

Desenvolvimento de estratégias inovadoras de imunização para viabilizar o uso de vacas como biofábricas de anticorpos neutralizantes produzidos a partir do colostro para tratamento e prevenção de doenças pandêmicas

Paola Eduarda de Almeida Souza⁽¹⁾, Letícia dos Santos Moreira⁽¹⁾, Clarissa Vidal de Carvalho⁽²⁾, Nicole Tafnes de Brito Silva Honório⁽²⁾, Ana Paula Almeida Bastos⁽³⁾, Luciano Paulino Silva⁽³⁾, Carlos Roberto Prudêncio⁽⁶⁾, Robert Domingues⁽⁴⁾, Emanuelle Baldo Gaspar⁽⁵⁾, Ana Luíza Franco⁽⁵⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽⁴⁾, Humberto de Mello Brandão⁽³⁾, Jaciara Diavão⁽⁷⁾, Abias Santos Silva⁽⁸⁾, Mariana Magalhaes Campos⁽³⁾ e Wanessa Araújo Carvalho⁽³⁾

⁽¹⁾Graduanda em Medicina Veterinária – UFJF, Bolsista da Pibic, Fapemig, Juiz de Fora, MG. e-mail: paola.souza@estudante.ufff.br, ⁽²⁾Graduanda em Ciências Biológicas – UFJF, Bolsista da PIBIC, CNPq, Juiz de Fora, MG, ⁽³⁾Pesquisador(a), Embrapa, Juiz de fora, MG, ⁽⁴⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽⁵⁾Técnico, Embrapa Gado de Leite, ⁽⁶⁾Pesquisador, Instituto Adolfo Lutz – IAL, ⁽⁷⁾Doutora em Ciência Animal – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, ⁽⁸⁾Doutor em Zootecnia – UNESP

Resumo- A Covid-19 é uma doença viral que causou graves problemas para a saúde pública e muitas mortes mundialmente. Anticorpos neutralizantes constituem uma estratégia de tratamento de casos graves dessa doença. Uma vez que o colostro bovino é rico em anticorpos e estes possuem alta homologia com IgG humana, o presente trabalho visa utilizar formulações vacinais contendo antígeno recombinante Spike (domínio RBD) do vírus SARS-CoV2 para viabilizar o uso de vacas como biofábricas. Para tal, vacas foram inoculadas, no período pré-parto, com o antígeno recombinante encapsulado em nanossistemas com direcionamento ativo para fagócitos (NIBDAF) ou em formulações contendo adjuvantes comerciais à base de sulfato de alumínio e saponina, além de uma vacina comercial contra o coronavírus bovino (BCoV). Foram coletados soro e colostro no dia do parto. A atividade neutralizante dos anticorpos foi medida por ELISA competitivo, demonstrando que todas as formulações utilizadas, com exceção da vacina contra BCoV, foram capazes de proporcionar neutralização do vírus SARS-CoV2. Testes deverão ser conduzidos em modelo murino para verificar efeito protetor de anticorpos purificados e do uso do colostro hiperimune como nutracêutico. A estratégia de uso de vacas como biofábricas de anticorpos neutralizantes pode constituir uma alternativa ao tratamento de doenças endêmicas ou patologias agudas em humanos e animais.

Termos para indexação: biofábricas, colostro bovino, Covid-19, neutralização viral.

Development of innovative immunization strategies to enable the use of cows as biofactories of neutralizing antibodies produced from colostrum for the treatment and prevention of epidemic and pandemic diseases

Abstract- COVID-19 is a viral disease that has caused serious problems for public health and worldwide deaths. Neutralizing antibodies constitute a treatment strategy for severe cases of this disease. Since bovine colostrum is rich in antibodies and these have a high

homology with human IgG, the present study aims to use vaccine formulations containing recombinant Spike antigen (RBD domain) of the SARS-CoV-2 virus to enable the use of cows as biofactories. To do so, cows were inoculated, during the pre-partum period, with the recombinant antigen encapsulated in nanosystems with active targeting to phagocytes (NIBDAF) or in formulations containing commercial adjuvants based on aluminum sulfate and saponin, in addition to a commercial vaccine against bovine coronavirus (BCoV). Serum and colostrum were collected on the day of calving. The neutralizing activity of the antibodies was measured by competitive ELISA, demonstrating that all formulations used, except the BCoV vaccine, were able to provide neutralization of the SARS-CoV-2 virus. Tests will be conducted in a murine model to verify the protective effect of purified antibodies and the use of hyperimmune colostrum as a nutraceutical. The strategy of using cows as biofactories for neutralizing antibodies may constitute an alternative for the treatment of endemic diseases or acute pathologies in humans and animals.

