

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA NASCIMENTO FERREIRA

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS IGY CONTRA SARS-COV-2  
PRODUZIDOS EM GALINHAS

CURITIBA

2022

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS IGY CONTRA SARS-COV-2  
PRODUZIDOS EM GALINHAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Vanete Thomaz Socol  
Co-Orientador: Eliezer Lucas Pires Ramos

CURITIBA  
2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Ferreira, Gabriela Nascimento

Produção e avaliação de anticorpos IGY contra Sars-Cov-2 produzidos em galinhas / Gabriela Nascimento Ferreira. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Vanete Thomaz  
Soccol Coorientador: Eliezer  
Lucas Pires Ramos

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

ATA Nº171

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

No dia dezesseis de março de dois mil e vinte e dois às 14:00 horas, na sala 03 ( DEFESA FECHADA), Prédio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **GABRIELA NASCIMENTO FERREIRA**, intitulada: **Produção e avaliação de anticorpos IGY contra Sars-Cov-2 produzidos em galinhas**, sob orientação da Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: VANETE THOMAZ SOCCOL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), SUSAN GRACE KARP (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, VANETE THOMAZ SOCCOL, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 16 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

21/03/2022 10:58:36.0

VANETE THOMAZ SOCCOL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

17/03/2022 16:45:03.0

SUSAN GRACE KARP

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/03/2022 14:02:21.0

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELA NASCIMENTO FERREIRA** intitulada: **Produção e avaliação de anticorpos IGY contra Sars-Cov-2 produzidos em galinhas**, sob orientação da Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

21/03/2022

10:58:36.0 VANETE

THOMAZ SOCCOL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura

Eletrônica

17/03/2022

16:45:03.0

SUSAN

GRACE KARP

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura

Eletrônica

17/03/2022

14:02:21.0

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Universidade Federal do Paraná- Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná  
- Brasil CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3695 - E-mail:

secretaria.pb@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 165405

Para autenticar este documento/assinatura, acesse

<https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jspe> insira o código 165405

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, que sempre me deu apoio e incentivo sempre. Pai e Mãe, muito obrigada por acreditarem em mim.

Agradeço aos meus amigos, por me apoiarem e me ouvirem sempre que precisei.

Obrigada à Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos professores técnicos e colegas do programa de pós graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia por toda contribuição durante minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À todos que de alguma forma auxiliaram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada.

## RESUMO

Em março de 2020 a pandemia global causada pelo agente etiológico coronavírus da 2 (SARS-CoV2), cuja doença é denominada COVID-19, foi declarada, com grande número de casos e óbitos pelo mundo durante os últimos anos. O aumento rápido de casos confirmados faz com que a prevenção, controle e estratégias terapêuticas de COVID-19 sejam emergentes. Visando contribuir para o controle da pandemia e desenvolver métodos efetivos de diagnóstico e terapêuticos para a COVID-19, esse trabalho busca produzir anticorpos IgY a partir de peptídeos antigênicos que gerem anticorpos de alta avidéz. Foram sintetizados com base na proteína S e N do SARS-CoV-2, para avaliar a produção de anticorpos IgY em ovos de galinhas e potencial de neutralização viral e imunoterápicos. Os animais foram imunizados, por via intramuscular, sendo três imunizações quinzenais idênticas. Os anticorpos foram purificados por precipitação em sulfato de sódio. A avaliação da produção dos anticorpos específicos foi realizada por teste imunoenzimático (ELISA) indireto. E a avaliação do potencial neutralizante dos anticorpos foi realizada com pseudovírus da proteína S do SARS-CoV-2 que não apresentam capacidade de replicação. Dos cinco grupos avaliados o peptídeo 203 foi o que apresentou resultados de neutralização de 38% e 42%, na quinta e sexta semana de experimento, respectivamente. A avaliação da cinética de produção e avidéz dos anticorpos foi realizada por ELISA indireto. Os anticorpos dos grupos 132, 309 e 366 apresentaram anticorpos de avidéz entre 60% e 100% em todos os períodos avaliados.

Palavras-chaves: Anticorpos IgY. SARS-CoV-2. Avidéz. Peptídeos.

## **ABSTRACT**

In March 2020, the pandemic caused by the SARS-CoV2, called COVID-19 was declared, with a large number of cases and deaths around the world in recent years. The rapid increase of cases makes the prevention, control and therapeutic strategies of COVID-19 necessary. Aiming to contribute to the control of the pandemic and to develop effective diagnostic and therapeutic methods for COVID-19, this work aimed to select for antigenic peptides that have high avidity for application in viral neutralization and immunotherapeutic protocols. The antigens were synthesized based on Spike protein and nucleocapsid protein, from SARS-CoV-2, to evaluate the production of IgY in chickens. The animals were immunized intramuscularly, with three identical immunizations. The antibodies were purified by sodium sulfate precipitation. The evaluation of the production was performed by indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). And the evaluation of the neutralizing antibodies of SARS-CoV-2 was carried out with pseudoviruses that do not have the ability to replicate. Of the five groups gathered, peptide 203 was the one that presented neutralization results of 38% and 42%, in the fifth and sixth week of the experiment, respectively. The avidity index of the peptides ranges from 60 to 85%. The evaluation of the kinetic production of the works was performed by indirect ELISA. Groups 132, 309 and 366 showed high avidity antibodies in all periods.

Keywords: IgY antibodies. SARS-CoV-2. Avidity. Peptide.



## Lista de figuras

Figura 1. Esquema da fisiopatologia da COVID-19.....	22
Figura 2. Representação esquemática das imunoglobulinas Y e imunoglobulina G.....	29
Figura 3. Figura 3. Etapas desenvolvidas no presente trabalho.....	33
Figura 4. Esquema de imunização de galinhas com os peptídeos antigênicos derivados da proteína S e N de SARS-CoV-2 .....	36
Figura 5. Purificação e armazenamento das gemas. Índice de avidéz demonstrado pelos peptídeos frente a soro de pacientes infectados por SARS-Cov-2.....	38
Figura 6. Índice de avidéz demonstrado pelos peptídeos frente a soro de pacientes infectados por SARS-Cov-2. ....	44
Figura 7. Gema de ovos provenientes de galinhas imunizadas com peptídeos sintéticos com sequências aminoacídicas similares ao vírus SARS-CoV-2 separada dos ovos coletados. ....	41
Figura 8. Precipitado e sobrenadante da etapa de deslipidização.....	46
Figura 9. Quantificação proteica dos anticorpos IgY 366.....	46
Figura 10. Quantificação proteica dos anticorpos IgY 137 .....	46
Figura 11. Quantificação proteica dos anticorpos IgY 309 .....	47
Figura 12. Quantificação proteica dos anticorpos IgY 132 .....	47
Figura 13. Quantificação proteica dos anticorpos IgY 203 .....	48
Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrando a purificação da IgY de ovos de galinha contra peptídeos sintéticos .....	49
Figura 15. Cinética de produção de anticorpos IgY contra SARS-CoV-2.....	49
Figura 16. Índice avidéz dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 produzidos em galinhas. ....	50
Figura 17. Gráfico de neutralização dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 produzidos em galinhas, onde CP é o controle positivo do teste, e 203 os anticorpos IgY purificados e os demais pontos são os demais anticorpos avaliados.....	52
FIGURA 18. Gráfico de neutralização dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 do grupo 203, produzidos em galinhas, purificados, em diluições de 1:25, 1:50 e 1:100, onde CP é o controle positivo do teste. Sendo os pontos em destaque das semanas 1,5 e 6 .....	53

## Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Objetivo Geral.....	15
1.2 Objetivos Específicos .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Agente etiológico da Síndrome Respiratória Aguda Grave: Coronavírus 2 (COVID-19). .....	16
2.2 VARIANTES DE SARS-COV-2 .....	18
2.3 COVID-19 – a doença .....	20
2.4 RESPOSTA IMUNE CELULAR DO VIRUS SARS-COV-2 .....	23
2.5 RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	24
2.6 IMUNIZAÇÃO PASSIVA.....	26
2.7 IMUNOGLOBULINAS Y .....	28
3 METODOLOGIA.....	33
3.1 Seleção e síntese de peptídeos solúveis.....	33
3.2 Teste de Avidéz para os peptídeos produzidos .....	34
3.3 Conjugação dos peptídeos selecionados com proteína carreador. .....	35
3.4 Modelo Animal.....	35
3.5 Imunização .....	36
3.6 Coleta dos ovos.....	37
3.7 Armazenamento das gemas puras .....	37
3.8 Purificação dos anticorpos IgY totais.....	38
3.8.1 Remoção da fração rica em lipídeos da gema .....	38
3.8.2 Precipitação dos anticorpos IgY totais .....	39
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	39
3.10 ELISA indireto.....	40

3.11 ELISA de avidéz .....	40
3.12 Ensaio de neutralização .....	41
4 RESULTADOS .....	43
4.1 Seleção dos peptídeos de SARS-CoV-2 .....	43
4.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto de avidéz .....	43
4.3 Imunização dos animais e coleta dos ovos .....	44
4.4 Purificação de IgY produzidas em galinhas contra peptídeos sintéticos de SARS-CoV-2 selecionados in silico.....	45
4.5 Purificação das IgY: eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	48
4.6 Cinética da produção dos anticorpos.....	49
4.7 Ensaio de neutralização viral.....	51
5 DISCUSSÃO .....	54
5.1 ELISA indireto de avidéz .....	54
5.2 Modelo animal para Imunização e produção de anticorpos IgY ...	54
5.3 Efeitos colaterais da imunização com antígenos .....	55
5.4 Purificação de IgY .....	55
5.5 Caracterização dos anticorpos IgY anti SARS-CoV-2 .....	56
5.6 Cinética de produção de anticorpos .....	57
5.7 Neutralização.....	57
6 CONCLUSÃO.....	59

## 1. INTRODUÇÃO

A pandemia global da doença COVID-19 foi declarada pela Organização Mundial da Saúde em 11 de março de 2020. A doença da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) é causada pelo agente etiológico coronavírus, descoberto no final de 2019. É caracterizada por febre, tosse seca e cansaço, e a inflamação associada a COVID-19 grave pode levar à insuficiência respiratória, choque e, finalmente, a morte (WHO, 2020). O aumento rápido nos números de casos confirmados faz com que a prevenção e controle do COVID-19 sejam extremamente necessários, e com isso o diagnóstico rápido e eficiente contribui para redução do contágio e melhora dos pacientes. Os testes diagnósticos utilizados são em sua maioria sorológicos ou moleculares.

Para minimizar a transmissão do vírus e reduzir a mortalidade, regulamentos que obrigam o uso de máscaras e limitam o contato próximo foram implementados em muitos países. Com uma redução nos números de casos e mortes ocorreu um relaxamento nas regras de distanciamento social. Isso, por sua vez, foi seguido por um novo surto de infecções, com taxas de casos e mortalidade excedendo os surtos iniciais (SHOLUKH et al, 2020). Porém, em Janeiro de 2021, em Manaus os números de hospitalizações por COVID-19 aumentaram abruptamente, depois de meses estáveis, mesmo com a população previamente infectada (76%). Um motivo pode ser que as linhagens de SARS-CoV-2 tenham escapado da imunidade gerada em resposta à infecção anterior (SABINO et al., 2021).

Embora as técnicas de detecção molecular, como RT-PCR, realizada com *swabs* nasofaríngeos ou outras amostras do trato respiratório superior, e o sequenciamento tenham desempenhado um papel importante no diagnóstico e no monitoramento das alterações genéticas do vírus, existe uma necessidade de testes sorológicos confiáveis e acessíveis. Esses testes são uma ferramenta para avaliação em massa, sendo útil para monitorar o aumento dos casos na população, investigação da taxa de infecção assintomática, determinação

precisa da taxa de letalidade e avaliação da imunidade protetora humoral em pacientes recuperados e vacinados. Em março de 2021, os testes sorológicos expandiram para incluir testes que detectam as respostas das células T e as respostas dos anticorpos neutralizantes (SETHURAMAN; JEREMIAH; RYO, 2020; WEST et al., 2021).

