life-supporting kidney allografts. **Transplantation**, v. 93, n. 2, p. 156-64, Jan 2012. ISSN 1534-6080. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22179400> >.

Bishop, R. F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7841, p. 1281-3, Dec 1973. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4127639> >.

Bishop, R. F. et al. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. **Lancet**, v. 1, n. 7849, p. 149-51, Feb 1974. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4129719> >.

Blancher, A. et al. Study of MHC class II region polymorphism in the Filipino cynomolgus macaque population. **Immunogenetics**, v. 66, n. 4, p. 219-30, Apr 2014. ISSN 1432-1211. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569954> >.

Blutt, S. E. et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? **Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1445-9, Nov 2003. ISSN 1474-547X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602437> >.

Blutt, S. E. et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. **PLoS Med**, v. 4, n. 4, p. e121, Apr 2007. ISSN 1549-1676. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439294> >.

Bolivar, R. et al. Rotavirus in travelers' diarrhea: study of an adult student population in Mexico. **J Infect Dis**, v. 137, n. 3, p. 324-7, Mar 1978. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/204710> >.

Bonjardim, C. A.; Ferreira, P. C.; Kroon, E. G. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. **Immunol Lett**, v. 122, n. 1, p. 1-11, Jan 2009. ISSN 1879-0542. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059436> >.

Boom, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar 1990. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691208> >.

Boscato, L. M.; Stuart, M. C. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. **Clin Chem**, v. 34, n. 1, p. 27-33, Jan 1988. ISSN 0009-9147. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3338181> >.

Boshuizen, J. A. et al. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. **J Virol**, v. 77, n. 24, p. 13005-16, Dec 2003. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645557> >.

Broquet, A. H. et al. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. **J Immunol**, v. 186, n. 3, p. 1618-26, Feb 2011. ISSN 1550-6606. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187438> >.

Burley, R. W.; Cook, W. H. Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituent alpha- and beta-lipoproteins. **Can J Biochem Physiol**, v. 39, p. 1295-307, Aug 1961. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13689112> >.

Burns, J. W. et al. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 104-7, Apr 1996. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600516> >.

Camenisch, G. et al. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1alpha. **FASEB J**, v. 13, n. 1, p. 81-8, Jan 1999. ISSN 0892-6638. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872932> >.

Campagna, M. et al. Impaired hyperphosphorylation of rotavirus NSP5 in cells depleted of casein kinase 1alpha is associated with the formation of viroplasm with altered morphology and a moderate decrease in virus replication. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 10, p. 2800-10, Oct 2007. ISSN 0022-1317. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17872534> >.

Campagna, M. et al. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 5, p. 1481-7, May 2005. ISSN 0022-1317. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831961> >.

Cario, E. et al. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. **J Immunol**, v. 164, n. 2, p. 966-72, Jan 2000. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623846> >.

Carlander, D. et al. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunol Res**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2000. ISSN 0257-277X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803878> >.

Carlin, J. B. et al. Intussusception risk and disease prevention associated with rotavirus vaccines in Australia's National Immunization Program. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 10, p. 1427-34, Nov 2013. ISSN 1537-6591. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23964090> >.

Carreño-Torres, J. J. et al. Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. **Virology**, v. 7, p. 350, 2010. ISSN 1743-422X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114853> >.

Castello, A. A. et al. Characterization of human group C rotavirus in Argentina. **J Med Virol**, v. 62, n. 2, p. 199-207, Oct 2000. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11002249> >.

Cervantes-Barragan, L. et al. Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 8, p. 3012-7, Feb 2012. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315415> >.

Chalghoumi, R. et al. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnol Agron Soc Environ**, v. 13, n. 2, p. 295-308, 2009.

Chalghoumi, R. et al. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in vitro. **Foodborne Pathog Dis**, v. 6, n. 5, p. 593-604, Jun 2009. ISSN 1556-7125. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388827> >.

Chalghoumi, R. et al. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. **Poult Sci**, v. 87, n. 1, p. 32-40, Jan 2008. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079447> >.

Chang, H. G. et al. Disease burden and risk factors for hospitalizations associated with rotavirus infection among children in New York State, 1989 through 2000. **Pediatr Infect Dis J**, v. 22, n. 9, p. 808-14, Sep 2003. ISSN 0891-3668. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506373> >.

Chang, H. M. et al. Microencapsulation protects immunoglobulin in yolk (IgY) specific against *Helicobacter pylori* urease. **J Food Sci**, v. 67, n. 1, p. 15-20, 2002.

Chang, H. M. et al. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 1, p. 61-6, Jan 1999. ISSN 0021-8561. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563850> >.

Chege, G. K. et al. Prevalence of rotavirus antibodies in a non-human primate colony. **Afr J Health Sci**, v. 2, n. 2, p. 296-299, May 1995. ISSN 1022-9272. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160439> >.

Chege, G. K. et al. Experimental infection of non-human primates with a human rotavirus isolate. **Vaccine**, v. 23, n. 12, p. 1522-8, Feb 2005. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670889> >.

Chemello, M. E. et al. Requirement for vacuolar H⁺ -ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. **J Virol**, v. 76, n. 24, p. 13083-7, Dec 2002. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438636> >.

Chen, Y. et al. Reference values of clinical chemistry and hematology parameters in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Xenotransplantation**, v. 16, n. 6, p. 496-501, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1399-3089. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042049> >.

Cheung, W. et al. Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. **J Virol**, v. 84, n. 13, p. 6782-98, Jul 2010. ISSN 1098-5514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335253> >.

Cho, Y. H. et al. Protective effect of microencapsulation consisting of multiple emulsification and heat gelation processes on immunoglobulin in yolk. **J Food Sci**, v. 70, n. 2, p. E148-E151, 2005.

Ciarlet, M. et al. Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. **J Virol**, v. 76, n. 1, p. 41-57, Jan 2002. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739670> >.

Ciarlet, M.; Estes, M. K. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. In: Bitton, G. (Ed.). **Encyclopedia of environmental microbiology**. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, 2002. p.2573-773.

Ciarlet, M. et al. Rotavirus disease, but not infection and development of intestinal histopathological lesions, is age restricted in rabbits. **Virology**, v. 251, n. 2, p. 343-60, Nov 1998. ISSN 0042-6822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9837799> >.

Clark, B.; McKendrick, M. A review of viral gastroenteritis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 461-9, Oct 2004. ISSN 0951-7375. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353966> >.

Conn, P. M. **Sourcebook of Models for Biomedical Research**. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2008.

Cooper, C. L. et al. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. **J Clin Immunol**, v. 24, n. 6, p. 693-701, Nov 2004. ISSN 0271-9142. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15622454> >.

Cortese, M. M.; Parashar, U. D.; (CDC), C. f. D. C. a. P. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep**, v. 58, n. RR-2, p. 1-25, Feb 2009. ISSN 1545-8601. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194371> >.

Corthésy, B. et al. Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. **J Virol**, v. 80, n. 21, p. 10692-9, Nov 2006. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16956954> >.

Crawley, J. M.; Bishop, R. F.; Barnes, G. L. Rotavirus gastroenteritis in infants aged 0-6 months in Melbourne, Australia: implications for vaccination. **J Paediatr Child Health**, v. 29, n. 3, p. 219-21, Jun 1993. ISSN 1034-4810. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390843> >.

Cunliffe, N. A. et al. Detection of group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. **Pediatr Infect Dis J**, v. 20, n. 11, p. 1088-90, Nov 2001. ISSN 0891-3668. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734719> >.

Dai, Y. C. et al. A dual chicken IgY against rotavirus and norovirus. **Antiviral Res**, v. 97, n. 3, p. 293-300, Mar 2013. ISSN 1872-9096. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267830> >.

Dalby-Payne, J. R.; Elliott, E. J. Gastroenteritis in children. **Clin Evid (Online)**, v. 2011, 2011. ISSN 1752-8526. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791124> >.

Dalpke, A. H. et al. Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. **Immunology**, v. 106, n. 1, p. 102-12, May 2002. ISSN 0019-2805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972638> >.

Das, S. et al. Genetic variability of human rotavirus strains isolated from Eastern and Northern India. **J Med Virol**, v. 72, n. 1, p. 156-61, Jan 2004. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635025> >.

Davidson, G. P.; Barnes, G. L. Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis. **Acta Paediatr Scand**, v. 68, n. 2, p. 181-6, Mar 1979. ISSN 0001-656X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/217231> >.

Davis, H. L. et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. **J Immunol**, v. 160, n. 2, p. 870-6, Jan 1998. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551923> >.

Dawber, T. R. et al. Eggs, serum cholesterol, and coronary heart disease. **Am J Clin Nutr**, v. 36, n. 4, p. 617-25, Oct 1982. ISSN 0002-9165. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7124663> >.

De Boissieu, D. et al. Rotavirus induces alpha-interferon release in children with gastroenteritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 16, n. 1, p. 29-32, Jan 1993. ISSN 0277-2116. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8433236> >.

de Carvalho, L. G. et al. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 495, 2013. ISSN 1471-2334. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24148233> >.

de Paula, V. S. et al. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. **J Virol Methods**, v. 171, n. 1, p. 102-6, Jan 2011. ISSN 1879-0984. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971134> >.

de Villiers, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, Jun 2004. ISSN 0042-6822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049> >.

del Castillo, J. R. et al. Rotavirus infection alters Na⁺ and K⁺ homeostasis in MA-104 cells. **J Gen Virol**, v. 72 (Pt 3), p. 541-7, Mar 1991. ISSN 0022-1317. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1848590> >.

Desselberger, U. Rotavirus infections: guidelines for treatment and prevention. **Drugs**, v. 58, n. 3, p. 447-52, Sep 1999. ISSN 0012-6667. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493272> >.

Desselberger, U. Rotaviruses. **Virus Res**, v. 190C, p. 75-96, Jul 2014. ISSN 1872-7492. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25016036> >.

Di Lonardo, A. D. et al. Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papillomavirus type 16. **Arch Virol**, v. 146, n. 1, p. 117-25, 2001. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11266205> >.

Dickey, M. et al. Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, n. 4, p. 318-21, Apr 2009. ISSN 0891-3668. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258926> >.

DiFiore, J. W. Intussusception. **Semin Pediatr Surg**, v. 8, n. 4, p. 214-20, Nov 1999. ISSN 1055-8586. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10573432> >.

do Carmo, G. M. et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Med**, v. 8, n. 4, p. e1001024, Apr 2011. ISSN 1549-1676. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21526228> >.

Doan, L. T. et al. Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. **J Med Virol**, v. 69, n. 4, p. 588-94, Apr 2003. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12601768> >.