Index terms: biofactories, bovine colostrum, Covid-19, viral neutralization.

Introdução

Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil cerca de 700 mil pessoas faleceram devido à COVID-19 e mais de 30 milhões foram infectadas pelo vírus. O agente etiológico da doença é o SARS-CoV2, um vírus de RNA de fita simples envolto por um nucleocapsídeo e envelope contendo proteínas não estruturais e de membrana, como a Spike responsável pela invasão celular no hospedeiro por meio da ligação com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). Após essa interação, os vírus entram nas células, por endocitose, e iniciam sua multiplicação por meio da incorporação do RNA viral ao maquinário celular para formação de novas partículas virais (Yang; Rao, 2021; Ravi et al., 2022).

O colostro bovino corresponde à primeira secreção da glândula mamária após o parto sendo muito rico em proteínas, principalmente anticorpos da classe IgG (Guerra et al., 2017; Puppel et al., 2019). Existe certa variação na composição do colostro devido à imunidade e idade da fêmea, número de lactações e nutrição (Guerra, et al., 2017). O colostro hiperimune é produzido a partir da vacinação de vacas no pré-parto visando intensificar maiores produções de anticorpos já que, em média, uma vaca produz cerca de 42 a 90g/L de imunoglobulinas por lactação (Linehan et al., 2023).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é prospectar um protocolo vacinal para obtenção de soro e colostro hiperimune com atividade neutralizante contra o vírus SARS-CoV2 possibilitando o uso de vacas como biofábricas. Essa estratégia possui um impacto amplo na indústria de bioinsumos, cadeia leiteira, saúde humana e animal possibilitando produzir anticorpos neutralizantes em larga escala com potencial farmacológico e nutracêutico. Os resultados obtidos vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, no objetivo específico ODS 3 - Saúde de qualidade: Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades.

Material e métodos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo 1915290721). Vacas holandesas, no terço final da gestação, foram divididas de acordo

com a ordem de parto e produção de leite em cinco grupos homogêneos (n=5/grupo). Os animais foram imunizados com formulações vacinais contendo 150µg da proteína Spike (domínio RBD) recombinante do vírus SARS-CoV2, produzido no Instituto Adolfo Lutz, diluídas em 2 adjuvantes comerciais (Alumen Inject® e QuilA®) ou encapsuladas em um nanossistema imunomodulador lipossomal com direcionador ativo para fagócitos (NIBDAF; em processo de patenteamento), além de uma vacina comercial contra coronavírus bovino (BCoV; MSD®), para verificar imunidade cruzada, e soro fisiológico como controle. Os animais foram imunizados por via intramuscular, na região da tábua do pescoço, com 2 mL das respectivas formulações aos 45, 30 e 15 dias antes do parto. No dia do parto foram realizadas as coletas de soro e colostro. A neutralização viral foi feita por ELISA de competição utilizando o kit cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection (NL diagnostica®), conforme recomendação do fabricante. As amostras de soro, colostro e controles negativos e positivos, fornecidos pelo kit, foram previamente incubadas em um conjugado de RBD do vírus SARS-CoV2 e enzima Horse-Radish Peroxidase (HRP) seguido de incubação, em placas pré-sensibilizadas com a enzima ACE2, e leitura densidade óptica (DO; 450 nm) em espectrofotômetro de placa após a revelação enzimática com 3,3', 5, 5' – Tetrametil-Benzidina (TMB). O percentual de neutralização viral foi calculado com base no controle negativo de reação por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de Inibição} = 1 - \frac{\text{valor de od da amostra}}{\text{valor de od do controle negativo}} \times 100$$

Resultados iguais ou superiores a 20% indicam a presença de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV2 nas amostras. A média de taxa de inibição viral (TIV) foi calculada individualmente para cada grupo e a mediana e desvio padrão utilizados para cálculos estatísticos utilizando o teste de Mann-Whitney para verificar a significância dos dados.

Resultados e discussão

Grupos imunizados com RBD apresentaram TIV acima de 20% em relação aos animais controle ($P < 0,001$; Figura1). A imunização com RBD+QuilA® apresentou maior TIV no colostro (média de 96%) quando comparado à RBD+Alumen (média de 91%) e RBD+NIBDAF (média de 66%), sendo essa última capaz de induzir anticorpos na ausência de adjuvantes comerciais, sendo promissor para aumento da eficácia de vacinas para bovinos uma vez que se trata de um nanossistema obtido por metodologias de síntese verde (Mil; Dinischiotu, 2022).