A entrada do SARS-CoV-2 na célula é mediada pela ligação da glicoproteína S (spike) do vírus com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que atua como um receptor de célula hospedeira para infecção no epitélio das vias aéreas humanas, que é o órgão mais comumente afetado (ROKNI; GHASEMI; TAVAKOLI, 2020). O desenvolvimento de uma resposta imune depende do sistema imune inato, que consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos. Estes estão em ação mesmo antes da infecção. São preparados para responder rapidamente a infecções ou qualquer corpo estranho. Para desenvolver uma resposta antiviral, o sistema imunológico inato reconhece estruturas produzidas pela invasão do vírus. Estas estruturas são denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e são reconhecidos pelos receptores endossômicos de ácido ribonucleico (RNA) (ROKNI; GHASEMI; TAVAKOLI, 2020).

Para estimular a resposta imune deve-se utilizar imunização ativa que se refere ao processo de exposição do indivíduo a um antígeno para gerar resposta imune adaptativa. Contudo, o desenvolvimento de vacinas eficazes é um processo longo, com isso a imunização passiva se torna uma alternativa para controlar as infecções. A imunização passiva consiste na administração de anticorpos pré-formados ou imunoglobulinas para o tratamento de infecções. As preparações de anticorpos usadas para a imunização passiva contêm principalmente anticorpos policlonais derivados, principalmente, do soro de animais imunizados ou humanos imunizados (GRAHAM; AMBROSINO, 2015).

Os primeiros registros da imunização passiva utilizando anticorpos IgY são do ano de 1893, utilizados como agente neutralizante contra a toxina do tétano. O uso de IgYs não foi amplamente aplicado até surgir o princípio dos 3Rs

*(Replacement, Reduction and Refinement)* que foi descrito pela primeira vez por Russell e Burch em 1959. Os IgYs ganharam mais atenção por suas propriedades químicas estáveis, baixo custo, alto rendimento e melhor bem-estar animal (ABBAS et al., 2019).

A busca por antígenos para uso em diagnósticos e possíveis imunoterápicos para COVID-19 são de extrema importância e urgência, devido a atual pandemia, com isso o presente trabalho visa avaliar anticorpos IgY produzidos em galinhas contra peptídeos sintetizados com base na proteína S e N do SARS-CoV-2. Os anticorpos produzidos devem ser avaliados quanto ao potencial neutralizante. Os pseudovírus são ferramentas virológicas úteis devido à sua segurança e versatilidade, especialmente para vírus emergentes e reemergentes. Devido à sua elevada patogenicidade e infecciosidade e à falta de vacinas e terapêuticas eficazes, o SARS-CoV-2 vivos tem de ser manuseado em nível de biossegurança 3, o que dificulta o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias (NIE et al., 2020).

Visando produzir anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 o presente trabalho foi desenvolvido selecionando peptídeos que induzem anticorpos de alta avidéz para produzir IgY e avaliá-los quanto a capacidade de neutralização do vírus causador da COVID-19.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpos IgY neutralizantes utilizando peptídeos sintéticos do SARS-CoV-2.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e selecionar por SPOT-Synthesis peptídeos antigênicos derivados da sequência da proteína Spike de SARS-CoV-2;
- Testar a sororreatividade de peptídeos da proteína Spike para os anticorpos IgG em amostras de indivíduos que tiveram COVID-19 pela técnica de ELISA indireto;
- Selecionar por teste ELISA de avidéz peptídeos antigênicos da proteína Spike e Nucleocapsídeo que induzem anticorpos IgG de alta avidéz;
- Imunizar galinhas com peptídeos antigênicos da proteína S e N que induzem anticorpos de alta avidéz;
- Purificar anticorpos IgY da gema de ovos de galinha imunizadas com peptídeos antigênicos da proteína S e N;
- Avaliar o potencial neutralizante dos anticorpos IgY da gema de ovos de galinha imunizadas com peptídeos antigênicos da proteína S e N.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE: CORONAVÍRUS 2 (COVID-19).

Os coronavírus foram descritos pela primeira vez em 1966 por Tyrell e Bynoe, um vírus isolado de pacientes com resfriados comuns. São uma subfamília de vírus grandes e envelopados, variando de 27 a 32 kilobases (kb), de morfologia esférica com espículas em sua superfície externa, semelhantes a uma coroa, com cerca de 100 a 160 nm de diâmetro (LIMA; DE SOUSA; LIMA, 2020). A subfamília de coronavírus é genotipicamente dividida em quatro gêneros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  *Coronavirinae* que consiste em Alfacoronavírus ( $\alpha$ CoV), Betacoronavírus ( $\beta$ CoV), Gammacoronavírus ( $\gamma$ CoV) e Deltacoronavírus ( $\delta$ CoV). O  $\beta$ -coronavírus pode ainda ser classificado em quatro linhagens virais de A-D (CUI; LI; SHI, 2019).

Os coronavírus (CoVs) são, tradicionalmente, considerados patógenos não letais para seres humanos e são responsáveis por aproximadamente 15% dos resfriados comuns. Infecções por CoV humano são causadas por  $\alpha$ - e  $\beta$ -CoVs, e estão associadas ao trato respiratório superior. Os sintomas comuns são febre, dor de cabeça e tosse, alguns pacientes podem ter infecções no trato respiratório inferior (LI et al., 2020a).

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA fita simples de sentido positivo (+ ssRNA) que pertence à família *Coronaviridae* da ordem dos Nidovirales (ROKNI; GHASEMI; TAVAKOLI, 2020). Seu genoma conta com quatro proteínas estruturais principais: a *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). A entrada do coronavírus nas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína transmembrana spike (S) que forma três subunidades idênticas, as quais se propagam na superfície viral. São duas as subunidades funcionais. A subunidade S<sub>1</sub> N-terminal, responsável pela ligação vírus ao receptor e uma subunidade S<sub>2</sub> C-terminal responsável pela fusão do vírus à membrana celular (OU et al., 2020). Além do domínio N-terminal (NTD)



a subunidade S<sub>1</sub> ainda conta com um domínio de ligação ao receptor (RBD). Ambos SARS-CoV-2 e SARS-CoV se ligam a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). Durante a infecção, o CoV se liga à célula hospedeira por meio da interação entre S<sub>1</sub>-RBD e o receptor da membrana celular, desencadeando mudanças conformacionais na subunidade S<sub>2</sub> que resultam na fusão do vírus e a entrada na célula alvo (JIANG; HILLYER; DU, 2020).

Segundo Xu et al. (2020), foi realizada uma análise de alinhamento de sequência de proteínas usando *Blastp*, e os resultados mostraram que a maioria das proteínas SARS-CoV-2 são altamente homólogas (95% a 100%) às proteínas do vírus SARS-CoV, indicando a similaridade evolutiva entre SARS-CoV e SARS-CoV-2, o genoma do RNA viral é 82% idêntico ao coronavírus SARS anterior (SARS-CoV).

As infecções epidêmicas causadas por Covs, a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) em 2002, e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012 ocorreram pela transmissão de CoVs de animais para humanos. Com os diversos casos de pneumonia inexplicáveis em Wuhan em dezembro de 2019, concluiu-se que um novo coronavírus era o agente etiológico da doença, o SARS-CoV-2, identificado a partir do isolamento do vírus de células de epitélio respiratório de pacientes (XU et al., 2020).

Após liberação de RNA viral no citoplasma do hospedeiro e sua tradução, são geradas poliproteínas replicase pp1a e pp1b, que posteriormente são clivadas pelo vírus e codificadas em pequenas proteínas. A entrada do SARS-CoV-2 nas células-alvo do hospedeiro depende da ligação da glicoproteína spike com o receptor ACE2 para internalização e de Serina proteases TMPRSS2 para iniciação da proteína S. A proteína S forma três subunidades idênticas que se propagam da superfície viral. Duas subunidades funcionais são responsáveis pela ligação ao receptor da célula hospedeira (subunidade S<sub>1</sub>) e fusão de membranas virais e celulares (subunidade S<sub>2</sub>) (HOFFMANN et al., 2020; WALLS et al., 2020).

Estudos mostraram que a glicoproteína spike do SARS-CoV-2 exibe

afinidade com o receptor ACE2 10-20 vezes maior em comparação ao do SARS-CoV. Essa ligação resulta em mudanças conformacionais na proteína spike levam à fusão da proteína do envelope viral com a membrana da célula hospedeira após a entrada via endossomal (MATSUYAMA; TAGUCHI, 2009; WRAPP et al., 2020). A ACE2 é uma proteína transmembrana expressa na superfície de diversas células do corpo, como o epitélio do sistema respiratório. As células infectadas pelo vírus podem escapar do interferon (IFN I) tipo I, proteínas solúveis produzidas pelas células dendríticas com potentes atividades antivirais, resultando em replicação viral não controlada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ROKNI; GHASEMI; TAVAKOLI, 2020).

Mutações surgem naturalmente com a replicação viral. Os vírus de RNA costumam ter taxas de mutação mais alta do que os vírus de DNA. Entretanto, os coronavírus fazem menos mutações do que a maioria dos vírus de RNA, pois codificam uma enzima que corrige alguns dos erros cometidos durante a replicação. Na maioria dos casos uma mutações que conferem uma vantagem competitiva com relação à replicação viral, transmissão ou escape do sistema imune aumentarão em frequência, e as que reduzem a aptidão viral tendem a ser eliminados da população de vírus circulantes (LAURING; HODCROFT, 2021).

## 2.1 VARIANTES DE SARS-COV-2

Os termos mutação, variante e cepa são frequentemente usados alternadamente na descrição da epidemiologia da SARS-CoV-2. Mas, as distinções são importantes. **Mutação** se refere à mudança real na sequência de nucleotídeos. **Genomas** que diferem na sequência de nucleotídeos são chamados de variantes. Este termo é menos preciso porque duas variantes podem diferir por uma mutação ou muitas. Ou seja, uma variante é uma **cepa** quando tem um fenótipo comprovadamente diferente, por exemplo, uma diferença na antigenicidade, transmissibilidade ou virulência (LAURING; HODCROFT, 2021).

Desde o início da pandemia de COVID-19, a OMS recebeu vários relatórios de eventos incomuns de saúde pública, possivelmente devido a variantes do SARS-CoV-2. A OMS avalia rotineiramente se essas variantes resultam em alterações na transmissibilidade, apresentação clínica e gravidade, ou se têm impacto nas contramedidas, incluindo diagnósticos, terapêuticas e vacinas. Em dezembro de 2020, um aumento inesperado nos casos COVID-19 relatados foi atribuído ao surgimento das novas variantes 501Y.V1 do SARS-CoV-2 (B.1.1.7) no Reino Unido; e 501Y.V2 (B.1.351) na África do Sul. As três variantes têm a mutação N501Y, que muda o aminoácido asparagina (N) para tirosina (Y) na posição 501 na região RBD da proteína S (FONTANET et al., 2021).

Em 14 de dezembro de 2020, as autoridades do Reino Unido comunicaram à OMS uma variante denominada pelo Reino Unido como SARS-CoV-2 VOC 202012/01 (antiga B.1.1.7). Esta variante contém 23 substituições de nucleotídeos e não está filogeneticamente relacionada ao vírus SARS-CoV-2 que circulava no Reino Unido, no momento em que a variante foi detectada. A origem exata dessa variante não está clara, apareceu inicialmente no sudeste da Inglaterra, mas em poucas semanas começou a substituir outras linhagens de vírus nesta área e em Londres. A linhagem B.1.1.7 se expandiu quando os casos de SARS-CoV-2 se espalharam, um forte indício de seleção natural de um vírus, visto que é mais transmissível em nível populacional (LAURING; HODCROFT, 2021). Achados epidemiológicos preliminares, de modelagem, filogenéticos e clínicos sugerem que a linhagem B.1.1.7 aumentou a transmissibilidade. No entanto, as análises também indicam que não há mudança na gravidade da doença ou ocorrência de reinfecção entre casos variantes em comparação com outras linhagens de SARS-CoV-2 circulando no Reino Unido (Public Health England, 2020). A variante 501Y.V2 foi estimada como 50% mais transmissível do que as variantes preexistentes na África do Sul, e B.1.1.7 entre 43 e 82% mais transmissível do que as variantes preexistentes no Reino Unido. As variantes 501Y.V2 e P.1 têm duas mutações adicionais de domínio de ligação ao receptor (ABDOOL KARIM; DE OLIVEIRA,

2021).