Dung, T. T. et al. The validation and utility of a quantitative one-step multiplex RT real-time PCR targeting rotavirus A and norovirus. **J Virol Methods**, v. 187, n. 1, p. 138-43, Jan 2013. ISSN 1879-0984. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046990> >.

Dávalos-Pantoja, L. et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 11, n. 6, p. 657-73, 2000. ISSN 0920-5063. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10981680> >.

Eastcott, J. W. et al. Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 19, n. 13-14, p. 1636-42, Feb 2001. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166886> >.

Ebina, T. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. **Arch Virol Suppl**, v. 12, p. 217-23, 1996. ISSN 0939-1983. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015118> >.

Editorial: Rotaviruses of man and animals. **Lancet**, v. 1, n. 7901, p. 257-8, Feb 1975. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/46393> >.

Elias, M. M. Distribution and titres of rotavirus antibodies in different age groups. **J Hyg (Lond)**, v. 79, n. 3, p. 365-72, Dec 1977. ISSN 0022-1724. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/200676> >.

Erhard, M. H. et al. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. **Poult Sci**, v. 79, n. 9, p. 1264-70, Sep 2000. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020070> >.

Ermeling, B. L. et al. Evaluation of subcutaneous chambers as an alternative to conventional methods of antibody production in chickens. **Lab Anim Sci**, v. 42, n. 4, p. 402-7, Aug 1992. ISSN 0023-6764. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1434503> >.

Espejo, R. T.; López, S.; Arias, C. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. **J Virol**, v. 37, n. 1, p. 156-60, Jan 1981. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6260970> >.

Estes, M. K. Rotaviruses and their replication. In: Knipe, D. M.;Howley, P. M., *et al* (Ed.). **Fields Virology**. 4th edition. Philadelphia, PA, USA: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001. p.1747–85.

Estes, M. K.; Cohen, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol Rev**, v. 53, n. 4, p. 410-49, Dec 1989. ISSN 0146-0749. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2556635> >.

Estes, M. K.; Greenberg, H. B. Rotaviruses. In: Knipe, D. M.;Howley, P. M., *et al* (Ed.). **Fields Virology**. 6th edition. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins, 2013.

Estes, M. K.; Kapikian, A. Rotaviruses. In: Knipe, D. M.;Howley, P. M., *et al* (Ed.). **Fields Virology**. 5th edition. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins, 2007. p.1917–74.

Fabbretti, E. et al. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. **J Gen Virol**, v. 80 (Pt 2), p. 333-9, Feb 1999. ISSN 0022-1317. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073692> >.

Faber, H. K.; Silverberg, R. J. Pathway of invasion in a cynomolgus monkey after oral application of poliomyelitis virus. **Science**, v. 96, n. 2499, p. 473-5, Nov 1942. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17743466> >.

Faber, H. K.; Silverberg, R. J.; Dong, L. Poliomyelitis in the cynomolgus monkey : II. Resistance to spread of infection in the central nervous system following exposures of the mucous membranes to virus, with comments on non-paralytic poliomyelitis. **J Exp Med**, v. 78, n. 6, p. 519-26, Dec 1943. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19871346> >.

Fankhauser, R. L. et al. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J Infect Dis**, v. 178, n. 6, p. 1571-8, Dec 1998. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815206> >.

Faure, E. et al. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. **J Immunol**, v. 166, n. 3, p. 2018-24, Feb 2001. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160251> >.

Fedorowicz, Z.; Jagannath, V. A.; Carter, B. Antiemetics for reducing vomiting related to acute gastroenteritis in children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 9, p. CD005506, 2011. ISSN 1469-493X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901699> >.

Feng, N. et al. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. **J Clin Invest**, v. 109, n. 9, p. 1203-13, May 2002. ISSN 0021-9738. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994409> >.

Ferdous, F. et al. Severity of diarrhea and malnutrition among under five-year-old children in rural Bangladesh. **Am J Trop Med Hyg**, v. 89, n. 2, p. 223-8, Aug 2013. ISSN 1476-1645. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817334> >.

Fernandez, F. M. et al. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. **Vaccine**, v. 16, n. 5, p. 507-16, Mar 1998. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9491505> >.

Fischer, M. et al. [Comparison of standard methods for the preparation of egg yolk antibodies]. **Tierarztl Prax**, v. 24, n. 4, p. 411-8, Aug 1996. ISSN 0303-6286. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9012029> >.

Fischer, T. K. et al. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. **J Infect Dis**, v. 186, n. 5, p. 593-7, Sep 2002. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195345> >.

Flewett, T. H. et al. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 61-3, Jul 1974. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4137164> >.

Flores, J. et al. A dot hybridisation assay for detection of rotavirus. **Lancet**, v. 1, n. 8324, p. 555-8, Mar 1983. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6131257> >.

Franco, M. A.; Greenberg, H. B. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. **Virology**, v. 238, n. 2, p. 169-79, Nov 1997. ISSN 0042-6822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9400590> >.

Freeman, M. M. et al. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay. **J Med Virol**, v. 80, n. 8, p. 1489-96, Aug 2008. ISSN 1096-9071. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Enhancement+of+detection+and+quantification+of+rotavirus+in+stool+using+a+modified+real-time+RT-PCR+assay> >.

Fu, C. Y. et al. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. **J Virol Methods**, v. 133, n. 1, p. 112-5, Apr 2006. ISSN 0166-0934. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325277> >.

Fujita, Y. et al. Rotavirus antigenemia and genomia in children with rotavirus gastroenteritis. **Jpn J Infect Dis**, v. 63, n. 2, p. 83-6, Mar 2010. ISSN 1884-2836. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332567> >.

Gassmann, M. et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB J**, v. 4, n. 8, p. 2528-32, May 1990. ISSN 0892-6638. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1970792> >.

Gastañaduy, P. A. et al. Gastroenteritis hospitalizations in older children and adults in the United States before and after implementation of infant rotavirus vaccination. **JAMA**, v. 310, n. 8, p. 851-3, Aug 2013. ISSN 1538-3598. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23982372> >.

Gautam, R. et al. Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpec™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. **J Clin Virol**, v. 58, n. 1, p. 292-4, Sep 2013. ISSN 1873-5967. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850415> >.

Gee, S. C. et al. The purification of IgY from chicken egg yolk by preparative electrophoresis. **Protein Expr Purif**, v. 30, n. 2, p. 151-5, Aug 2003. ISSN 1046-5928. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880762> >.

Gefen, T. et al. Coated cross-species antibodies by mannosamine-biotin adduct confer protection against snake venom without eliciting humoral immune response. **Vaccine**, v. 28, n. 51, p. 8197-202, Nov 2010. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20875497> >.

Ghendon, Y. WHO recommendation on potential use of new poliomyelitis vaccines. **Dev Biol Stand**, v. 78, p. 133-7; discussion 138-9, 1993. ISSN 0301-5149. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388823> >.

Gilger, M. A. et al. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. **J Pediatr**, v. 120, n. 6, p. 912-7, Jun 1992. ISSN 0022-3476. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317419> >.

Girard, F. et al. Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 340-50, Apr 2006. ISSN 0928-8244. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16553806> >.

Gladstone, B. P. et al. Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. **N Engl J Med**, v. 365, n. 4, p. 337-46, Jul 2011. ISSN 1533-4406. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793745> >.

Glass, R. I. et al. Rotavirus vaccines: successes and challenges. **J Infect**, v. 68 Suppl 1, p. S9-18, Jan 2014. ISSN 1532-2742. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24156947> >.

Goldman, R. D.; Friedman, J. N.; Parkin, P. C. Validation of the clinical dehydration scale for children with acute gastroenteritis. **Pediatrics**, v. 122, n. 3, p. 545-9, Sep 2008. ISSN 1098-4275. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762524> >.

Gomes, T. A. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J Infect Dis**, v. 164, n. 2, p. 331-7, Aug 1991. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1856482> >.

González, R. A. et al. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. **Arch Virol**, v. 145, n. 9, p. 1963-73, 2000. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11043954> >.

Gorelick, M. H.; Shaw, K. N.; Murphy, K. O. Validity and reliability of clinical signs in the diagnosis of dehydration in children. **Pediatrics**, v. 99, n. 5, p. E6, May 1997. ISSN 1098-4275. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113963> >.

Gottstein, B.; Hemmeler, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. **Z Parasitenkd**, v. 71, n. 2, p. 273-6, 1985. ISSN 0044-3255. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4039510> >.

Graff, J. W.; Ettayebi, K.; Hardy, M. E. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 1, p. e1000280, Jan 2009. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180189> >.

Greenberg, H. B.; Estes, M. K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1939-51, May 2009. ISSN 1528-0012. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19457420> >.

Gregorio, G. V.; Dans, L. F.; Silvestre, M. A. Early versus Delayed Refeeding for Children with Acute Diarrhoea. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 7, p. CD007296, 2011. ISSN 1469-493X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21735409> >.

Grimwood, K. et al. Spread of rotavirus within families: a community based study. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 287, n. 6392, p. 575-7, Aug 1983. ISSN 0267-0623. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6309316> >.

Grimwood, K. et al. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 4, p. 732-8, Apr 1988. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2835391> >.

Guarino, A. et al. Oral immunoglobulins for treatment of acute rotaviral gastroenteritis. **Pediatrics**, v. 93, n. 1, p. 12-6, Jan 1994. ISSN 0031-4005. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8265305> >.

Guarino, A. et al. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 25, n. 5, p. 516-9, Nov 1997. ISSN 0277-2116. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360205> >.

Guerrero, C. A.; Moreno, L. P. Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin $\alpha\beta 3$ are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells. **Acta Virol**, v. 56, n. 1, p. 63-70, 2012. ISSN 0001-723X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404611> >.

Guo, Y. Q.; Li, D. D.; Duan, Z. J. [Research progress of real-time quantitative PCR method for group A rotavirus detection]. **Bing Du Xue Bao**, v. 29, n. 6, p. 651-4, Nov 2013. ISSN 1000-8721. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520772> >.

Gutiérrez Calzado, E.; García Garrido, R. M.; Schade, R. Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood group antigens. **Altern Lab Anim**, v. 29, n. 6, p. 717-26, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 0261-1929. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709045> >.

Haber, P. et al. Intussusception after rotavirus vaccines reported to US VAERS, 2006-2012. **Pediatrics**, v. 131, n. 6, p. 1042-9, Jun 2013. ISSN 1098-4275. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669521> >.

Hahn, S.; Kim, S.; Garner, P. Reduced osmolarity oral rehydration solution for treating dehydration caused by acute diarrhoea in children. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD002847, 2002. ISSN 1469-493X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869639> >.