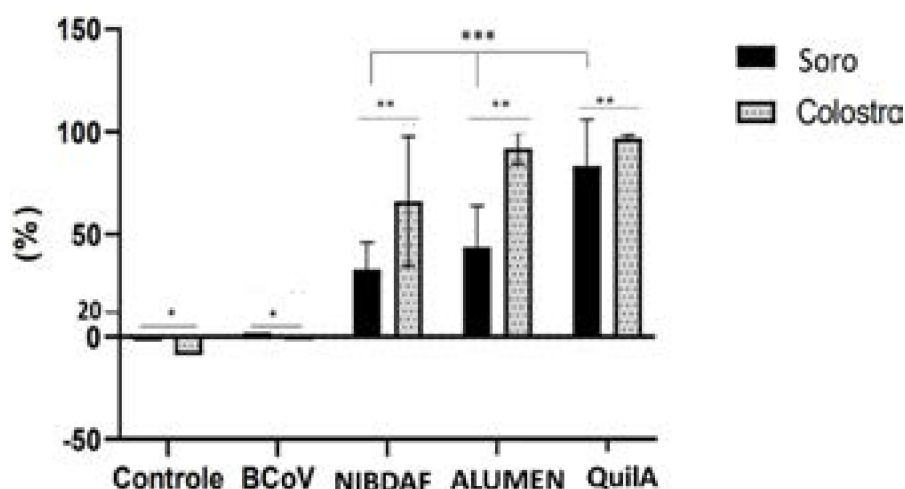


Figura 1. Taxa de neutralização viral em soro e colostro de vacas imunizadas com a proteína Spike (domínio RBD) recombinante do vírus SARS-CoV2 nos adjuvantes comerciais Alumen (Alumen Inject®) e QuilA® ou encapsuladas em NIBDAF, além de uma vacina comercial contra BCoV (MSD®). Em Y: Taxa de inibição viral. Asteriscos refletem diferença estatística significativa pelo teste de Mann-Whitney (* e ** $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$).

A imunização com BCoV não resultou na produção de anticorpos contra SARSCoV2, em consonância com Ellis et al. (2023). O colostro apresentou TIV maior que o soro ($P < 0,05$) em todos os grupos, provavelmente, devido à maior concentração de anticorpos nessas amostras, demonstrando que é possível utilizar vacas como biofábricas de anticorpos neutralizantes, corroborando resultados recentes de literatura (Nili et al., 2022). Futuramente, esses colostros serão testados quanto a atividade farmacológica e nutracêutica.

Conclusões

Vacas imunizadas com as formulações contendo o antígeno RBD produzem soro e colostro hiperimune com atividade neutralizante contra o SARS-COV-2. O uso de vacas como biofábricas de anticorpos neutralizantes pode se destacar como uma alternativa farmacológica e nutracêutica para combater a Covid-19.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio.

Referências

- ELLIS, J.; SNIATYNSKI, M.; RAPIN, N.; LACOSTE, S.; ERICKSON, N.; HAINES, D. SARS coronavirus 2-reactive antibodies in bovine colostrum. **Canadian Veterinary Journal**, v. 64, n. 4, p. 337-343, 2023.
- GUERRA, G. A.; DORNELES, E. M. S.; SOUZA, F. N.; CORTEZ, A.; BATISTA, C. F.; COELHO, S. G.; LAGE, A. P.; LIBERA, A. M. M. P. D.; HEINEMANN, M. B. Neonatologia em bezerros: a importância do colostro. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, n. 3, p. 32-41, 2017. DOI: <https://doi.org/10.36440/recmvz.v15i3.37632>.
- LINEHAN, K.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Bovine colostrum for veterinary and human health applications: a critical review. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 14, p. 387-410, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-014650>.
- MIU, B. A.; DINISCHIOTU, A. New green approaches in nanoparticles synthesis: an overview. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6472, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27196472>.

NILI, H.; BOUZARI, M.; ATTARAN, H. R.; GHALEGOLAB, N.; RABANI, M.; MAHMOUDIAN, A. Hyper-immune bovine milk as an immunological and nutritional supplement for COVID-19. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, article 868964, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.868964>.

PUPPEL, K.; GOŁEBIEWSKI, M.; GRODKOWSKI, G.; SLÓSZARZ, J.; KUNOWSKA-SLÓSZARZ, M.; SOLARCZYK, P.; ŁUKASIEWICZ, M.; BALCERAK, M.; PRZYSUCHA, T. Composition and factors affecting quality of bovine colostrum: a review. **Animals**, v. 9, n. 12, 1070, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani9121070>.

RAVI, V.; SAXENA, S.; PANDA, P. S. Basic virology of SARS-CoV 2. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 182-186, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.02.005>.

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 685-700, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00630-8>.