Em novembro de 2021 uma nova variante B.1.1.529 foi relatada à OMS que a nomeou como variante Omicron. Poucos dias após a identificação do Omicron na África, a variante surgiu em outros continentes. Em dezembro de 2021, a mesma foi relatada em 34 países e áreas, incluindo Botswana, Hong Kong, África do Sul, Israel, Bélgica, Itália e os EUA e continua se espalhando por outras regiões (HE et al., 2021).

O surgimento de variantes do SARS-CoV-2, após um período de estabilidade genética viral, causa uma preocupação, visto que várias novas variantes de escape podem surgir no futuro e levar a uma nova epidemia. O aumento da transmissão viral também cria maiores oportunidades para novas variantes do SARS-CoV-2 (FONTANET et al., 2021). O potencial das variantes de escapar da imunidade induzida naturalmente ou por vacina torna o desenvolvimento das próximas gerações de vacinas necessário para que induzam ampla atividade neutralizante contra as atuais e futuras variantes (ABDOOL KARIM; DE OLIVEIRA, 2021).

## 2.2 COVID-19 – A DOENÇA

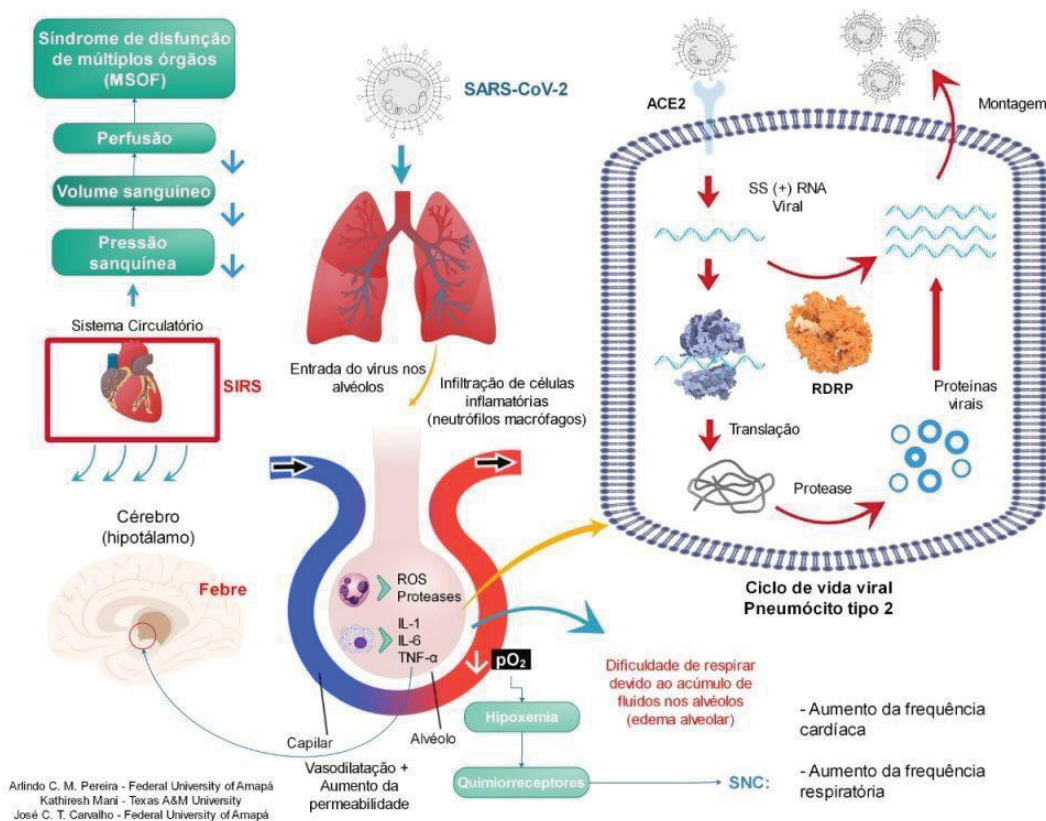
Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, importante centro de transporte da China, casos de pneumonia grave de causa desconhecida começaram a aparecer nos hospitais locais. Desses casos iniciais, muitos tiveram uma exposição comum ao mercado atacadista de frutos do mar da Huanan, que também comercializava animais vivos. O sistema de vigilância instalado após o surto de SARS, foi ativado e amostras respiratórias dos pacientes foram enviadas aos laboratórios de referência para investigações etiológicas (SINGHAL, 2020). Dentro de um mês o vírus SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente por toda a China. Em 31 de dezembro de 2019, a China notificou o surto à Organização Mundial da Saúde e em 1º de janeiro o mercado de alimentos do mar de Huanan foi fechado. Em 7 de janeiro, o vírus

foi identificado como um coronavírus que apresentava 95% de homologia com o coronavírus de morcego e >70% de similaridade com o SARS-CoV. O vírus não se limitou ao país, foi altamente contagioso e se espalhou para mais de 100 países em cerca de 2-3 meses (SINGHAL, 2020)

O número de casos clínicos começou a aumentar exponencialmente, alguns dos quais não tiveram exposição ao mercado de animais vivos, sugerindo o fato de que a transmissão homem-homem estava ocorrendo. O primeiro caso fatal foi relatado em 11 de janeiro de 2020 (HUANG et al., 2020). A pandemia chamada de COVID-19 foi declarada pela OMS em 11 de março de 2020 e tem sobrecarregado os sistemas de saúde em todo o mundo. Em fevereiro de 2021 o sistema de saúde brasileiro estava à beira do colapso, com 11,780,820 casos e aproximadamente 290.000 mortes (Worldometer, 2021). Atualmente (09 de Março de 2022) são: 449.727.293 casos confirmados e 6.014.690 mortes no mundo (WHO, 2021).

O espectro clínico da infecção pelo SARS-CoV-2 é muito amplo, podendo variar de sintomas gripais leves até uma pneumonia grave. O quadro clínico inicial da doença é caracterizado como uma síndrome gripal. Os principais sintomas da COVID-19 geralmente incluem problemas respiratórios leves e febre persistente, dores de cabeça e tosse, o tempo de incubação é em média de 2 a 14 dias. Em casos graves são relatados falência respiratória, choque séptico e falha de múltiplos órgãos (LIMA, 2020). A Figura 1 demonstra um esquema da fisiopatologia da COVID-19.

FIGURA 1. ESQUEMA DA FISIOPATOLOGIA DA COVID-19



Fonte: Pereira, A; Mani, K, Carvalho, J. 2021.

Após a infecção o primeiro local que o vírus começa a se replicar são as células epiteliais das vias aéreas. Conforme a doença progride, o vírus se transmite para as seções inferiores das vias aéreas (ESMAEILZADEH, ELAHI, 2020). Os dados epidemiológicos sugerem que as gotículas expelidas durante a exposição face a face durante a fala, tosse ou espirro são o modo de transmissão mais comum. Exposição prolongada a uma pessoa infectada, estando a menos de 2 metros por pelo menos 15 minutos, e curtas exposições a indivíduos sintomáticos estão associadas a maior risco de transmissão, enquanto breves exposições com assintomáticos têm menos probabilidade de resultar em transmissão (WIERSINGA et al., 2020). Em média cada indivíduo tem o potencial de espalhar a infecção para outras 2.2 pessoas (EAKACHAI PROMPETCHARA, CHUTITORN KETLOY, 2020).

### 2.3 RESPOSTA IMUNE CELULAR DO VIRUS SARS-COV-2

Os antígenos virais são apresentados por meio de células apresentadoras de antígeno (APCs) para linfócitos T citotóxicos, específicos de vírus (LI et al., 2020b). Ao contrário dos linfócitos B, as células T reconhecem apenas antígenos peptídicos no contexto de uma molécula do Complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As células T CD4 reconhecem peptídeos apresentados no contexto de MHC classe II, e as células TCD8, em um contexto de MHC classe I. O processo de diferenciação do linfócito T em célula T CD4 ou T CD8 acontece no estágio duplo positivo (CD4+CD8+) em que uma célula T é capaz de receber um sinal positivo de um dos dois tipos de MHC. Este estímulo faz com a célula T diferencie-se em uma célula CD4, em caso de um sinal positivo do MHC classe II, ou CD8, em caso de um sinal positivo do MHC de classe I (DETANICO, 2008).

Os Interferons (IFN) para muitos vírus respiratórios parecem desempenhar papel relevante na limitação da infecção, incluindo o SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2, especificamente os IFN inatos, do tipo I e III. A doença respiratória aguda provocada pela infecção por SARS-CoV-1 e MERS-CoV tem sido caracterizada por uma resposta inflamatória desregulada, na qual uma produção tardia de IFN tipo I promove a acumulação de monócitos e macrófagos inflamatórios (BOECHAT et al., 2021).

Dados recentes apontam também para possível desregulação dos IFN tipo I e III na resposta aos SARS-CoV-2. Os IFN de tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) são alguns dos primeiros mecanismos da defesa inata antiviral, induzindo resistência, tanto na célula infectada quanto nas células vizinhas, interferindo com a replicação viral e celular. Em paralelo, potencializam a resposta imune celular, inata e adaptativa, para eliminação das células infectadas e uma assinatura consistente de quimiocinas (BLANCO-MELO et al., 2020).

Blanco-Melo et al. (2020), avaliaram a resposta transcricional ao SARS-CoV-2, em diversas linhas celulares pulmonares, modelos animais e tecido pulmonar de pacientes com COVID-19, comparando as respostas com outros

vírus respiratórios (Influenza A e SARS-CoV-1). Demonstraram que há desregulação da resposta do hospedeiro, já que o SARS-CoV-2 não desencadeia resposta IFN I/III robusta, mas induz produção robusta de quimiocinas, com capacidade de recrutar células inflamatórias, que começa cerca de 3 dias após a infecção e continua após a eliminação do vírus.

Vírus como os SARS-CoV são citopáticos, induzem lesão e morte celular nos tecidos infectados por piroptose, uma forma de morte celular associada a inflamação e exsudação vascular. A IL-1 $\beta$  é uma das citocinas pró-inflamatórias libertada nesse processo. Numa situação fisiológica normal essa resposta no pulmão tenderia à eliminação dos microrganismos, pela atividade de depuração dos macrófagos alveolares. Mas, em decorrência de alta carga viral, pode ocorrer resposta imune disfuncional, resultando numa hiperinflamação pulmonar, desencadeada por uma produção excessiva de citocinas denominada de “tempestade de citocinas” (BOECHAT et al., 2021).

Desde o surgimento da COVID-19, vários estudos descreveram níveis anormais de citocinas e quimiocinas em pacientes acometidos pela doença causada pelo SARS-CoV-2. O ponto chave da infecção do SARS-CoV-2 pode ser o esgotamento de defesas antivirais relacionadas a infecções, resposta imune, bem como uma produção elevada de agentes inflamatórios (COSTELA-RUIZ; ILLESCAS-MONTES; PUERTA-PUERTA, 2020). Uma abordagem direcionada a citocinas para o tratamento de COVID-19 grave inclui bloqueio da IL-6 com anticorpos monoclonais para IL-6 ou para o receptor de IL-6 (CRON; CARICCHIO; CHATHAM, 2021).

## 2.4 RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são produzidos pelos linfócitos B. Os linfócitos B são células especializadas, cuja principal função é a produção de anticorpos. Essas moléculas glicoproteicas agem na resposta imune específica combatendo infecções por meio de três vias, a neutralização, a opsonização e a ativação do complemento. Ao contrário da



resposta das células T, que são drasticamente reduzidas em pacientes com COVID-19 na forma grave, as respostas humorais ao SARS-CoV-2 e suas correlações com a gravidade da doença são diversas, e títulos mais elevados de anticorpos estão associados a manifestações clínicas graves (LEE; OH, 2021).

Os anticorpos geralmente desempenham um papel crucial no tratamento da infecção viral por diferentes mecanismos, como neutralizar o vírus na etapa inicial da infecção, marcar os antígenos virais na superfície das células infectadas, e também modular a atividade de outros componentes imunológicos (KNIES et al., 2021). Após a invasão de um agente infeccioso como o SARS-CoV-2 e seus antígenos, o hospedeiro desencadeia uma resposta humoral pela produção de anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) a partir de células plasmáticas. Esta resposta imune é orquestrada por uma interação de várias classes de anticorpos, incluindo imunoglobulinas IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada classe de imunoglobulina possui regiões constantes específicas, que possuem qualidades biofísicas distintas, funções, distribuições e meias-vidas (KNIES et al., 2021). As imunoglobulinas relatadas com mais frequência como estando envolvidas na resposta humoral após a infecção por SARS-CoV-2 são IgM, IgA e IgG. Estudo prospectivo com 67 pacientes com COVID-19 mostrou que anticorpos IgM e IgG contra a proteína do nucleocapsídeo (N) começaram nos dias 7 e 10 atingindo o pico com 28 e 49 dias, respectivamente. Além disso, esses anticorpos aparecem mais cedo e seus títulos são significativamente mais elevados em pacientes com doença grave do que em pacientes não graves (MASIÁ et al., 2020).