Haikala, O. J. et al. Rapid detection of rotavirus in stool by latex agglutination: comparison with radioimmunoassay and electron microscopy and clinical evaluation of the test. **J Med Virol**, v. 11, n. 2, p. 91-7, 1983. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6302222> >.

Hamal, K. R. et al. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. **Poult Sci**, v. 85, n. 8, p. 1364-72, Aug 2006. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903465> >.

Hansen, P. et al. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. **J Immunol Methods**, v. 215, n. 1-2, p. 1-7, Jun 1998. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744742> >.

Hartling, L. et al. Oral versus intravenous rehydration for treating dehydration due to gastroenteritis in children. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD004390, 2006. ISSN 1469-493X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16856044> >.

Hasegawa, A. et al. Isolation of human rotaviruses in primary cultures of monkey kidney cells. **J Clin Microbiol**, v. 16, n. 2, p. 387-90, Aug 1982. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6288768> >.

Haselhorst, T. et al. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. **Nat Chem Biol**, v. 5, n. 2, p. 91-3, Feb 2009. ISSN 1552-4469. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109595> >.

Hatta, H. et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 57, n. 3, p. 450-4, Mar 1993. ISSN 0916-8451. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764050> >.

Hatta, H. et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, v. 31, n. 4, p. 268-74, 1997. ISSN 0008-6568. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197932> >.

Health, N. C. C. f. W. s. a. C. **Diarrhoea and vomiting caused by gastroenteritis: diagnosis, assessment and management in children younger than 5 years** 2009.

Hemmi, H.; Akira, S. TLR signalling and the function of dendritic cells. **Chem Immunol Allergy**, v. 86, p. 120-35, 2005. ISSN 1660-2242. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15976491> >.

Hemmi, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740-5, Dec 2000. ISSN 0028-0836. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130078> >.

Hemming, M. et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with more severe clinical manifestations of acute gastroenteritis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 33, n. 4, p. 366-71, Apr 2014. ISSN 1532-0987. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24136370> >.

Herring, A. J. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J Clin Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 473-7, Sep 1982. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6182158> >.

Holloway, G.; Coulson, B. S. Innate cellular responses to rotavirus infection. **J Gen Virol**, v. 94, n. Pt 6, p. 1151-60, Jun 2013. ISSN 1465-2099. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486667> >.

Holmes, I. H. et al. Letter: Orbiviruses and gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7881, p. 658-9, Sep 1974. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4137794> >.

Holmes, I. H. et al. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. **J Virol**, v. 16, n. 4, p. 937-43, Oct 1975. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1165598> >.

Horie, K. et al. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 12, p. 4073-9, Dec 2004. ISSN 0022-0302. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545368> >.

Horie, Y. et al. Diarrhea induction by rotavirus NSP4 in the homologous mouse model system. **Virology**, v. 262, n. 2, p. 398-407, Sep 1999. ISSN 0042-6822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502518> >.

Howe, H. A.; Bodian, D. Poliomyelitis in the cynomolgus monkey following oral inoculation. **Am J Hyg**, v. 48, n. 1, p. 99-106, Jul 1948. ISSN 0096-5294. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18872700> >.

Hrdy, D. B. Epidemiology of rotaviral infection in adults. **Rev Infect Dis**, v. 9, n. 3, p. 461-9, 1987 May-Jun 1987. ISSN 0162-0886. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3037675> >.

Hu, L. et al. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. **Curr Opin Virol**, v. 2, n. 4, p. 380-8, Aug 2012. ISSN 1879-6265. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789743> >.

Huang, L.; Fang, X. Immunoaffinity fractionation of plasma proteins by chicken IgY antibodies. **Methods Mol Biol**, v. 425, p. 41-51, 2008. ISSN 1064-3745. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369885> >.

Hädge, D.; Ambrosius, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins--IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. **Mol Immunol**, v. 21, n. 8, p. 699-707, Aug 1984. ISSN 0161-5890. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6611490> >.

Ichihara, M. Y. et al. Effectiveness of rotavirus vaccine against hospitalized rotavirus diarrhea: A case-control study. **Vaccine**, v. 32, n. 23, p. 2740-7, May 2014. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508336> >.

Iturriza Gómara, M. et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol**, v. 76, n. 13, p. 6596-601, Jul 2002. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050372> >.

Iturriza-Gómara, M. et al. Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 12, p. 4394-401, Dec 2000. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101570> >.

Iturriza-Gómara, M.; Kang, G.; Gray, J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. **J Clin Virol**, v. 31, n. 4, p. 259-65, Dec 2004. ISSN 1386-6532. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494266> >.

Jain, S.; Vashisth, J.; Changotra, H. Rotaviruses: is their surveillance needed? **Vaccine**, v. 32, n. 27, p. 3367-78, Jun 2014. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24793942> >.

Janeway, C. A. et al. **Immunologie**. 5th edition. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.

Jehangir, S. et al. Intussusception in southern India: Comparison of retrospective analysis and active surveillance. **Vaccine**, v. 32 Suppl 1, p. A99-A103, Aug 2014. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091689> >.

Jensenius, J. C. et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. **J Immunol Methods**, v. 46, n. 1, p. 63-8, 1981. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169771> >.

Jiang, B.; Gentsch, J. R.; Glass, R. I. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 10, p. 1351-61, May 2002. ISSN 1537-6591. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981731> >.

Jiang, B. et al. Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates. **J Med Primatol**, v. 33, n. 1, p. 30-3, Feb 2004. ISSN 0047-2565. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15061730> >.

Johne, R. et al. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. **Arch Virol**, v. 156, n. 9, p. 1627-34, Sep 2011. ISSN 1432-8798. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562881> >.

Jourdan, N. et al. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. **J Virol**, v. 71, n. 11, p. 8268-78, Nov 1997. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343179> >.

Kalica, A. R. et al. Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. **Virology**, v. 87, n. 2, p. 247-55, Jun 1978. ISSN 0042-6822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/208274> >.

Kang, G. et al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. **J Med Virol**, v. 73, n. 1, p. 118-22, May 2004. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15042658> >.

Kapikian, A. Z. Viral gastroenteritis. **JAMA**, v. 269, n. 5, p. 627-30, Feb 1993. ISSN 0098-7484. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380619> >.

Kapikian, A. Z.; Hoshino, Y.; Chanock, R. M. Rotaviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M., et al (Ed.). **Fields Virology**. 4th edition. Philadelphia, PA, USA: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001. p.1787–1833.

Kapikian, A. Z. et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **J Virol**, v. 10, n. 5, p. 1075-81, Nov 1972. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4117963> >.

Kapikian, A. Z. et al. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. **J Infect Dis**, v. 147, n. 1, p. 95-106, Jan 1983. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6296243> >.

Kapoor, P.; Compton, M. M.; Howarth, B. Immunization of chickens with quail and turkey perivitelline membrane proteins: production of antibodies and their effects on fertility. **Poult Sci**, v. 79, n. 2, p. 245-56, Feb 2000. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735754> >.

Kasule, M. et al. Detection and characterization of human rotavirus among children with diarrhoea in Botswana. **Trop Med Int Health**, v. 8, n. 12, p. 1137-42, Dec 2003. ISSN 1360-2276. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14641850> >.

Keswick, B. H. et al. Norwalk virus and rotavirus in travellers' diarrhoea in Mexico. **Lancet**, v. 1, n. 8263, p. 109-10, Jan 1982. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6119475> >.

Kim, H. W. et al. Human reovirus-like agent infection. Occurrence in adult contacts of pediatric patients with gastroenteritis. **JAMA**, v. 238, n. 5, p. 404-7, Aug 1977. ISSN 0098-7484. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/195102> >.

Kirkwood, C. et al. Genetic and antigenic characterization of rotavirus serotype G9 strains isolated in Australia between 1997 and 2001. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3649-54, Aug 2003. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12904370> >.

Kitaguchi, K. et al. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 121, n. 3-4, p. 290-9, Feb 2008. ISSN 0165-2427. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031828> >.

Klemperer, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. In: Naunyn, B. e Schmiedeberg, O. (Ed.). **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**. 31th edition. Vogel, Leipzig, Deutschland: Verlag von F.C.W., 1893. p.356-382.

Klimentzou, P. et al. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 183-93, Jan 2006. ISSN 0196-9781. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150512> >.

Klinman, D. M.; Barnhart, K. M.; Conover, J. CpG motifs as immune adjuvants. **Vaccine**, v. 17, n. 1, p. 19-25, Jan 1999. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10078603> >.

Kollberg, H. et al. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. **Pediatr Pulmonol**, v. 35, n. 6, p. 433-40, Jun 2003. ISSN 8755-6863. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12746939> >.

Kostouros, E. et al. Molecular characterization of rotavirus strains from children in Toronto, Canada. **J Clin Virol**, v. 28, n. 1, p. 77-84, Sep 2003. ISSN 1386-6532. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927754> >.

Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. **J Immunol Methods**, v. 296, n. 1-2, p. 199-209, Jan 2005. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15680164> >.

Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 3, p. 163-82, 2012. ISSN 1941-1413. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136128> >.

Kovacs-Nolan, J.; Phillips, M.; Mine, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 22, p. 8421-31, Nov 2005. ISSN 0021-8561. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16248532> >.

Kuroki, M. et al. Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves. **Arch Virol**, v. 142, n. 4, p. 843-51, 1997. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9170509> >.

Kuroki, M. et al. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. **Arch Virol**, v. 138, n. 1-2, p. 143-8, 1994. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7980004> >.

Lanata, C. F. et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e72788, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24023773> >.

Larsson, A. et al. Chicken antibodies: taking advantage of evolution--a review. **Poult Sci**, v. 72, n. 10, p. 1807-12, Oct 1993. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8415358> >.

Larsson, A.; Karlsson-Parra, A.; Sjöquist, J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clin Chem**, v. 37, n. 3, p. 411-4, Mar 1991. ISSN 0009-9147. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2004449> >.

Larsson, A.; Sjöquist, J. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 13, n. 4, p. 199-201, 1990. ISSN 0147-9571. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2076606> >.

Larsson, A. et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **J Immunol Methods**, v. 156, n. 1, p. 79-83, Nov 1992. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1431165> >.

Lawson, A. L. Acute gastroenteritis and dehydration (child). In: Li, S. T. e Ebell, M. H. (Ed.). **Essential Evidence**, 2012.

Lazzerini, M.; Ronfani, L. Oral zinc for treating diarrhoea in children. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 1, p. CD005436, 2013. ISSN 1469-493X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23440801> >.

Lee, J.; Kang, H. E.; Woo, H. J. Stability of orally administered immunoglobulin in the gastrointestinal tract. **J Immunol Methods**, v. 384, n. 1-2, p. 143-7, Oct 2012. ISSN 1872-7905. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22691618> >.

Lee, K. A. et al. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **J Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 5, p. 488-93, Sep 2002. ISSN 1225-8687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359091> >.

Leite, J. P. et al. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Arch Virol**, v. 141, n. 12, p. 2365-74, 1996. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9526543> >.

Leong, Y. K.; Awang, A. Experimental group A rotaviral infection in cynomolgus monkeys raised on formula diet. **Microbiol Immunol**, v. 34, n. 2, p. 153-62, 1990. ISSN 0385-5600. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2161071> >.

Leslie, G. A.; Clem, L. W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. **J Exp Med**, v. 130, n. 6, p. 1337-52, Dec 1969. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5352783> >.

Leslie, G. A.; Martin, L. N. Studies on the secretory immunologic system of fowl. 3. Serum and secretory IgA of the chicken. **J Immunol**, v. 110, n. 1, p. 1-9, Jan 1973. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4631071> >.

Lewis, K. D. et al. Comparison of two clinical severity scoring systems in two multi-center, developing country rotavirus vaccine trials in Africa and Asia. **Vaccine**, v. 30 Suppl 1, p. A159-66, Apr 2012. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22520126> >.

Li, X. et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. **Poult Sci**, v. 77, n. 2, p. 266-70, Feb 1998. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9495491> >.

Li, X. L.; Shuai, J. B.; Fang, W. H. Protection of *Carassius auratus* Gibelio against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 7, n. 11, p. 922-8, Nov 2006. ISSN 1673-1581. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048308> >.

Li, Z. et al. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. **J Virol**, v. 83, n. 4, p. 1754-66, Feb 2009. ISSN 1098-5514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19036817> >.

Linhares, A. C. et al. Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 77, n. 3, p. 384-90, 1983. ISSN 0035-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6623597> >.

Loeken, M. R.; Roth, T. F. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. **Immunology**, v. 49, n. 1, p. 21-8, May 1983. ISSN 0019-2805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6840806> >.

Lopez, S.; Arias, C. F. Early steps in rotavirus cell entry. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 309, p. 39-66, 2006. ISSN 0070-217X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909896> >.

Losonsky, G. A. et al. Oral administration of human serum immunoglobulin in immunodeficient patients with viral gastroenteritis. A pharmacokinetic and functional analysis. **J Clin Invest**, v. 76, n. 6, p. 2362-7, Dec 1985. ISSN 0021-9738. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4077983> >.

Lugo-Roman, L. A. et al. Effects of serial anesthesia using ketamine or ketamine/medetomidine on hematology and serum biochemistry values in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **J Med Primatol**, v. 39, n. 1, p. 41-9, Feb 2010. ISSN 1600-0684. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878432> >.

Lundgren, O. et al. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 491-5, Jan 2000. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642552> >.

Lundgren, O.; Svensson, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes Infect**, v. 3, n. 13, p. 1145-56, Nov 2001. ISSN 1286-4579. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709295> >.

Luo, Y. et al. Process for coproduction of crude immunoglobulin y and high-density lipoproteins from hen egg yolk. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 21, p. 11420-7, Nov 2010. ISSN 1520-5118. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20949918> >.

Lévesque, S.; Martinez, G.; Fairbrother, J. M. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. **Poult Sci**, v. 86, n. 4, p. 630-5, Apr 2007. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369532> >.

López, T. et al. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 6, p. 1609-17, Jun 2005. ISSN 0022-1317. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15914838> >.

Lösch, U. et al. The chicken egg, an antibody source. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 33, n. 8, p. 609-19, Oct 1986. ISSN 0514-7166. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3799099> >.

MacKenzie, M. et al. Hematologic abnormalities in simian acquired immune deficiency syndrome. **Lab Anim Sci**, v. 36, n. 1, p. 14-9, Feb 1986. ISSN 0023-6764. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3959529> >.

Madsen, L. B. et al. Estimating the costs of implementing the rotavirus vaccine in the national immunisation programme: the case of Malawi. **Trop Med Int Health**, v. 19, n. 2, p. 177-85, Feb 2014. ISSN 1365-3156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314006> >.

Mahmood, M. S. et al. Protection capability of recombinant plasmid DNA vaccine containing VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus in chickens adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide. **Vaccine**, v. 24, n. 22, p. 4838-46, May 2006. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600440> >.

Majer, M. et al. Diarrhea in newborn cynomolgus monkeys infected with human rotavirus. **Infection**, v. 6, n. 2, p. 71-2, 1978. ISSN 0300-8126. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/206515> >.

Malherbe, H.; Harwin, R. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. **S Afr Med J**, v. 37, p. 407-11, Apr 1963. ISSN 0256-9574. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13932505> >.

Mann, K.; Mann, M. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. **Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 178-91, Jan 2008. ISSN 1615-9853. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046696> >.

Marshall, J. et al. Rotavirus detection and characterisation in outbreaks of gastroenteritis in aged-care facilities. **J Clin Virol**, v. 28, n. 3, p. 331-40, Dec 2003. ISSN 1386-6532. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522072> >.

Marshall, T. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of serum after protein denaturation in the presence or absence of 2-mercaptoethanol. **Clin Chem**, v. 30, n. 3, p. 475-9, Mar 1984. ISSN 1530-8561. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6697503> >.

Matthijnsens, J. et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **J Virol**, v. 82, n. 7, p. 3204-19, Apr 2008. ISSN 1098-5514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216098> >.

Matthijnsens, J. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch Virol**, v. 156, n. 8, p. 1397-413, Aug 2011. ISSN 1432-8798. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21597953> >.

Matthijnssens, J. et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol**, v. 153, n. 8, p. 1621-9, 2008. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604469> >.

Matthijnssens, J. et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Arch Virol**, v. 157, n. 6, p. 1177-82, Jun 2012. ISSN 1432-8798. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430951> >.

Mattion, N. M. et al. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. **Virology**, v. 181, n. 1, p. 295-304, Mar 1991. ISSN 0042-6822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1847258> >.

Matzinger, P. An innate sense of danger. **Ann N Y Acad Sci**, v. 961, p. 341-2, Jun 2002. ISSN 0077-8923. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12081934> >.

McCully, K. A.; Mok, C. C.; Common, R. H. Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk. **Can J Biochem Physiol**, v. 40, n. 7, p. 937-52, 1962.

McNeal, M. M. et al. Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. **J Virol**, v. 79, n. 2, p. 944-54, Jan 2005. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613323> >.

Medzhitov, R.; Janeway, C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 295-8, Oct 1997. ISSN 0092-8674. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363937> >.

Menninger, K. et al. The origin of cynomolgus monkey affects the outcome of kidney allografts under Neoral immunosuppression. **Transplant Proc**, v. 34, n. 7, p. 2887-8, Nov 2002. ISSN 0041-1345. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431645> >.

Mine, Y.; Kovacs-Nolan, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. **J Med Food**, v. 5, n. 3, p. 159-69, 2002. ISSN 1096-620X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495588> >.

Mitchell, J. D. et al. Transmission of rotavirus gastroenteritis from children to a monkey. **Gut**, v. 18, n. 2, p. 156-60, Feb 1977. ISSN 0017-5749. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/192637> >.

Mohammed, S. M. et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology**, v. 4, n. 2, p. 115-25, Oct 1998. ISSN 1380-2933. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9853953> >.

Moldoveanu, Z. et al. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. **Vaccine**, v. 16, n. 11-12, p. 1216-24, Jul 1998. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9682382> >.

Molla, A. M. et al. Stool electrolyte content and purging rates in diarrhea caused by rotavirus, enterotoxigenic *E. coli*, and *V. cholerae* in children. **J Pediatr**, v. 98, n. 5, p. 835-8, May 1981. ISSN 0022-3476. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6262471> >.

Molyneaux, P. J. Human immunity to rotavirus. **J Med Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 397-404, Dec 1995. ISSN 0022-2615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7473672> >.

Montero, H. et al. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. **J Virol**, v. 82, n. 3, p. 1496-504, Feb 2008. ISSN 1098-5514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032499> >.

Mori, I. et al. Prolonged shedding of rotavirus in a geriatric inpatient. **J Med Virol**, v. 67, n. 4, p. 613-5, Aug 2002. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116013> >.

Morrison, C.; Gilson, T.; Nuovo, G. J. Histologic distribution of fatal rotaviral infection: an immunohistochemical and reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction analysis. **Hum Pathol**, v. 32, n. 2, p. 216-21, Feb 2001. ISSN 0046-8177. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230709> >.

Morrison, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Mol Immunol**, v. 38, n. 8, p. 619-25, Jan 2002. ISSN 0161-5890. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792430> >.

Mukhopadhyaya, I. et al. Rotavirus shedding in symptomatic and asymptomatic children using reverse transcription-quantitative PCR. **J Med Virol**, v. 85, n. 9, p. 1661-8, Sep 2013. ISSN 1096-9071. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775335> >.

Murata, T. et al. Anti-activin A antibody (IgY) specifically neutralizes various activin A activities. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 211, n. 1, p. 100-7, Jan 1996. ISSN 0037-9727. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8594613> >.

Murphy, T. V. et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. **N Engl J Med**, v. 344, n. 8, p. 564-72, Feb 2001. ISSN 0028-4793. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207352> >.

Musalem, C.; Espejo, R. T. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. **J Gen Virol**, v. 66 (Pt 12), p. 2715-24, Dec 1985. ISSN 0022-1317. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999314> >.

Nakagomi, O.; Nakagomi, T. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. **Microbiol Immunol**, v. 37, n. 5, p. 337-48, 1993. ISSN 0385-5600. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689137> >.

Nakagomi, T. Rotavirus infection and intussusception: a view from retrospect. **Microbiol Immunol**, v. 44, n. 8, p. 619-28, 2000. ISSN 0385-5600. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021391> >.

Nelson, E. A.; Glass, R. I. Rotavirus: realising the potential of a promising vaccine. **Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 568-70, Aug 2010. ISSN 1474-547X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20692032> >.

Nelson, E. A. et al. Guidelines for the management of acute diarrhoea in young children. **Hong Kong J Paediatr**, v. 8, p. 203-36, 2003.

Nilsson, E. et al. Proteomic characterization of IgY preparations purified with a water dilution method. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 24, p. 11638-42, Dec 2008. ISSN 1520-5118. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053374> >.

Nilsson, E. et al. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. **Pediatr Pulmonol**, v. 43, n. 9, p. 892-9, Sep 2008. ISSN 1099-0496. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680179> >.

Nilsson, L. et al. Competitive adsorption of water soluble plasma proteins from egg yolk at the oil/water interface. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 18, p. 6881-7, Sep 2006. ISSN 0021-8561. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16939353> >.