Suthar et al. (2020) verificaram que as respostas de anticorpos IgG específicos para RBD são rapidamente induzidas em pacientes hospitalizados com infecção aguda por COVID-19. A maioria dos pacientes apresentam respostas de anticorpos específicos para essa região em seis dias após a confirmação da doença em teste de PCR. A troca de classe também ocorre no início da infecção e é dominada por respostas IgG1 e IgG3 específicas de RBD. Também foram detectadas respostas para IgM e IgA específicas para

RBD em níveis relativamente mais baixos em comparação com IgG. Esses anticorpos neutralizantes se correlacionam diretamente com títulos de anticorpos IgG específicos para RBD. Esses achados indicam fortemente que uma resposta imune humoral robusta ocorre no início e durante infecções por COVID-19 graves ou moderadas (SUTHAR et al., 2020).

Estudos usando sistemas baseados em partículas de pseudovírus sugerem que o plasma de pacientes convalescentes tem atividade neutralizante potente. Foi relacionada às moléculas de IgG que reconhecem o RBD da proteína S, sugerindo que os anticorpos IgG-RBD-S têm uma alta probabilidade de cumprir funções de neutralização do vírus (nAbs) (WU et al., 2021).

## 2.5 IMUNIZAÇÃO PASSIVA

A imunização ativa se refere ao processo de exposição do indivíduo a um antígeno para gerar resposta imune adaptativa. Contudo, o desenvolvimento de vacinas eficazes é um processo longo, com isso a imunização passiva se torna uma alternativa para controlar as infecções. A imunização passiva consiste na administração de anticorpos pré-formados ou imunoglobulinas para o tratamento de infecções. As preparações de anticorpos usadas para a imunização passiva contêm principalmente anticorpos policlonais derivados, principalmente, do soro de animais imunizados ou humanos imunizados (GRAHAM; AMBROSINO, 2015). No caso do SARS-CoV-2, o mecanismo de ação previsto pelo qual a terapia passiva com anticorpos mediará a proteção é a neutralização viral. No entanto, outros mecanismos são possíveis, como citotoxicidade celular dependente de anticorpos ou fagocitose. Possíveis fontes de anticorpos para SARS-CoV-2 são soros convalescentes humanos de indivíduos que se recuperaram de COVID-19, ou anticorpos monoclonais (mAbs) ou preparações geradas em hospedeiros animais infectados experimentalmente.

A terapia passiva com anticorpos tem sido usada contra muitos microrganismos que são responsáveis por doenças humanas, incluindo vírus,

bactérias, fungos e grupos de parasitos. Em contraste com o uso de terapia com mAb para tratar doenças malignas, que depende da discriminação entre autoantígenos que são expressos por células normais e tumorais, passiva terapia de anticorpos para doenças infecciosas é auxiliada pelas grandes diferenças antigênicas entre o microrganismo e o hospedeiro (CASADEVALL; DADACHOVA; PIROFSKI, 2004). Portanto, a plasmaterapia foi usada anteriormente para o tratamento de várias doenças como a gripe e também demonstrou benefícios clínicos em pacientes com SARS e MERS (CASADEVALL; PIROFSKI, 2020; ESMAEILZADEH, ELAHI, 2020). Nas duas últimas epidemias com coronavírus SARS-1 em 2003 e MERS em 2012, a alta mortalidade e a ausência de terapias eficazes levaram ao uso de soro de pacientes em convalescença. A epidemia de SARS-1 foi contida, mas a MERS tornou-se endêmica no Oriente Médio e desencadeou um grande surto secundário na Coreia do Sul (ARABI et al., 2016).

Existem duas categorias de riscos da administração passiva de soros de convalescença: conhecidas e teóricas. Os riscos conhecidos são aqueles associados à transferência de substâncias do sangue, que incluem infecção com outro agente infeccioso e reações aos constituintes do soro, incluindo reações imunológicas. Atualmente os bancos de sangue rastreiam patógenos transmitidos pelo sangue e correspondem ao tipo de sangue de doadores e receptores, assim, os riscos de transferência inadvertida de agentes infecciosos conhecidos ou de desencadear reações transfusionais são baixos (GAJIC et al., 2007). O risco teórico envolve o fenômeno do aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE). A ADE pode ocorrer em várias doenças virais e envolve um aumento da doença na presença de certos anticorpos. Para os coronavírus, mecanismos para ADE foram descritos, e existe a preocupação teórica de que os anticorpos para um tipo de coronavírus poderiam aumentar a infecção para outra cepa viral (WAN et al., 2020).

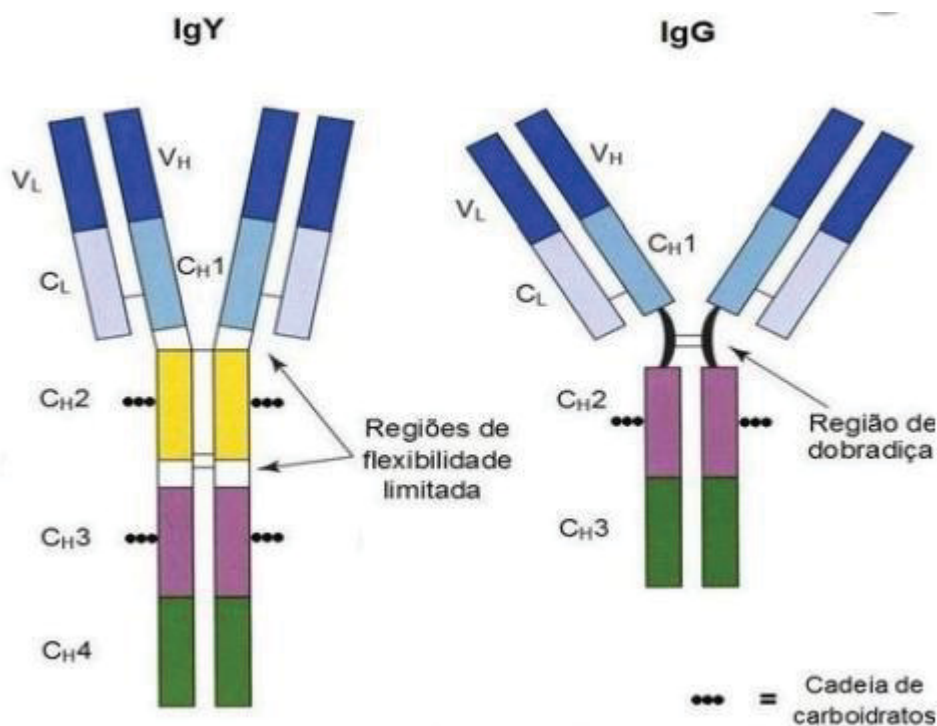
## 2.6 IMUNOGLOBULINAS Y

Imunoglobulinas são proteínas que atuam como componentes críticos da resposta imunológica humoral. Quando expressas nas superfícies dos linfócitos B em repouso, agem como receptores que são capazes de detectar e distinguir uma grande variedade de antígenos (SOBH; BONILLA, 2016).

As imunoglobulinas Y são produzidas por galinhas e outras aves, répteis e anfíbios. A imunoglobulina Y (IgY) é o equivalente funcional da imunoglobulina G (IgG) em mamíferos e é transferido para a gema do ovo para proteger passivamente o pintinho em desenvolvimento. O IgY era denominado IgG devido à suposta semelhança entre as duas imunoglobulinas, como mostra a Figura 2. No entanto, Leslie & Clem enfatizaram as diferenças entre IgY e IgG, como diferenças antigênicas e o tamanho principal da cadeia pesada de IgY, sugerindo a nova denominação (PEREIRA et al., 2019a). O peso molecular de IgY é de cerca de 180 kDa e é ligeiramente maior do que IgG (150 kDa), pois a cadeia pesada de IgY tem um domínio constante adicional e maiores quantidades de carboidratos (Finlay et al., 2017).

Em mamíferos são conhecidas cinco classes de imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, classificadas de acordo com suas cadeias pesadas. Nas galinhas três classes foram identificadas: IgM, IgA, homólogas às provenientes de mamíferos e circulantes no sangue e em secreções corporais, e IgY, encontrada no soro e transferida para as gemas dos ovos por meio de receptores específicos, presentes no folículo ovariano em formação, conferindo imunidade passiva para embriões e neonatos (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS IMUNOGLOBULINAS Y E IMUGLOBULINA G.



Fonte: CORREIA NETO, 2020.

A IgY é a única classe de imunoglobulinas encontrada nas gemas de ovos. As células linfocitárias responsáveis pela produção dos anticorpos nas galinhas estão associadas principalmente com a Bursa de Fabricius e o baço. A Bursa de Fabricius, órgão linfóide exclusivo das aves, desempenha funções essenciais no desenvolvimento dos linfócitos B, os seus homólogos nos mamíferos são a medula óssea e as placas de Peyer (TIZARD, 2009; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012; FARIA, L. S. D. 2017).

Existem várias vantagens em usar galinhas para a produção de anticorpos, especialmente quando se considera a produção de anticorpos para aplicações em imunoterapia passiva. As galinhas representam fonte mais econômica para a produção de grandes quantidades de anticorpos específicos (Schade et al., 2007). Com base no peso do anticorpo produzido por animal Nakai et al. (1994) estimaram que a produtividade de anticorpos da gema era

quase 18 vezes maior do que a produzida em coelhos. A produção de IgY em galinhas tem como vantagem ser menos invasiva, exigindo apenas a coleta de ovos em comparação com a coleta de sangue em mamíferos (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). Os IgYs são altamente estáveis em pH 4-9 e a temperatura de até 65 °C em condições aquosas. Retêm a atividade de ligação ao antígeno na presença de pepsina em pH 4-6. Essas características os tornam candidatos muito bons para a maioria dos tipos de processamento e aplicações (ABBAS et al., 2019).

Outra vantagem que tem a produção de IgY para imunização passiva é que as diferenças genéticas entre galinhas e mamíferos tornam possível a produção de anticorpos contra proteínas de mamíferos altamente conservadas, o que não seria possível em mamíferos. Ainda é menor a quantidade de antígenos necessária para produzir uma resposta imune eficiente. Da mesma forma, os anticorpos IgY reconhecem epítomos diferentes dos anticorpos de mamíferos, resultando em um repertório de anticorpos (LARSSON; CARLANDER; WILHELMSSON, 1998).

Em contraste com o soro de mamífero, no ovo a gema contém apenas uma única classe de anticorpo (IgY), e pode ser isolado por técnicas de precipitação. Além disso, as IgY não ativam o sistema complemento de mamíferos e não interagem com receptores Fc de mamíferos que poderiam mediar uma resposta inflamatória. Em tempos de pandemia a imunização de galinhas, coleta e processamento automatizado de ovos se torna interessante, pois torna viável a produção em larga escala de IgY (CARLANDER et al., 2000).

Dentre as propriedades dos anticorpos IgY estudadas estão atividades antivirais, antialérgicas, antiobesidade, antitumoral, antiparasitária, antifúngica (PEREIRA et al., 2019a). Acredita-se que o IgY atue ligando-se às bactérias ou vírus, levando à sua eliminação através do intestino e prevenindo a replicação bacteriana ou a disseminação do vírus. Em alguns casos, a imunização passiva com anticorpos IgY tem início de ação rápido e local e pode ser administrada a pacientes com infecção ativa, a IgY pode ser utilizada

também como alimento funcional aplicada no tratamento e profilaxia de diferentes doenças. Pode ser usado em resposta imune imatura ou prejudicada, como bebês e adultos imunocomprometidos (XU et al., 2011).