Nilsson, L. et al. Competitive adsorption of proteins from total hen egg yolk during emulsification. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 16, p. 6746-53, Aug 2007. ISSN 0021-8561. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17658749> >.

Nishimura, S. et al. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. **Brain Dev**, v. 15, n. 6, p. 457-9, 1993 Nov-Dec 1993. ISSN 0387-7604. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511877> >.

Nitiema, L. W. et al. Burden of rotavirus and other enteropathogens among children with diarrhea in Burkina Faso. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 9, p. e646-52, Sep 2011. ISSN 1878-3511. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763172> >.

Offit, P. A. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. **J Infect Dis**, v. 174 Suppl 1, p. S59-64, Sep 1996. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752292> >.

Offit, P. A. et al. Reassortant rotaviruses containing structural proteins vp3 and vp7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. **J Virol**, v. 60, n. 2, p. 491-6, Nov 1986. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3021983> >.

Olbrich, C. et al. Stable biocompatible adjuvants--a new type of adjuvant based on solid lipid nanoparticles: a study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. **Altern Lab Anim**, v. 30, n. 4, p. 443-58, 2002 Jul-Aug 2002. ISSN 0261-1929. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234249> >.

Otsyula, M. et al. Rotavirus infection in African, non-human primates. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 90, n. 6, p. 659-61, Dec 1996. ISSN 0003-4983. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039281> >.

Pando, V. et al. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. **Virology**, v. 295, n. 1, p. 190-200, Mar 2002. ISSN 0042-6822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12033777> >.

Parashar, U. D. et al. Rotavirus. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 4, p. 561-70, 1998 Oct-Dec 1998. ISSN 1080-6040. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9866732> >.

Parashar, U. D.; Nelson, E. A.; Kang, G. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. **BMJ**, v. 347, p. f7204, 2013. ISSN 1756-1833. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379214> >.

Patel, M. M. et al. Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure? **Lancet Infect Dis**, v. 12, n. 7, p. 561-70, Jul 2012. ISSN 1474-4457. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742639> >.

Patel, M. M. et al. Intussusception risk and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. **N Engl J Med**, v. 364, n. 24, p. 2283-92, Jun 2011. ISSN 1533-4406. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21675888> >.

Patel, M. M. et al. Global seasonality of rotavirus disease. **Pediatr Infect Dis J**, v. 32, n. 4, p. e134-47, Apr 2013. ISSN 1532-0987. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190782> >.

Patel, M. M. et al. Real-world impact of rotavirus vaccination. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, n. 1 Suppl, p. S1-5, Jan 2011. ISSN 1532-0987. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183833> >.

PATH. Rotavirus vaccine access and delivery. **75 countries have introduced rotavirus vaccines in their national immunization programs**, 2015. Available at: < <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/rotavirus-vaccines/> >. Accessed on: March 2015.

Patterson, R. et al. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. **J Immunol**, v. 89, p. 272-8, Aug 1962a. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14484407> >.

Patterson, R. et al. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. **J Gen Physiol**, v. 45, p. 501-13, Jan 1962b. ISSN 0022-1295. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14484408> >.

Patton, J. T. et al. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. **Adv Virus Res**, v. 69, p. 167-201, 2007. ISSN 0065-3527. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222694> >.

Pauly, D. et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poult Sci**, v. 88, n. 2, p. 281-90, Feb 2009. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151341> >.

Petrie, B. L. et al. Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. **Virus Res**, v. 1, n. 2, p. 133-52, 1984. ISSN 0168-1702. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6099654> >.

Pickering, L. K. et al. Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. **J Pediatr**, v. 112, n. 3, p. 361-5, Mar 1988. ISSN 0022-3476. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2831326> >.

Polson, A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. **Immunol Invest**, v. 19, n. 3, p. 253-8, Jun 1990. ISSN 0882-0139. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2365427> >.

Polson, A. et al. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. **Immunol Invest**, v. 14, n. 4, p. 323-7, Aug 1985. ISSN 0882-0139. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4065934> >.

Pott, J. et al. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 19, p. 7944-9, May 2011. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518880> >.

Pott, J. et al. Age-dependent TLR3 expression of the intestinal epithelium contributes to rotavirus susceptibility. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 5, p. e1002670, 2012. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570612> >.

Preidis, G. A. et al. Host response to probiotics determined by nutritional status of rotavirus-infected neonatal mice. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 55, n. 3, p. 299-307, Sep 2012. ISSN 1536-4801. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343914> >.

Pérez, J. F. et al. Characterization of a membrane calcium pathway induced by rotavirus infection in cultured cells. **J Virol**, v. 73, n. 3, p. 2481-90, Mar 1999. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9971833> >.

Qureshi, A. I. et al. Regular egg consumption does not increase the risk of stroke and cardiovascular diseases. **Med Sci Monit**, v. 13, n. 1, p. CR1-8, Jan 2007. ISSN 1234-1010. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179903> >.

Rahman, S. et al. Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients. **Vaccine**, v. 30, n. 31, p. 4661-9, Jun 2012. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575165> >.

Rahman, S. et al. Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. **Hum Vaccin Immunother**, v. 9, n. 5, p. 1039-48, May 2013. ISSN 2164-554X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23319156> >.

Rainsford, E. W.; McCrae, M. A. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. **Virus Res**, v. 130, n. 1-2, p. 193-201, Dec 2007. ISSN 0168-1702. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17658646> >.

Ramani, S.; Kang, G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. **Curr Opin Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 477-82, Oct 2009. ISSN 1473-6527. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633550> >.

Ramig, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **J Virol**, v. 78, n. 19, p. 10213-20, Oct 2004. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367586> >.

Rankin, R. et al. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. **Antisense Nucleic Acid Drug Dev**, v. 11, n. 5, p. 333-40, Oct 2001. ISSN 1087-2906. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11763350> >.

Rao, G. G. Control of outbreaks of viral diarrhoea in hospitals--a practical approach. **J Hosp Infect**, v. 30, n. 1, p. 1-6, May 1995. ISSN 0195-6701. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665879> >.

Ray, P. et al. Quantitative evaluation of rotaviral antigenemia in children with acute rotaviral diarrhea. **J Infect Dis**, v. 194, n. 5, p. 588-93, Sep 2006. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16897656> >.

Richardson, S. et al. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. **Lancet**, v. 351, n. 9119, p. 1844-8, Jun 1998. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652668> >.

Richardson, V. et al. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 299-305, Jan 2010. ISSN 1533-4406. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107215> >.

Rochi, G. U. et al. Outbreak of rotavirus gastroenteritis among premature infants. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 283, n. 6296, p. 886, Oct 1981. ISSN 0267-0623. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6269687> >.

Rollier, C. et al. Early life humoral response of ducks to DNA immunization against hepadnavirus large envelope protein. **Vaccine**, v. 18, n. 27, p. 3091-6, Jul 2000. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856788> >.

Rose, M. E.; Orlans, E. Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. **Dev Comp Immunol**, v. 5, n. 1, p. 15-20, 1981. ISSN 0145-305X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7009243> >.

Rose, M. E.; Orlans, E.; Buttress, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. **Eur J Immunol**, v. 4, n. 7, p. 521-3, Jul 1974. ISSN 0014-2980. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4213170> >.

Rosol, T. J. et al. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (1-36). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 35, n. 3-4, p. 321-37, Jan 1993. ISSN 0165-2427. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8430499> >.

Rossignol, J. F. et al. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 124-9, Jul 2006. ISSN 1474-547X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829296> >.

Ruiz, M. C. et al. Molecular biology of rotavirus entry and replication. **ScientificWorldJournal**, v. 9, p. 1476-97, 2009. ISSN 1537-744X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20024520> >.

Ruiz-Palacios, G. M. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N Engl J Med**, v. 354, n. 1, p. 11-22, Jan 2006. ISSN 1533-4406. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16394298> >.

Russell, W. M. S.; Burch, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London, UK: Methuen and Co. Ltd., 1959.

Ryan, M. J. et al. Outbreaks of infectious intestinal disease in residential institutions in England and Wales 1992-1994. **J Infect**, v. 34, n. 1, p. 49-54, Jan 1997. ISSN 0163-4453. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9120324> >.

Sack, D. A. et al. Oral hydration rotavirus diarrhoea: a double blind comparison of sucrose with glucose electrolyte solution. **Lancet**, v. 2, n. 8084, p. 280-3, Aug 1978. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/209263> >.

Sanekata, T. et al. Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 2187-90, May 2003. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734276> >.

Saniee, P. et al. Localization of H.pylori within the vacuole of Candida yeast by direct immunofluorescence technique. **Arch Iran Med**, v. 16, n. 12, p. 705-10, Dec 2013. ISSN 1735-3947. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24329143> >.

Sapparapu, G. et al. Intracellular neutralization of a virus using a cell-penetrating molecular transporter. **Nanomedicine (Lond)**, v. 9, n. 11, p. 1613-24, Aug 2014. ISSN 1748-6963. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195674> >.

Sarker, S. A. et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 32, n. 1, p. 19-25, Jan 2001. ISSN 0277-2116. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176319> >.

Sarker, S. A. et al. Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. **Gastroenterology**, v. 145, n. 4, p. 740-748.e8, Oct 2013. ISSN 1528-0012. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831050> >.

Sarker, S. A. et al. Successful treatment of rotavirus-induced diarrhoea in suckling mice with egg yolk immunoglobulin. **J Health Popul Nutr**, v. 25, n. 4, p. 465-8, Dec 2007. ISSN 1606-0997. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402190> >.

Saulsbury, F. T.; Winkelstein, J. A.; Yolken, R. H. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. **J Pediatr**, v. 97, n. 1, p. 61-5, Jul 1980. ISSN 0022-3476. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247473> >.

Schade, R. et al. [Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies]. **ALTEX**, v. 11, n. 2, p. 75-84, 1994. ISSN 1868-596X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11178370> >.

Schade, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Altern Lab Anim**, v. 33,

n. 2, p. 129-54, Apr 2005. ISSN 0261-1929. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16180988> >.

Schade, R.; Hlinak, A. Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects. **ALTEX**, v. 13, n. 5, p. 5-9, 1996. ISSN 1868-596X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11178463> >.

Sen, A. et al. Innate immune response to homologous rotavirus infection in the small intestinal villous epithelium at single-cell resolution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 50, p. 20667-72, Dec 2012. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23188796> >.

Seo, Y. J.; Hahm, B. Type I interferon modulates the battle of host immune system against viruses. **Adv Appl Microbiol**, v. 73, p. 83-101, 2010. ISSN 0065-2164. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800760> >.

Service, A. H. **Alberta Health Services acute childhood vomiting and diarrhea pathway 2011**.

Settembre, E. C. et al. Atomic model of an infectious rotavirus particle. **EMBO J**, v. 30, n. 2, p. 408-16, Jan 2011. ISSN 1460-2075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157433> >.

Shah, R. B.; Khan, M. A. Protection of salmon calcitonin breakdown with serine proteases by various ovomucoid species for oral drug delivery. **J Pharm Sci**, v. 93, n. 2, p. 392-406, Feb 2004. ISSN 0022-3549. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14705196> >.

Sharma, R. et al. Clinical manifestations of rotavirus infection in the neonatal intensive care unit. **Pediatr Infect Dis J**, v. 21, n. 12, p. 1099-105, Dec 2002. ISSN 0891-3668. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488657> >.

Shimizu, M.; Fitzsimmons, R. C.; Nakai, S. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **J Food Sci**, v. 53, n. 5, p. 1360-8, 1988.

Shimizu, M.; Nagashima, H.; Hashimoto, K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. **Comp Biochem Physiol B**, v. 106, n. 2, p. 255-61, Oct 1993. ISSN 0305-0491. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243054> >.

Shimizu, M. et al. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. **J Food Sci**, v. 59, n. 4, p. 763-72, 1994.

Shimizu, M. et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 56, n. 2, p. 270-4, Feb 1992. ISSN 0916-8451. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1368302> >.

Shin, J. H. et al. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 3, p. 217-22, Mar 2003. ISSN 0022-2615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12621086> >.

Shin, J. H. et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 5, p. 1061-6, Sep 2002. ISSN 1071-412X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204960> >.

Shornikova, A. V. et al. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 16, n. 12, p. 1103-7, Dec 1997. ISSN 0891-3668. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427453> >.

Silva, A. o. S. et al. An immunoenzymatic assay for the diagnosis of hepatitis A utilising immunoglobulin Y. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 960-3, Nov 2012. ISSN 1678-8060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23147158> >.

Silvestri, L. S.; Taraporewala, Z. F.; Patton, J. T. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. **J Virol**, v. 78, n. 14, p. 7763-74, Jul 2004. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220450> >.

Sim, J. S.; Sunwoo, H. H.; Lee, E. N. Ovoglobulin Y. In: Naidu, A. S. (Ed.). **Natural food antimicrobial systems**. New York, NY, USA: CRC Press, 2000. p.227-252.

Snodgrass, D. R.; Wells, P. W. The immunoprophylaxis of of rotavirus infections in lambs. **Vet Rec**, v. 102, n. 7, p. 146-8, Feb 1978. ISSN 0042-4900. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/205988> >.

Song, W. O.; Kerver, J. M. Nutritional contribution of eggs to American diets. **J Am Coll Nutr**, v. 19, n. 5 Suppl, p. 556S-562S, Oct 2000. ISSN 0731-5724. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023007> >.

Steffen, R. et al. Epidemiology, etiology, and impact of traveler's diarrhea in Jamaica. **JAMA**, v. 281, n. 9, p. 811-7, Mar 1999. ISSN 0098-7484. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10071002> >.

Stewien, K. E. et al. Viral, bacterial and parasitic pathogens associated with severe diarrhoea in the city of São Paulo, Brazil. **J Diarrhoeal Dis Res**, v. 11, n. 3, p. 148-52, Sep 1993. ISSN 0253-8768. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8263302> >.

Stockwin, L. H.; Holmes, S. Antibodies as therapeutic agents: vive la renaissance! **Expert Opin Biol Ther**, v. 3, n. 7, p. 1133-52, Oct 2003a. ISSN 1471-2598. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519077> >.

Stockwin, L. H.; Holmes, S. The role of therapeutic antibodies in drug discovery. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. 2, p. 433-6, Apr 2003b. ISSN 0300-5127. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12653655> >.

Stuart, C. A. et al. High affinity antibody from hen's eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF-I receptor. **Anal Biochem**, v. 173, n. 1, p. 142-50, Aug 1988. ISSN 0003-2697. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2973262> >.

Sugita-Konishi, Y. et al. Blockade of Salmonella enteritidis passage across the basolateral barriers of human intestinal epithelial cells by specific antibody. **Microbiol Immunol**, v. 44, n. 6, p. 473-9, 2000. ISSN 0385-5600. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10941930> >.

Sun, S. et al. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 15, n. 9, p. 708-12, 2001. ISSN 0951-4198. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319793> >.

Sunwoo, H. H. et al. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. **Poult Sci**, v. 75, n. 3, p. 342-5, Mar 1996. ISSN 0032-5791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8778727> >.

Suzuki, H. et al. Effect of dietary anti-Helicobacter pylori-urease immunoglobulin Y on Helicobacter pylori infection. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 20 Suppl 1, p. 185-92, Jul 2004. ISSN 0269-2813. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298626> >.

Svendsen Bollen, L. et al. 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. **J Immunol Methods**, v. 191, n. 2, p. 113-20, May 1996. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666830> >.

Svendsen, L. et al. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Lab Anim Sci**, v. 45, n. 1, p. 89-93, Feb 1995. ISSN 0023-6764. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7752622> >.

Sánchez-Fauquier, A. et al. First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. **Arch Virol**, v. 148, n. 2, p. 399-404, Feb 2003. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557002> >.

Tabin, R.; Nusslé, D. [Rotavirus enteritis in children]. **Helv Paediatr Acta Suppl**, n. 44 Suppl, p. 1-28, May 1980. ISSN 0073-1811. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6257626> >.

Takeuchi, O.; Akira, S. MDA5/RIG-I and virus recognition. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 1, p. 17-22, Feb 2008. ISSN 0952-7915. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272355> >.

Tate, J. E. et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 12, n. 2, p. 136-41, Feb 2012. ISSN 1474-4457. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22030330> >.

Teixeira, J. M. et al. [Epidemiology of rotavirus infections in the Federal District, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 24, n. 4, p. 223-30, 1991 Oct-Dec 1991. ISSN 0037-8682. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1668975> >.

Temu, A. et al. Prevalence and factors associated with Group A rotavirus infection among children with acute diarrhea in Mwanza, Tanzania. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 6, p. 508-15, Jun 2012. ISSN 1972-2680. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22706194> >.

Tesar, D. B.; Cheung, E. J.; Bjorkman, P. J. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 4, p. 1587-93, Apr 2008. ISSN 1939-4586. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256279> >.

Than, V. T.; Kim, W. Prevalence of rotavirus genotypes in South Korea in 1989-2009: implications for a nationwide rotavirus vaccine program. **Korean J Pediatr**, v. 56, n. 11, p. 465-73, Nov 2013. ISSN 1738-1061. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24348658> >.

Thomas, E. E. et al. Evaluation of seven immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool samples. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 6, p. 1189-93, Jun 1988. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2838516> >.

Tini, M. et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 131, n. 3, p. 569-74, Mar 2002. ISSN 1095-6433. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867282> >.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439> >.

Trask, S. D.; McDonald, S. M.; Patton, J. T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 3, p. 165-77, Mar 2012. ISSN 1740-1534. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266782> >.

Tressler, R. L.; Roth, T. F. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. **J Biol Chem**, v. 262, n. 32, p. 15406-12, Nov 1987. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2960667> >.

Tsugawa, T.; Tatsumi, M.; Tsutsumi, H. Virulence-associated genome mutations of murine rotavirus identified by alternating serial passages in mice and cell cultures. **J Virol**, v. 88, n. 10, p. 5543-58, May 2014. ISSN 1098-5514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599996> >.

Ushijima, H. et al. Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 12, p. 2893-7, Dec 1994. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7883874> >.

van den Berg, J.; Berger, M. Y. Guidelines on acute gastroenteritis in children: a critical appraisal of their quality and applicability in primary care. **BMC Fam Pract**, v. 12, p. 134, 2011. ISSN 1471-2296. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136388> >.

van Steenis, G. et al. Use of captive-bred monkeys for vaccine production. **Dev Biol Stand**, v. 45, p. 99-105, 1980. ISSN 0301-5149. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6772513> >.

Vaya, J. et al. Mannosamine-biotin as a novel masking agent for coating IgG for immune response silencing and augmentation of antibody-antigen interaction. **Vaccine**, v. 27, n. 49, p. 6869-76, Nov 2009. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19765399> >.

Vega, C. et al. Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 142, n. 3-4, p. 156-69, Aug 2011. ISSN 1873-2534. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21652087> >.

Vega, C. G. et al. IgY antibodies protect against human Rotavirus induced diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42788, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880110> >.

Vega, C. G. et al. Recombinant monovalent llama-derived antibody fragments (VHH) to rotavirus VP6 protect neonatal gnotobiotic piglets against human rotavirus-induced diarrhea. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 5, p. e1003334, 2013. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658521> >.

Velázquez, F. R. et al. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. **N Engl J Med**, v. 335, n. 14, p. 1022-8, Oct 1996. ISSN 0028-4793. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8793926> >.

Verdoliva, A.; Basile, G.; Fassina, G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 749, n. 2, p. 233-42, Dec 2000. ISSN 1387-2273. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145060> >.

Vesikari, T. et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **N Engl J Med**, v. 354, n. 1, p. 23-33, Jan 2006. ISSN 1533-4406. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16394299> >.

Villena, C. et al. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. **Epidemiol Infect**, v. 131, n. 3, p. 1105-10, Dec 2003. ISSN 0950-2688. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14959777> >.

Vincent, I. E. et al. Inhibitory effect of the combination of CpG-induced cytokines with lamivudine against hepatitis B virus replication in vitro. **Antivir Ther**, v. 14, n. 1, p. 131-5, 2009. ISSN 1359-6535. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320247> >.

Visintin, A. et al. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. **J Immunol**, v. 166, n. 1, p. 249-55, Jan 2001. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123299> >.

Vollet, J. J.; DuPont, H. L.; Pickering, L. K. Nonenteric sources of rotavirus in acute diarrhea. **J Infect Dis**, v. 144, n. 5, p. 495, Nov 1981. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6273477> >.

Vollet, J. J. et al. Human rotavirus in an adult population with travelers' diarrhea and its relationship to the location of food consumption. **J Med Virol**, v. 4, n. 2, p. 81-7, 1979. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/226656> >.

von Bonsdorff, C. H. et al. Rotavirus infections in adults in association with acute gastroenteritis. **J Med Virol**, v. 2, n. 1, p. 21-8, 1978. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/210251> >.

Wakuda, M. et al. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 8, p. 1491-3, Aug 2011. ISSN 1080-6059. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801631> >.