IgY é eficaz contra uma série de patógenos que causam doenças humanas, tanto em estudos *in vitro* e em animais de laboratório. Uma das aplicações clínicas de maior sucesso de IgY tem sido na prevenção da colonização de *Pseudomonas aeruginosa* nas vias aéreas de pacientes com fibrose cística (FC). Em 2008 foi concedido o status de medicamento órfão a anticorpo IgY contra *Pseudomonas aeruginosa* para o tratamento de fibrose cística, pela Agência Europeia de Medicamentos (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

Em relação a proteção antiviral o efeito protetor da IgY foi amplamente estudada contra a influenza. IgY contra o vírus da influenza aviária A (H5N1) foram extraídos de ovos disponíveis em supermercados do Vietnã, pois a vacinação de galinhas contra o vírus H5N1 é obrigatória. O IgY anti-H5N1 foi administrado por via intranasal em camundongos antes e após sua infecção com H5N1 e H5N2 e preveniu completamente o início da doença. Resultados interessantes que revelam que os ovos comercialmente disponíveis, em países onde a vacinação anti-H5N1 é obrigatória são uma fonte disponível de IgY que poderia ser usada para prevenir uma potencial pandemia de H5N1 (PEREIRA et al., 2019b).

O uso potencial de IgY contra fatores nutricionais e doenças metabólicas, como hipercolesterolemia, obesidade, e doença celíaca, também foi investigada. O pedido de patente WO2011155705 descreve uma composição de IgY contra sequências de uma proteína de transporte de colesterol conhecida como NiemannPick C1-Like 1 (LEIVA et al., 2020). A profilaxia para doença celíaca, foi demonstrado por Gujral et al. (2012) que desenvolveram uma fórmula em pó de gema de ovo com açúcares protetores contendo IgY anti-gliadina. Essa fórmula neutralizou *in vitro* tanto a gliadina isolada quanto a presente nos alimentos matriz e inibiu sua absorção intestinal

em camundongos, mostrando-se promissora para a prevenção da doença celíaca (GUJRAL et al., 2012).

A capacidade do IgY de detectar patógenos virais em humanos e animais também torna interessante o seu uso para diagnósticos. IgY específicos contra a proteína E2 do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) foram utilizadas em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e imunocromatografias, e demonstraram alta sensibilidade e especificidade. A revisão de Pereira et. al, 2019, apresenta de forma detalhada as aplicações das IgY tanto como imunoterapias e também em diagnósticos.

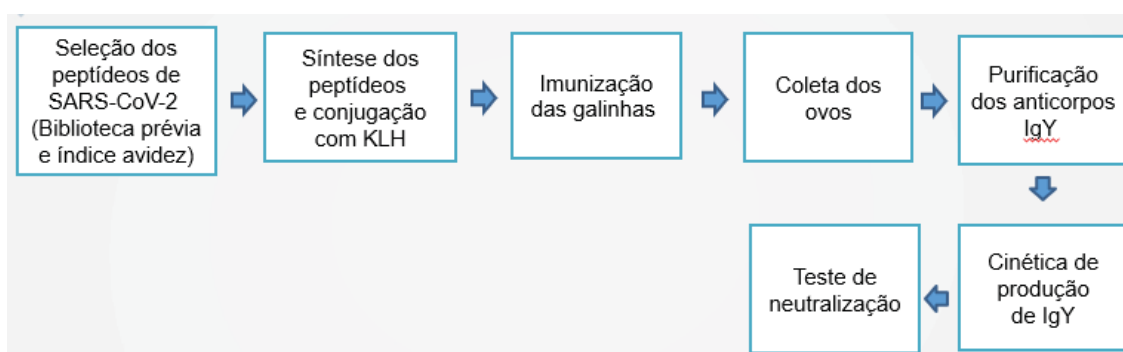
No que diz respeito às síndromes respiratórias agudas, uma nova imunoglobulina anti-S1 MERS-CoV IgY, não só foi capaz de reconhecer e neutralizar os antígenos MERS-CoV em estudos de células, mas também reduziu a expressão do antígeno viral e inflamação marcadores no tecido pulmonar em modelo de camundongo (DA SILVA; DEODATO; VILLAR, 2021). Diante da pandemia da COVID-19, a imunoglobulina Y também se destacou como possível ferramenta na prevenção e controle. Um estudo recente avaliado por um em ensaio in vitro mostrou que os anticorpos de gema de ovo obtidos a partir de imunização de aves com proteína spike do SARS-CoV-2 seria capaz de bloquear o ligação do vírus ao receptor humano ACE-2 (WEI et al., 2021).



### 3 METODOLOGIA

O fluxograma (Figura 3) foi construído para melhor compreensão das etapas realizadas no presente trabalho.

FIGURA 3. ETAPAS DO DESENVOLVIDAS NO PRESENTE TRABALHO



Fonte: A autora (2022)

#### 3.1 SELEÇÃO E SÍNTESE DE PEPTÍDEOS SOLÚVEIS

Os peptídeos foram selecionados e engenheirados por meio de técnicas *in silico*. Posteriormente foram sintetizados quimicamente em equipamento automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments). A técnica de síntese usada foi em suporte sólido usando aminoácidos com grupos de proteção Fmoc, para conferir hidrofiliabilidade e permitir a conjugação com o carreador foi adicionada a sequência KKG na porção N-terminal. Após síntese, estes foram purificados com solvente éter terc-butil-metil e quantificados utilizando kit Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) conforme instruções do fabricante.

Os peptídeos foram congelados, em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , em frascos de vidro cobertos com filme PVC durante 4 horas. Após o congelamento, as tampas dos frascos foram perfuradas com agulha perfuro cortante e o conteúdo foi liofilizado

à temperatura de -45°C durante 24 horas ou até pressão constante e inferior a 50 mbar. Foram armazenados em freezer -20°C.

### 3.2 TESTE DE AVIDEZ PARA OS PEPTÍDEOS PRODUZIDOS

Para selecionar os melhores peptídeos para serem usados na imunização das aves e consequente produção de IgY, foi realizado um teste de ELISA de avidéz, utilizando ureia 6 M para avaliar a força de interação dos peptídeos com os anticorpos. Para realização dos testes ELISA, placas de 96 poços com fundo em U foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,159%,  $\text{NaHCO}_3$  0,293%, pH 9,6), sendo 20 ng/poço para os peptídeos 137, 203, 309 e 366 e 60 ng/poço para o peptídeo 132. No total foram avaliados cinco peptídeos independentemente.

As placas para a realização do teste ELISA foram incubadas e armazenadas a 4°C overnight. Em seguida foram lavadas com solução de lavagem (NaCl 0,9%, Tween 20 0,05%), e realizado o bloqueio das placas com 100 µL de solução de bloqueio (BSA 3% em PBS) para os peptídeos 137, 203, 309 e 366 e para o peptídeo 132 solução de bloqueio (BSA 5% em PBS). As placas foram então incubadas a 37°C por 60 minutos. Após 4 novas lavagens foram realizadas e adicionados, em cada poço, 100 µL de soro de indivíduos positivos para COVID19, testados nas diluições de 1:100 e 1:200, seguido de nova incubação a 37°C por 60 minutos.

Após quatro lavagens, foi adicionado 100 µL/poço de uma solução de Ureia 6 M por 15 minutos, seguido de nova lavagem, e adicionados 100 µL de conjugado anti-IgG de coelho diluído 1:12.500 para os peptídeos 137, 203, 309 e 366 e 1:10.000 para o peptídeo 132. A incubação foi realizada a 37°C por 60 minutos. Após nova lavagem, 100 µL de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), solução cromógena foi adicionada e as placas incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação de formação de cor foi

interrompida com a adição de 20  $\mu$ L de solução de parada (HCl 5N). Finalmente, a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Os valores de índice avidéz são determinados como baixo índice avidéz (IA < 40%) e alto (IA > 60%) avidéz (Lopes, 2018).

### 3.3 CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS COM PROTEÍNA CARREADORA

Os peptídeos foram sintetizados acrescidos da sequência KKG e foram conjugados à proteína carreadora KLH. As etapas de conjugação à proteína carreadora seguiram protocolo de Carter (1996). Os peptídeos e proteína carreadora KLH foram dissolvidos em 2 mL de PBS, após 2 minutos foi adicionado Gluteraldeído (0,02M) gota a gota homogeneizando. Após uma hora adicionar Glicina 1M e manter agitação durante 4h em temperatura ambiente. Alíquotas de cada peptídeo foram estocadas a -20°C até o uso.

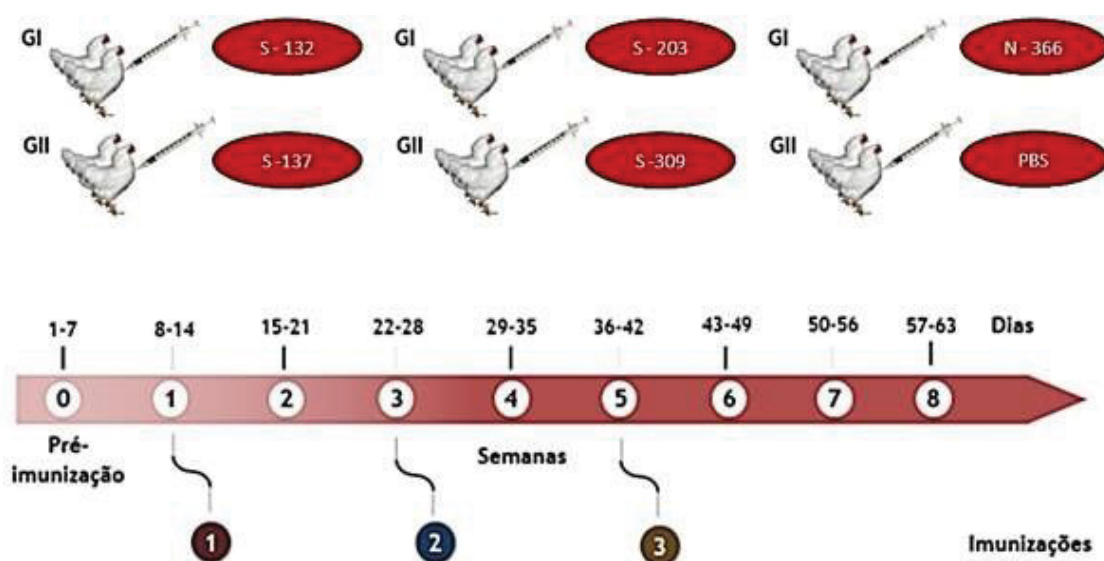
### 3.4 MODELO ANIMAL

O modelo animal utilizado para a produção de IgY foram galinhas de postura com 22 semanas de idade pertencentes às linhagens Label rouje e Embrapa 51. Seis grupos de dois animais foram formados: um grupo para controle negativo e cinco grupos correspondendo a cada o peptídeo. O projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, sob protocolo 053/2020.

### 3.5 IMUNIZAÇÃO

Os animais foram imunizados, por via intramuscular, com o inóculo de peptídeo-KLH e adjuvante incompleto de Freund (Figura 4). Cada animal recebeu um total de 100 µg do imunógeno. Foram realizadas três imunizações quinzenais idênticas (Figura 4). Duas semanas após a última imunização, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical com anestesia usando Cetamina (50 mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg).

FIGURA 4. ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO DE GALINHAS COM OS PEPTÍDEOS ANTIGÊNICOS DERIVADOS DA PROTEÍNA S E N DE SARS-COV-2.



Fonte: A autora (2022)

### 3.6 COLETA DOS OVOS

Todos os ovos coletados foram identificados com caneta na sua casca, de acordo com o grupo. Também foram marcados o nome do antígeno e data da coleta. Após a imunização primária, as coletas foram feitas diariamente até o 45º dia dos experimentos. Os ovos coletados foram organizados em cartelas de papelão próprias, separados por grupo. Para a melhor conservação e facilitar a manipulação dos ovos, as cartelas de papelão foram armazenadas a 4 °C, ficando dispostas de acordo com a semana de coleta.

### 3.7 ARMAZENAMENTO DAS GEMAS PURAS

Para permitir a estocagem prolongada, foi feito o congelamento das gemas puras. Inicialmente, as cascas dos ovos foram limpas com álcool 70%. Em seguida, foi feita uma abertura na casca utilizando a ponta de um bisturi. Na sequência, a clara foi gentilmente escorrida para separá-la da gema. As gemas intactas foram depositadas sobre folhas de papel toalha e lavadas abundantemente, com jatos fracos de PBS pH 7,2, para a remoção de resíduos de albúmen sem romper a membrana vitelínica. Após a secagem do excesso de PBS, a membrana vitelínica foi incidida e o conteúdo foi vertido em proveta para mensuração do volume recuperado. Finalmente, a gema foi depositada em tubos plásticos, de fundo cônico, com tampa e armazenados a -20 °C, até a utilização.