Walker, C. L. et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1405-16, Apr 2013. ISSN 1474-547X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23582727> >.

Walsh, G. P. et al. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. **Nat Med**, v. 2, n. 4, p. 430-6, Apr 1996. ISSN 1078-8956. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8597953> >.

Wanke, R. et al. [Freund's complete adjuvant in the chicken: efficient immunostimulation with severe local inflammatory reaction]. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 43, n. 4, p. 243-53, Jun 1996. ISSN 0514-7158. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8767734> >.

Ward, L. A. et al. Development of mucosal and systemic lymphoproliferative responses and protective immunity to human group A rotaviruses in a gnotobiotic pig model. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 3, p. 342-50, May 1996. ISSN 1071-412X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8705681> >.

Ward, R. L. et al. Protection of adults rechallenged with a human rotavirus. **J Infect Dis**, v. 161, n. 3, p. 440-5, Mar 1990. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155972> >.

Ward, R. L. et al. Effects of antibody to rotavirus on protection of adults challenged with a human rotavirus. **J Infect Dis**, v. 159, n. 1, p. 79-88, Jan 1989. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2535868> >.

Ward, R. L. et al. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. **J Infect Dis**, v. 154, n. 5, p. 871-80, Nov 1986. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3021869> >.

Warr, G. W.; Magor, K. E.; Higgins, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunol Today**, v. 16, n. 8, p. 392-8, Aug 1995. ISSN 0167-5699. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546196> >.

Wen, K. et al. Development of $\gamma\delta$ T cell subset responses in gnotobiotic pigs infected with human rotaviruses and colonized with probiotic lactobacilli. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 141, n. 3-4, p. 267-75, Jun 2011. ISSN 1873-2534. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21489639> >.

Wenman, W. M. et al. Rotavirus infection in adults. Results of a prospective family study. **N Engl J Med**, v. 301, n. 6, p. 303-6, Aug 1979. ISSN 0028-4793. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/221816> >.

West, A. P.; Herr, A. B.; Bjorkman, P. J. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. **Immunity**, v. 20, n. 5, p. 601-10, May 2004. ISSN 1074-7613. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142528> >.

Wieczorek, G. et al. Acute and chronic vascular rejection in nonhuman primate kidney transplantation. **Am J Transplant**, v. 6, n. 6, p. 1285-96, Jun 2006. ISSN 1600-6135. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16686753> >.

Wilde, J. et al. Improved detection of rotavirus shedding by polymerase chain reaction. **Lancet**, v. 337, n. 8737, p. 323-6, Feb 1991. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1703618> >.

Willer, D. O. et al. Multi-low-dose mucosal simian immunodeficiency virus SIVmac239 challenge of cynomolgus macaques immunized with "hyperattenuated" SIV constructs. **J Virol**, v. 84, n. 5, p. 2304-17, Mar 2010. ISSN 1098-5514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032177> >.

Woolley, J. A.; Landon, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. **J Immunol Methods**, v. 178, n. 2, p. 253-65, Jan 1995. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836787> >.

Wu, F. et al. The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine. **Vaccine**, v. 27, n. 32, p. 4320-4, Jul 2009. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410621> >.

Wyatt, R. G. et al. Induction of diarrhea in colostrum-deprived newborn rhesus monkeys with the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. **Arch Virol**, v. 50, n. 1-2, p. 17-27, 1976. ISSN 0304-8608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/816334> >.

Xie, Y. M. et al. [Therapeutic effect of probiotics and oral IgY as supplementary drugs in the treatment of pediatric rotavirus enteritis: a comparative study]. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v. 15, n. 11, p. 1000-5, Nov 2013. ISSN 1008-8830. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24229598> >.

Yamamoto, H. et al. [Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity]. **Jpn J Vet Res**, v. 23, n. 4, p. 131-40, Oct 1975. ISSN 0047-1917. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1241698> >.

Yang, H.; Chen, S.; Ji, S. [A novel rotavirus causing large scale of adult diarrhea in Shi Jiazhuang]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 19, n. 6, p. 336-8, Dec 1998. ISSN 0254-6450. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921117> >.

Yang, H. et al. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. **Virus Res**, v. 106, n. 1, p. 15-26, Nov 2004. ISSN 0168-1702. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522443> >.

Yokoyama, H. et al. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. **Am J Vet Res**, v. 59, n. 4, p.

416-20, Apr 1998. ISSN 0002-9645. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9563623> >.

Yokoyama, H. et al. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*. **Vaccine**, v. 16, n. 4, p. 388-93, Feb 1998. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607060> >.

Yolken, R.; Wyatt, R. G.; Kapikian, A. Z. ELISA for rotavirus. **Lancet**, v. 2, n. 8042, p. 819, Oct 1977. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/71624> >.

Yolken, R. H.; Wilde, J. A. Assays for detecting human rotavirus. In: Kapikian, A. Z. (Ed.). **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2nd edition. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 1994. p.251-78.

Yolken, R. H. et al. Measurement of rotavirus antibody by an enzyme-linked immunosorbent assay blocking assay. **J Clin Microbiol**, v. 8, n. 3, p. 283-7, Sep 1978. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/212453> >.

Yuan, L. et al. Protective immunity and antibody-secreting cell responses elicited by combined oral attenuated Wa human rotavirus and intranasal Wa 2/6-VLPs with mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin in gnotobiotic pigs. **J Virol**, v. 75, n. 19, p. 9229-38, Oct 2001. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533185> >.

Zeng, S. Q. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **J Virol Methods**, v. 153, n. 2, p. 238-40, Nov 2008. ISSN 0166-0934. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765254> >.

Zheng, B. J. et al. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. **J Med Virol**, v. 34, n. 1, p. 29-37, May 1991. ISSN 0146-6615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1653306> >.

Zlamy, M. et al. The impact of Rotavirus mass vaccination on hospitalization rates, nosocomial Rotavirus gastroenteritis and secondary blood stream infections. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 112, 2013. ISSN 1471-2334. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452879> >.

Zárate, S. et al. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. **J Virol**, v. 74, n. 2, p. 593-9, Jan 2000. ISSN 0022-538X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623720> >.

Özpinar, H. et al. Dose-dependent effects of specific egg-yolk antibodies on diarrhea of newborn calves. **Prev Vet Med**, v. 27, n. 1-2, p. 67-73, 1996.

8. ANEXO I

Certificado de aprovação do uso das aves no projeto pela Comissão de Ética no Trato com Animais da Fundação Educacional Serra dos Órgãos (CETA/UNIFESO) sob licença 0331/11 aprovado em 30/06/2011.

NOME DO PROPONENTE: <u>Marcelo Alves Pinto</u>	USO EXCLUSIVO DA CETA-UNIFESO		
	NÚMERO DA LICENÇA	DATA DE PROTOCOLO	DATA DE APROVAÇÃO
	<u>0331/11</u>	<u>25/6/11</u>	<u>30/6/2011</u>
	DATA DE VENCIMENTO: <u>30/6/2013</u>		
CENTRO UNIVERISTÁRIO SERRA DOS ÓRGÃOS			

DECISÃO DA CETA – UNIFESO

Data da Reunião: 30/06/2011

Aprovado Aprovado com pendência Com pendências Reprovado

Comissão: Dem. de Luísa B. da S.

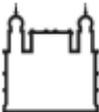
2º Carla F. de S.

3º Cláudia M. de S.

15

9. ANEXO II

Certificado de aprovação do uso dos macacos cynomolgus no projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) sob licença LW-35/11 aprovado em 26/09/2011.

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência</p>	 <p>CEUA Fundação Oswaldo Cruz Comissão de Ética no Uso de Animais</p>	
<h3>LICENÇA</h3>		LW-35/11
<p>Certificamos que o protocolo (P-75/10-4), intitulado "Anticorpos IgY contra o vírus da hepatite A e rotavírus: Aplicações biotecnológicas na terapêutica e no diagnóstico virológico", sob a responsabilidade de MARCELO ALVES PINTO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p> <p>Esta licença tem validade até 26/09/2015 e inclui o uso total de :</p>		
<p><i>Macaca fascicularis</i> - 4 Machos, Idade: 6 Mes(es), Peso: 2,0000 Kilo(s).</p>		
<p><i>Macaca fascicularis</i> - 8 Machos, Peso: 4,0000 Kilo(s).</p>		
<p><i>Macaca fascicularis</i> - 10 Machos, Idade: 6 Mes(es), Peso: 2,0000.</p>		
<p>Rio de Janeiro, 26 de setembro de 2011</p>		
<p>Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA</p>		
<p><small>Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br</small></p>		

10. ANEXO III

Artigo publicado na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz referente a aplicação da IgY em diagnóstico.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: 1-3, 2015 1

Using immunoglobulin Y as an alternative antibody for the detection of hepatitis A virus in frozen liver sections

Gentil Arthur Bentes^{1,†}, Natália Maria Lanzarini¹, Lyana Rodrigues Pinto Lima¹, Pedro Paulo de Abreu Manso², Alexandre dos Santos da Silva¹, Sergio da Silva e Mouta Junior², Juliana Rodrigues Guimarães¹, Marcia Terezinha Baroni de Moraes³, Marcelo Pelajo-Machado², Marcelo Alves Pinto¹

¹Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia ²Laboratório de Patologia

³Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

An increasing amount of research has been conducted on immunoglobulin Y (IgY) because the use of IgY offers several advantages with respect to diagnostic testing, including its easy accessibility, low cost and translatability to large-scale production, in addition to the fact that it can be ethically produced. In a previous work, immunoglobulin was produced and purified from egg yolks (IgY) reactive to hepatitis A virus (HAV) antigens. In the present work, this anti-HAV-specific IgY was used in an indirect immunofluorescence assay to detect viral antigens in liver biopsies that were obtained from experimentally infected cynomolgus monkeys. Fields that were positive for HAV antigen were detected in liver sections using confocal microscopy. In conclusion, egg yolks from immunised hens may be a reliable source for antibody production, which can be employed for immunological studies.

Key words: immunoglobulin Y - hepatitis A virus - indirect immunofluorescence

Immunoglobulin Y (IgY) is the major antibody produced by chickens (*Gallus gallus domesticus*). It is continually synthesised at a large scale, secreted into the blood and transferred to the egg yolk, where it accumulates (Warr et al. 1995). To obtain specific IgY antibodies against an antigen of interest, egg-laying hens are immunised with the antigen; following this, antibodies are purified from their egg yolks. This noninvasive method of obtaining antibodies is one of the advantages of using IgY in virological immunodiagnoses. Additional advantages of using IgY include the generation of a better immune responsiveness to mammalian antigens due to the phylogenetic distance between hens and mammals, the ability to generate IgY antibodies that have high avidity and with Fc regions that do not bind to Fc receptors in mammals, the fact that IgY does not activate the complement system and its lack of interaction with rheumatoid factor (Schade et al. 2005). Compared to immunoglobulin G purification, IgY purification is an easy, fast and low-cost isolation process that produces a high quantity of specific antibody. Therefore, IgY can be used in various immunological assays and may offer better results than traditionally used mammalian antibodies (Kricka 1999).

Infection with hepatitis A virus (HAV) occurs via the faecal-oral route and is the most common cause of acute viral hepatitis in Brazil. The incidence rate of

HAV is closely correlated to socio-economic conditions, hygiene status and access to safe drinking water (Franco et al. 2012). HAV infection spreads easily, either by personal contact or by the ingestion of contaminated food and water (Vital et al. 2006). The infection is generally self-limiting and can produce effects that range from an absence of symptoms to death from fulminant hepatitis (Nainan et al. 2006). IgY has been widely used in the diagnosis of infectious diseases, in methods such as immunofluorescence, immunohistochemistry, immunoenzymatic assay (ELISA) and western blotting (WB) (Tini et al. 2002, Young et al. 2007). The detection of HAV in liver sections is a useful tool for identifying acute or fulminant hepatitis cases in which IgM is undetectable in blood samples using commercial immunoassays and in cases where the serum viral load is either too low or unable to be detected using molecular RNA detection techniques (Shimizu et al. 1982, Ferreira et al. 2008). Rezende et al. (2003) concluded that low viral load was the primary factor associated with acute liver failure, presumably owing to a strong host immune response.

In a previous study, we demonstrated the use of anti-HAV IgY as a capture antibody in an "in-house" ELISA (da Silva et al. 2012). Here, we suggest the effectiveness of using IgY as a diagnostic measure of HAV in frozen liver sections from monkeys via indirect immunofluorescence (IIF).

The IgY used in this study was obtained during previous work performed by our group (de Paula et al. 2011), in which hens were immunised with HAV antigens combined with adjuvants (incomplete Freund's adjuvant and CpG-oligodeoxynucleotides, CpG-ODN). Eggs were collected and the immunoglobulin was purified by precipitation using the polyethylene glycol (PEG) method described by Polson et al. (1985). Next, the antibody was characterised by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide

doi: 10.1590/0074-02760140457

Financial support: CNPq (EU 15/2007, 476808/2007-3), FIOCRUZ (PAPES V)

† Corresponding author: gentilbentes@fiocruz.br

Received 2 December 2014

Accepted 27 February 2015

online | memorias.ioc.fiocruz.br

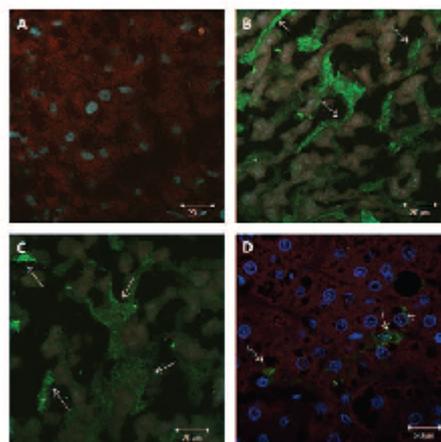
2 IgY is a useful tool for HAV studies • Gentil Arthur Bentes et al.

gel electrophoresis; its detected molecular weight confirmed that it was in fact IgY. To further confirm this result, the binding specificity of our purified anti-HAV IgY to HAV antigens on VP1, VP2 and VP3 was characterised by WB (Towbin et al. 1979) and in vitro neutralisation assay. Antibody levels were also titrated.

To be able to use IgY as a diagnostic, an additional purification was required. The anti-HAV IgY that was purified from egg yolks by PEG was subjected to thiophilic adsorption using a HiTrap IgY Purification HP column according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden). The purified IgY was dialysed against phosphate buffered saline (PBS) and the samples were concentrated using PEG.

HAV antigens were detected by IIF in histological sections of frozen liver samples taken from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). These samples were obtained from Amado et al. (2010), who had subjected cynomolgus monkeys to experimental infection with the Brazilian HAV strain (HAF-203; GenBank AF268396) in a previous study. First, the frozen liver samples were embedded in resin Tissue-Tek® (Miles Inc Diagnostic Division, USA) at low temperatures (dry ice). Next, the sections were cut into 4- μ m-thick slices using a cryostat and they were then applied to slides, fixed with acetone at 4°C and frozen at -70°C. The slides were blocked with a solution containing 2.5% bovine serum albumin and 8% foetal bovine serum (FBS) for 120 min in a moist chamber at 37°C. The slides were washed three times with PBS (pH 7.2). Subsequently, the tissue was incubated in a moist chamber at 37°C with the anti-HAV IgY (0.337 mg/mL) primary antibody at a dilution of 1:120 for 90 min. The slides were washed three times with PBS. Finally, the slides were incubated with goat anti-IgY IgG/Alexa Fluor® 488 (2 mg/mL) secondary antibody at a dilution of 1:1,200 (Molecular Probes®/Life Technologies™, USA) for 90 min in a dark chamber at 37°C. The slides were again washed three times with PBS. Evans blue dye was used to counterstain the histological sections and Slow Fade® glycerol with 4',6-diamino-2-phenylindole was added (Invitrogen™/Life Technologies™, USA). Images of the liver sections were obtained using a LSM Zeiss 510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss, Germany). Additionally, the primary antibody was replaced with a nonspecific chicken immunoglobulin IgY (0.314 mg/mL) at a dilution of 1:120 to verify the specificity of staining in infected tissues. For comparative purposes, a commercial monoclonal anti-HAV mouse IgG (0.1 mg/mL) diluted at 1:20 (United States Biological, USA) was also tested, as described by Amado et al. (2010).

We next determined that our purified anti-HAV IgY bound specifically to viral antigens present in sinusoidal lining cells and to hepatocytes scattered throughout the liver parenchyma of infected monkeys (B, C in Figure). A control antibody was used to verify the specificity IgY and it did not bind to HAV in an infected liver biopsy sample; specific staining of antigen-antibody was not observed (A in Figure). Furthermore, no background or non-specific binding was visualised when the anti-HAV IgY



Hepatitis A antigen labelled with immunoglobulin Y (IgY) by indirect immunofluorescence with confocal microscopy of the livers from cynomolgus monkeys inoculated with hepatitis A virus (HAV). A: absence of fluorescence label cells using a nonspecific IgY in HAV infected liver (control section); B, C: anti-HAV IgY as a primary antibody binding specifically with viral antigens in cytoplasm of sinusoidal lining cells (SLCs) (arrows); D: commercial anti-HAV IgG as primary antibody binding specifically with viral antigens in hepatocytes (arrowhead) and cytoplasm of SLCs (arrows).

was used, indicating that its purification by thiophilic adsorption was efficient at removing potentially interfering molecules from solution. Indeed, our purified anti-HAV IgY presented more clear and evident results than commercial mouse IgG (D in Figure). The staining of viral antigens was weaker with IgG, even when the IgG concentration was two-fold higher than the IgY (0.005 mg/mL vs. 0.0025 mg/mL). Thus, IgY demonstrated superior effectiveness, as only half of the amount of IgY was needed to produce more satisfactory results than IgG.

In this study, for the first time, the ability to use IgY as an alternative and specific diagnostic of hepatitis A in liver sections has been demonstrated, reinforcing the importance of this approach. Such an approach was previously demonstrated for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. in murine macrophages derived from bone marrow (Shin et al. 2009). Sanjeev et al. (2013) also proved the efficiency of using IgY to identify *Helicobacter pylori* via direct immunofluorescence. Additional studies have described using IIF to detect hypoxia-inducing factor-1 alpha in COS-7 monkey cells (Camenisch et al. 1999). Our results demonstrated the effectiveness of using IgY as a detection tool to facilitate the diagnosis of HAV by immunofluorescence. This work contributes to the dissemination of knowledge regarding IgY technology, which may enable it to play an even bigger role in research, diagnostics and immunotherapy.

REFERENCES

- Amado LA, Marchevsky RS, de Paula VS, Hooper C, Freire MS, Gaspar AM, Pinto MA 2010. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic sites of HAV replication. *Int J Exp Pathol* 91: 87-97.
- Camenisch G, Timi M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J, Spielmann P, Wenger RH, Gassmann M 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α . *FASEB J* 13: 81-88.
- da Silva AS, de Vasconcelos GALEM, Kappel LA, Pinto MA, de Paula VS 2012. An immunoenzymatic assay for the diagnosis of hepatitis A utilising immunoglobulin Y. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 960-963.
- de Paula VS, da Silva AD, de Vasconcelos GA, Iff ET, Vasconcelos ME, Kappel LA, Cruz PB, Pinto MA 2011. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *J Virol Methods* 171: 102-106.
- Ferreira CT, Vieira SM, Kieling CO, Silveira TR 2008. Hepatitis A acute liver failure: follow-up of paediatric patients in southern Brazil. *J Viral Hepat* 15: 66-68.
- Franco E, Malaleo C, Serino L, Sorbara D, Zaratti L 2012. Hepatitis A: epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol* 4: 68-73.
- Kricka LJ 1999. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem* 45: 942-956.
- Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS 2006. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* 19: 63-79.
- Pelton A, Coetzer T, Kruger J, von Maltzahn E, van der Merwe KJ 1985. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol Invest* 14: 323-327.
- Razende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, Gigon M, Nicand E, Ferre V, Dussaix E, Bismuth H, Faray C 2003. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology* 38: 613-618.
- Samiee P, Siavoshi F, Broujeni GN, Khorrami M, Sarrafnejad A, Malekzadeh R 2013. Localization of *H. pylori* within the vacuole of *Candida* yeast by direct immunofluorescence technique. *Arch Iran Med* 16: 705-710.
- Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Tarzolo HR 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim* 33: 129-154.
- Shimizu YK, Shikata T, Beninger PR, Sata M, Setoyama H, Abe H, Tamikawa K 1982. Detection of hepatitis A antigen in human liver. *Infect Immun* 36: 320-324.
- Shin SJ, Lee SS, Manning EJ, Collins MT 2009. Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Microbiol* 47: 600-609.
- Timi M, Jewell UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M 2002. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131: 569-574.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Vital CL, Gaspar AMC, Souto FJD 2006. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 119-127.
- Warr GW, Magor KE, Higgins DA 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 16: 392-398.
- Young CA, Silversides FG, Jones RM 2007. Chicken-derived IgY recognizes developing and mature stages of *Leishmania* (Microsporidia) in Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp. *Aquaculture* 273: 398-404.