As gemas dos ovos, correspondentes à coleta de uma semana de cada grupo, foram reunidas em um mesmo tubo para formar um pool semanal de gemas (Figura 5).

FIGURA 5. OBTENÇÃO, HIGIENIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS GEMAS.



Fonte: A Autora (2022)

### 3.8 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS IGY TOTAIS

#### 3.8.1 Remoção da fração rica em lipídeos da gema

A remoção da grande quantidade de lipídeos presentes na gema precedeu as demais etapas de purificação de anticorpos IgY policlonais totais. A deslipidização da gema foi realizada segundo o método descrito por Akita & Nakai (1993). Inicialmente, os frascos cônicos contendo a gema congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , foram descongelados lentamente a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após esta etapa de descongelamento lento a gema apresentou-se na forma sólida, foi homogeneizada com água ultrapura, previamente ajustada para a faixa de pH 5,0-5,2 com ácido clorídrico (HCl) 0,1N, na proporção 1:9. Dessa forma, 1 g do pool de gemas para 9 mL da água acidificada. Essa mistura foi mantida sob agitação vigorosa, por 30 minutos a temperatura ambiente. Ao final, o pH foi aferido e ajustado para a faixa entre 5,0-5,2 com HCl 0,1N. Essa mistura foi mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight, e na sequência, o homogeneizado foi descongelado lentamente a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após o descongelamento lento, a mistura foi centrifugada a  $10.000 \times g$  por 25 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O precipitado foi descartado, enquanto o sobrenadante, preferencialmente translúcido, foi ajustado para a faixa de pH entre 7,0-7,2 por meio da adição de PBS 10 vezes concentrado.

### 3.8.2 Precipitação dos anticorpos IgY totais

O sobrenadante translúcido foi utilizado para a precipitação dos anticorpos IgY totais, de acordo com o protocolo descrito por Akita & Nakai (1993). Após verificar o volume total de sobrenadante foi adicionado, sob agitação lenta e constante, sulfato de sódio até a concentração final de 19% (m/v). A mistura foi mantida sob agitação por duas horas a temperatura ambiente. Em seguida, a solução de proteína foi centrifugada a 10.000 x g por 25 minutos a 4 °C. Nessa etapa o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi reservado e ressuspenso em PBS (pH 7,2), da seguinte forma: para cada 1g de gema pura utilizada para a purificação, empregou-se 1 mL de solução tampão para a solubilização do precipitado. Na sequência, a solução de proteínas foi submetida à diálise, contra tampão PBS (pH 7,2) durante 48 horas a 4 °C, para remoção dos resíduos de sulfato de sódio presentes na amostra. A concentração proteica da solução de anticorpos foi mensurada utilizando-se o reagente de Bradford segundo indicação do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda igual a 590 nm. As alíquotas da solução de anticorpos IgY foram armazenadas a -20 °C até o uso.

### 3.9 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As avaliações dos processos de fracionamento e purificação dos anticorpos IgY foram realizadas por meio de eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), sob condições redutoras. Inicialmente, alíquotas de 5 µg das amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM [pH 6,8] + SDS 4% + azul de bromofenol 0,2% + glicerol 20%) com acréscimo de 2-mercaptoetanol 5% (Sigma-Aldrich, EUA). A avaliação da purificação dos anticorpos IgY totais foi realizada por meio de eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), segundo protocolo de Ferreira Júnior (2012). Alíquotas de 10 µg de proteína foram resolvidas em géis de concentração 8%

(tampão Tris-HCl 0,375M [pH 8,8]; Dodecil- sulfato de sódio [SDS] 0,1%, EDTA 2 mM; acrilamida/bisacrilamida [29:1], Tetrametiletilenediamino [TEMED] 0,125%; persulfato de amônio [APS] 0,125%). A eletroforese foi conduzida utilizando-se sistema SE 250 Mini Gel (GE Healthcare) e aplicando corrente de 25 mA/gel. Para identificação da massa molecular aparente das proteínas, utilizou-se o marcador de (BenchMark™ Protein Ladder). As bandas proteicas foram visualizadas por meio da coloração dos géis com Coomassie Brilliant blue 250R (Sigma).

### 3.10 ELISA INDIRETO

A cinética da produção dos anticorpos IgY policlonais em galinhas foi determinada por meio de teste ELISA indireto para cada peptídeo. Placas de poliestireno, com fundo em U, foram sensibilizadas com antígeno em tampão carbonato 0,06M, pH 9,2. O bloqueio foi realizado com BSA variando a concentração de 3 a 5% (Sigma) em PBS (PBS-BSA). Os anticorpos IgY totais foram diluídos em tampão de incubação e incubados por 1 h à 37°C. O conjugado anti IgY foi diluído em tampão incubação em condições de 1:10.000, e a placa foi revelada com TMB por 45 minutos, e a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N para parar a reação. A leitura foi feita em leitor de placas a 450 nm.

### 3.11 ELISA DE AVIDEZ

A maturação de avides dos anticorpos IgY anti-SARS-CoV-2 foi realizada pelo tratamento dos imunocomplexos com uréia 6M, seguida pela determinação da reatividade residual por meio de teste ELISA indireto. Após a etapa de incubação dos anticorpos IgY totais, metade dos poços foi incubada com 100 µL de uma solução de uréia 6M em PBS (pH 7,2) e a outra metade com PBS (pH 7,2), por 10 minutos a 37°C. Na sequência, as placas foram lavadas em seis



ciclos com PBS-T. A detecção da atividade residual foi realizada pela incubação dos anticorpos IgY com anticorpos anti-IgY conjugados com peroxidase (Sigma), na diluição 1:10.000, por 60 minutos a 37°C. A reação foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. O índice avidéz foi obtido da relação da equação 1, onde valores acima de 50% são considerados alta avidéz, entre 50 e 60% média avidéz, a abaixo de 50% baixa avidéz.

$$\frac{Abs U^+}{Abs U^-} 100$$

Onde:

Abs U<sup>+</sup> : Média das amostras tratadas com ureia.

Abs U<sup>-</sup> : Média das amostras sem ureia.

### 3.12 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO

O ensaio de neutralização viral foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina sob orientação do doutor André Bafica, no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Inicialmente realizou-se diluições seriadas (1:25; 1:50; 1:100) das IgY purificadas em placa de cultura celular de 96 poços em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM previamente esterilizado). Um volume de 50 µL de anticorpo diluído foi incubado com 50 µL de pseudovírus de SARS-CoV-2 por 1 hora a 37°C. Em seguida foram adicionadas 20.000 células HEK293T/ACE2 em 100 µL em cada poço. E foram incubadas por 48h também a 37°C.

Após o período de incubação, foram preparados os reagentes ONE-Glo e Nano DLR Stop&Glo conforme indicado pelo fabricante (Promega cat number: N1630). As células foram retiradas da incubadora e deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida o meio de cultura das células foi descartado e 50 µL de meio foi adicionado em cada poço. Adicionou-se 50 µL/

poço de ONE-Glo e incubou-se com agitação por três minutos, na etapa seguinte 50 µL/ poço de Nano DLR Stop&Glo foi adicionado, homogeneizado e incubado por 10 minutos. A leitura foi realizada em luminômetro (0,5 segundos - tempo de integração) (DIAS, G. 2021).

## 4 RESULTADOS

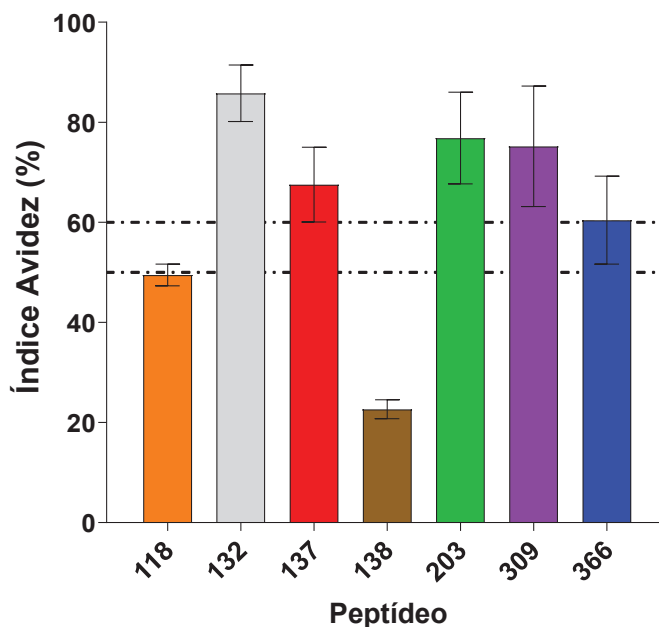
### 4.1 SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE SARS-COV-2

Para triagem de peptídeos candidatos foram selecionados peptídeos da proteína spike por análise in silico. Destes os que apresentaram maiores escores foram sintetizados em membrana (316 peptídeos), baseados na sequência da proteína Spike (S) de SARS-CoV-2. Os peptídeos imunorreativos foram selecionados pela técnica de SPOT-Synthesis e a sororreatividade foi confirmada por teste ELISA indireto. Do total de peptídeos sintetizados, 14 apresentaram reatividade para a Imunoglobulina G (IgG) em amostra de soro de indivíduos que tiveram COVID-19. Adicionalmente, foram sintetizados quimicamente 15 peptídeos da proteína de nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2, sendo que um deles apresentou alta reatividade aos soros positivos (para detalhes ver Santiani, 2021).

### 4.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) INDIRETO DE AVIDEZ

A triagem e seleção dos antígenos para imunização foi feita por teste de ELISA avides para IgG a fim de selecionar aqueles que induzem anticorpos de alta avides. Dos 15 peptídeos inicialmente selecionados, somente 5 apresentaram Índice avides maior que 60% (Figura 6) e foram utilizados para imunização experimental dos animais.

FIGURA 6. ÍNDICE DE AVIDEZ DEMONSTRADO PELOS PEPTÍDEOS FRENTE A SORO DE PACIENTES INFECTADOS POR SARS-COV-2.



Fonte: A autora (2022).

#### 4.3 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS E COLETA DOS OVOS

A imunização das galinhas não induziu processo inflamatório nos locais de aplicação dos antígenos sintetizados para este experimento (Figura 7). O tempo de acompanhamento dos experimentos de imunização foi de 45 dias.

A postura das aves imunizadas com os peptídeos 203, 366 e as do grupo controle produziram ovos em todas as semanas dos experimentos. Por outro lado, as galinhas dos grupos imunizados com os peptídeos 137, 132, 309 não produziram ovos em todas as semanas. A queda de postura, dessas galinhas, representou uma redução de 20 ovos. Os produtos das coletas foram mensurados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo aproximadamente 15 g/ovo.

FIGURA 7. IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR COM PEPTÍDEOS SELECIONADOS, ONDE NÃO APRESENTARAM LESÕES NEM SINAIS DE INFLAMAÇÕES NOS LOCAIS DE APLICAÇÃO.

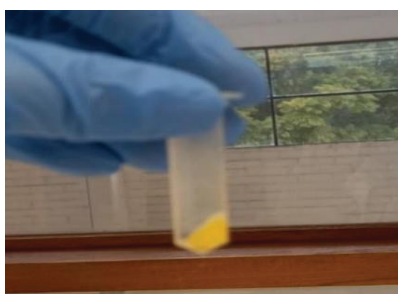


Fonte: A autora (2022)

#### 4.4 PURIFICAÇÃO DE IGY PRODUZIDAS EM GALINHAS CONTRA PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DE SARS-COV-2 SELECIONADOS IN SILICO

A deslipidização das gemas produziu, após a centrifugação, um precipitado de cor amarela (Figura 8), rico em lipídeos e um sobrenadante translúcido livre de lipídeos. Na sequência, a adição de sulfato de sódio ao sobrenadante até a concentração de 19%, levou à precipitação dos anticorpos IgY totais. Após a centrifugação foi obtido um precipitado de cor branca, enriquecido nos anticorpos IgY totais. O sobrenadante contendo outras proteínas do ovo foi descartado.

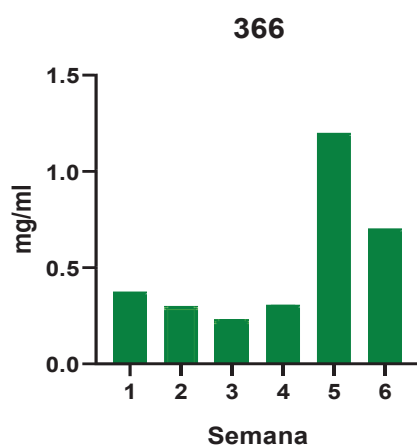
FIGURA 8. PRECIPITADO E SOBRENADANTE DA ETAPA DE DESLIPIDIZAÇÃO, QUE SEGUIU PARA PRECIPITAÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS IGY PURIFICADOS.



Fonte: A autora (2022).

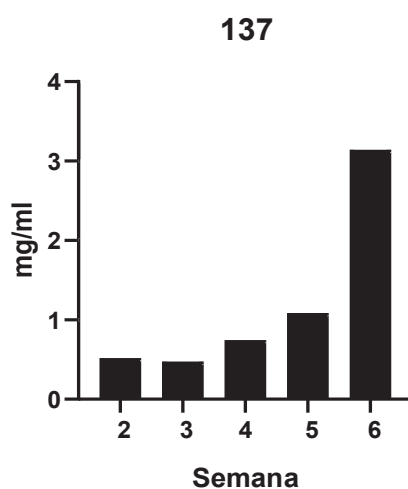
A quantificação da concentração proteica do produto purificado variou de 0,10 a 3,1 mg/mL. Os resultados estão apresentados em gráficos individuais por grupo nas Figuras 9 a 12. O grupo de animais controle negativos da primeira a sexta semana apresentou respectivamente 1,65 mg/mL, 1,18mg/mL, 0,318 mg/mL, 0,298 mg/mL 0,22 mg/mL e 0,37 mg/mL. O gráfico da Figura 9 apresenta a quantificação após filtração em membrana de 0,22 micras, o que resulta em perda de proteína.

FIGURA 9. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS ANTICORPOS IGY 366



Fonte: A autora (2022)

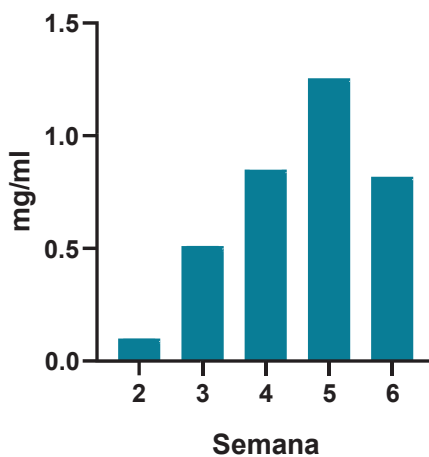
FIGURA 10. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS ANTICORPOS IGY 137



Fonte: A autora (2022)

FIGURA 11. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS ANTICORPOS IGY 309

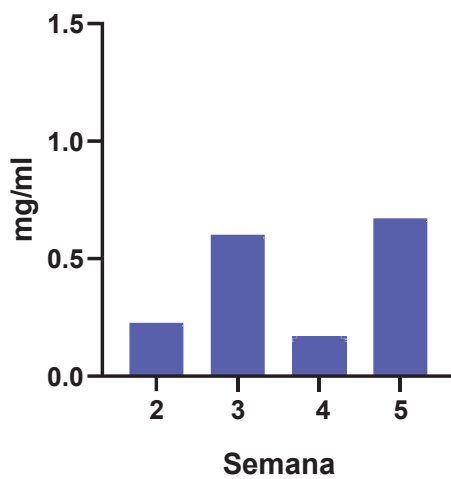
309



Fonte: A autora (2022)

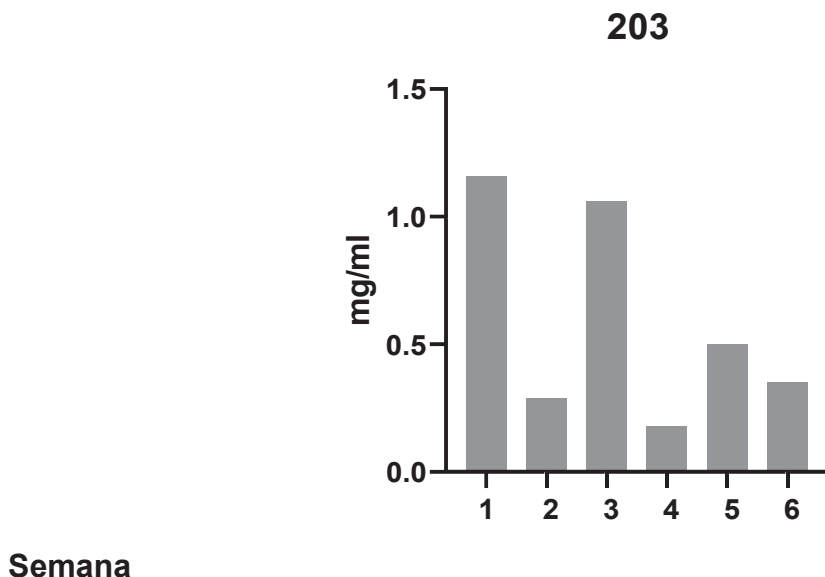
FIGURA 12. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS ANTICORPOS IGY 132

132



Fonte: A autora (2022)

FIGURA 13. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS ANTICORPOS IGY 203



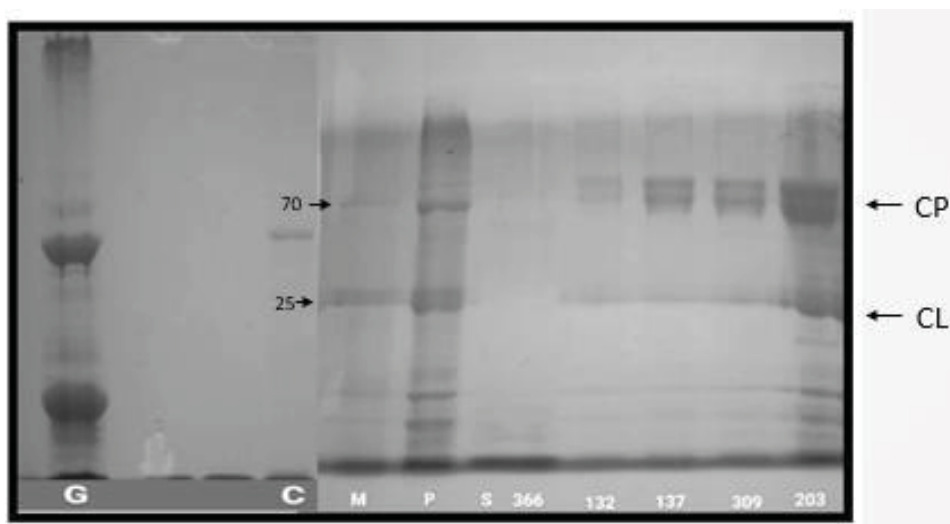
Fonte: A autora (2022)

#### 4.5 PURIFICAÇÃO DAS IGY: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A massa molecular da IgY é de cerca de 180 kDa. O tratamento das amostras com 2- mercaptoetanol 5% fez com que as pontes de dissulfeto entre as cadeias dos anticorpos IgY se quebrassem, permitindo, assim, a comprovação da presença das cadeias pesadas (70 kDa) e leves (22-24 kDa) apresentadas no gel da Figura 14.



FIGURA 14. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) MOSTRANDO A PURIFICAÇÃO DA IGY DE OVOS DE GALINHA CONTRA PEPTÍDEOS SINTÉTICOS



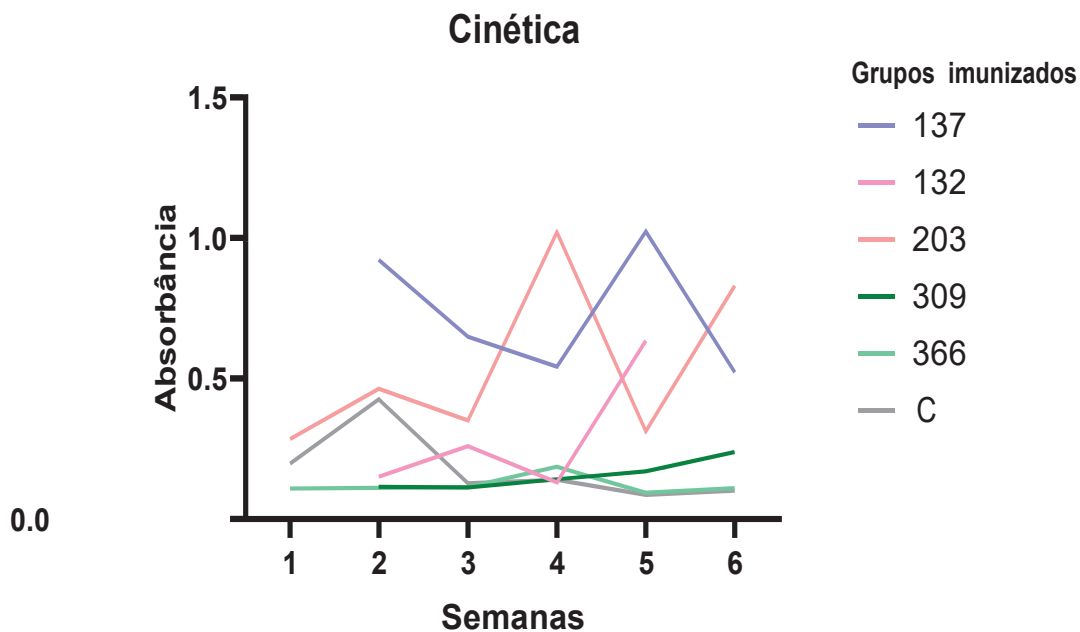
G: gema; C: controle; M: marcador; P: precipitado pós centrifugação; S: sobrenadante pós precipitação e centrifugação; 366, 132, 137, 309, 203: anticorpos IgY purificados.

Fonte: A autora (2022)

#### 4.6 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS

A cinética da produção dos anticorpos IgY policlonais anti-SARS-CoV-2 foi determinada por meio de teste ELISA indireto. As quantidades de anticorpos IgY transferidos para gema do ovo não apresentaram crescimento linear com o decorrer das imunizações em certos grupos de animais. Os anticorpos do grupo de animais imunizados com o peptídeo 203 apresentaram pico de produção na quarta semana, queda na quinta e voltou a crescer pós o último *booster*. O peptídeo 137 apresentou queda da concentração de imunoglobulinas na segunda e terceira semanas, atingiu o pico na quarta e posteriormente queda. Os animais imunizados com o peptídeo 132 apresentaram pico de produção de IgY na quinta semana e após isso não houve mais produção de ovos. Os grupos de animais imunizados com os peptídeos 309 e 366 apresentaram menor título de anticorpos em comparação aos demais. A Figura 15 demonstra os resultados da cinética de produção de anticorpos contra SARS-CoV-2.

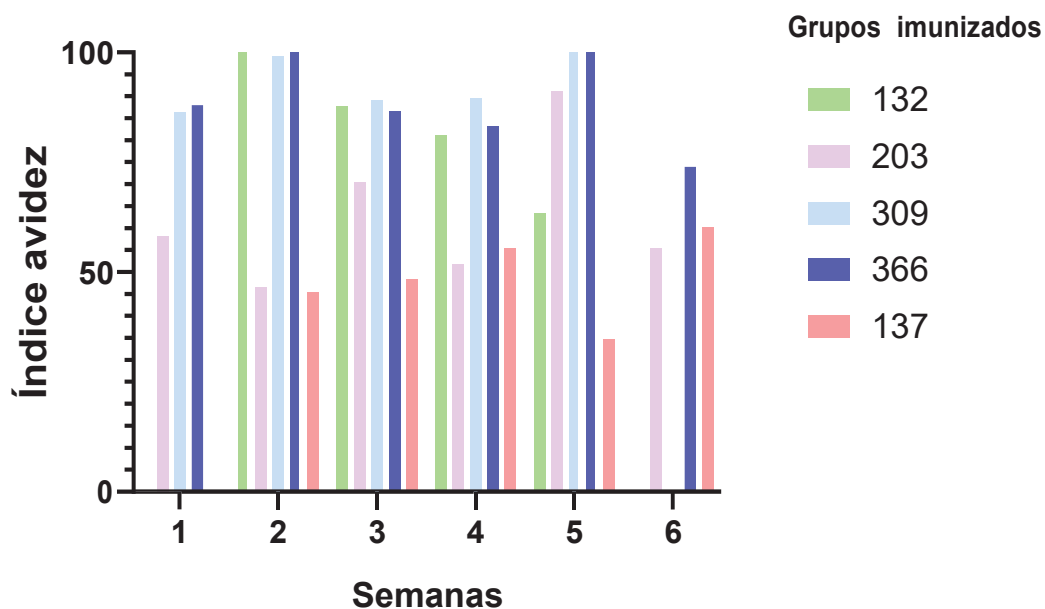
FIGURA 15. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY CONTRA SARS-COV-2.



Fonte: A autora (2022)

A Figura 16 apresenta os resultados da maturação da avidéz dos anticorpos por semana de experimento, os grupos 137 e 203 apresentaram índice avidéz mais baixo em algumas semanas, enquanto os grupos 132, 309 e 366 apresentaram anticorpos de alta avidéz em todos os períodos avaliados.

FIGURA 16. GRÁFICO ÍNDICE AVIDEZ DOS ANTICORPOS CONTRA O SARS-COV-2 PRODUZIDOS EM GALINHAS.

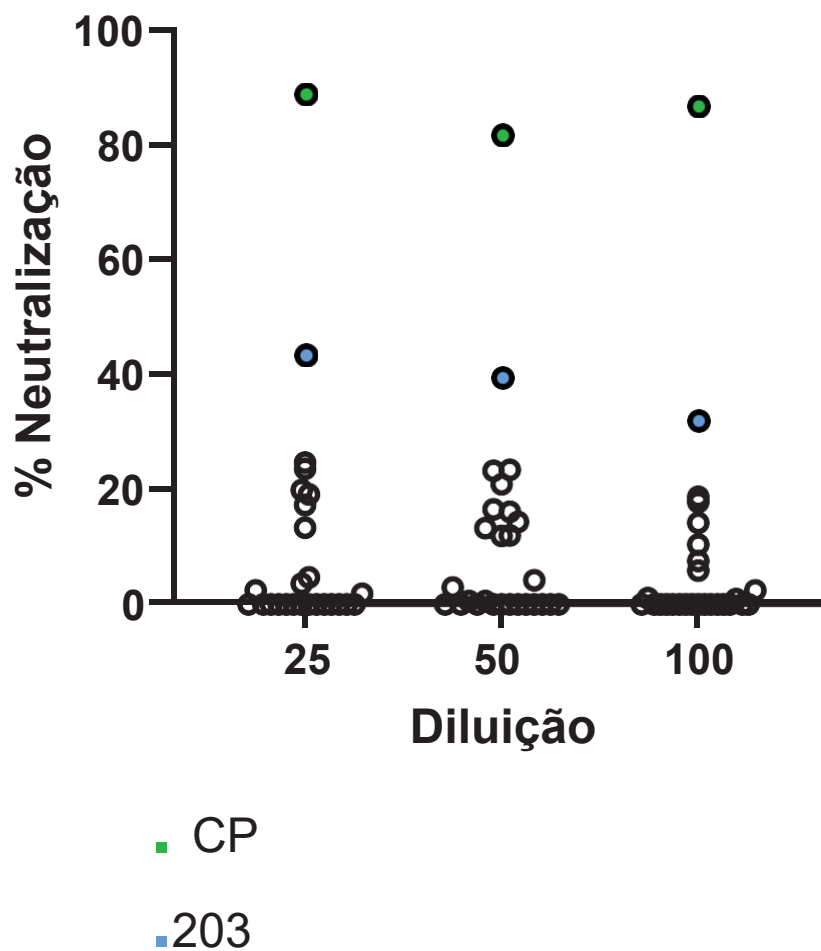


Fonte: A autora (2022)

#### 4.7 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL

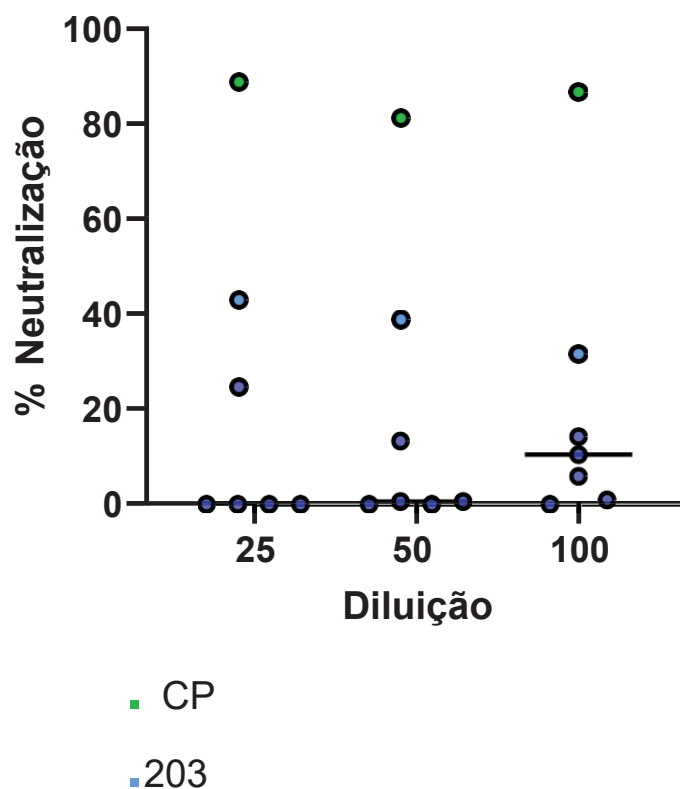
No ensaio de neutralização com pseudovírus da proteína S do SARS-CoV-2, os anticorpos contra o peptídeo 203 apresentaram o melhor resultado, sendo capazes de neutralizar 38% do vírus na quinta semana e de 42% na sexta semana do experimento. Os demais anticorpos apresentaram níveis de neutralização abaixo de 20%. Os resultados estão apresentados na Figura 17 e 18 e no Apêndice (Tabela 1) com todos os percentuais e diluições.

FIGURA 17. Gráfico de neutralização dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 produzidos em galinhas, onde CP é o controle positivo do teste, e 203 os anticorpos IgY purificados e os demais pontos são os demais anticorpos avaliados.



Fonte: A autora (2022)

FIGURA 18. Gráfico de neutralização dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 do grupo 203, produzidos em galinhas, purificados, em diluições de 1:25, 1:50 e 1:100, onde CP é o controle positivo do teste. Sendo os pontos em destaque das semanas 1,5 e 6.



Fonte: A autora (2022)

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ELISA INDIRETO DE AVIDEZ

A avaliação da avidéz dos peptídeos foi realizada para verificar a força de interação entre antígeno anticorpo com um agente dissociante, como a ureia. Os cinco peptídeos selecionados para imunização de galinhas e produção de anticorpos policlonais apresentam alto índice de avidéz, o que indica fortes ligações do complexo antígeno-anticorpo. Pois com a adição de ureia ocorreu quebra de ligações fracas ou de anticorpos de baixa avidéz. O índice avidéz é considerado alto quando é igual ou superior a 60,0% (Lopes, 2018). Ferreira Junior (2012) avaliou a avidéz dos os anticorpos IgY anti-STAg do 21° dia pós-imunização primária retiveram 70% da reatividade, na sequência, houve uma redução para 50% no dia 28. Após o segundo booster (28° dia pós-imunização primária) o IA retornou ao valor de 70% no 35° dia, manteve-se assim até o 42° dia e seguiu-se uma elevação para 90%. Anticorpos IgY podem desenvolver, precocemente, a maturação da avidéz, logo após a resposta imune primária (FERREIRA JUNIOR, 2012).

### 5.2 MODELO ANIMAL PARA IMUNIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens de galinhas poedeiras, Label Rouje e Embrapa 51 para produzir anticorpos policlonais anti SARS-CoV-2. Chalghoumi et al. (2008) utilizaram galinhas *Isa Brown* para a produção de anticorpos IgY policlonais contra antígenos de *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium* com adjuvante incompleto de Freund, e obtiveram simultaneamente anticorpos contra os dois antígenos. No mesmo estudo, constatou-se que a utilização de adjuvante Freund não resultou em lesões no local das inoculações. No presente estudo também foi utilizado adjuvante incompleto de Freund, sem nenhuma lesão nos locais de inoculação. Ferreira Júnior (2012) imunizou

galinhas da linhagem *Isa Brown* com STAg mais adjuvante completo de Freund (ACF) e obteve de 4 mg/mL de gema pura. Na purificação dos anticorpos IgY, utilizou-se água acidificada para retirar a fração rica em lipídeos, e em seguida o sulfato de sódio para a precipitação dos anticorpos IgY. Em estudo anterior, Ma e Zhang (2010) imunizaram galinhas com lipopolissacarídeo (LPS) emulsionado com adjuvante incompleto de Freund, e realizaram a extração dos anticorpos IgY através de água acidificada e sulfato de sódio e obtiveram 8,5 mg/mL de gema. Aqui, a quantificação proteica dos anticorpos IgY após purificação variaram de 0,5 mg/ml a 3,1 mg/mL.

### 5.3 EFEITOS COLATERAIS DA IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS

Normalmente, a capacidade de postura da galinha é pouco afetada pela injeção do antígeno (SCHADE et al., 2005; de PAULA et al., 2011; MATHEIS; SCHADE, 2011). Por outro lado, alguns autores relatam um efeito colateral frequente em galinhas, que é a queda transitória na produção de ovos durante o período de imunizações e também reações inflamatórias locais (HATTA et al., 1993; SCHWARZKOPF; THIELE, 1996; CHALGHOUMI et al., 2008). Nesse estudo houve queda na produção de ovos nos grupos imunizados com os peptídeos 137, 132, 309, mas nenhum animal apresentou sinais de inflamação especialmente no local das injeções.

### 5.4 PURIFICAÇÃO DE IGY

Existem diferentes métodos para purificação de imunoglobulinas da gema de ovos. Os principais são: precipitação envolvendo sulfato de amônio ou sulfato

de sódio, polietilenoglicol (PEG), Métodos cromatográficos: cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de gel filtração e ultrafiltração. Técnicas essas que se mostraram eficientes para a purificação da IgY (CORREIA NETO, 2020). Nesse estudo o método utilizado foi o de precipitação com sulfato de sódio, método simples e eficiente de purificação da IgY.

### 5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS IGY ANTI SARS-COV-2

No presente estudo, a concentração proteica máxima de anticorpos IgY totais, das galinhas imunizadas com os antígenos peptídicos mais adjuvante incompleto de Freund, foi de 3,1 mg/mL. Na purificação dos anticorpos IgY, utilizou-se água acidificada para retirar a fração rica em lipídeos, e o sulfato de sódio para a precipitação dos anticorpos IgY. Outros autores, como Ma e Zhang (2010) imunizaram galinhas com LPS emulsionado com adjuvante incompleto de Freund, e realizaram a extração dos anticorpos IgY através de água acidificada e sulfato de sódio e obtiveram 8,5 mg/mL de gema. Fathi et al., realizaram extração com polietilenoglicol e o rendimento do anticorpo anticorpos anti toxina bacteriana *shiga* (stx) puro extraído foi de cerca de 5 mg / ml.

Fathi et al., 2020, também avaliaram a produção dos anticorpos com ELISA indireto, alcançando densidade ótica de 1,9 com os anticorpos produzidos. Neri et al. usando antígenos Stx2B e Stx1B recombinantes, para produzir anticorpos IgY purificados por precipitação com sulfato de amônio, obtiveram rendimento de 13,8 mg/ml. Em comparação a este estudo, os valores alcançados de densidade ótica foram de 1,1, uma forma de atingir maiores rendimentos seria utilizar um pool de peptídeos selecionados, visando melhorar o potencial antigênico das imunizações.



## 5.6 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Os anticorpos IgY aparecem no soro da galinha em aproximadamente quatro dias depois da inoculação do antígeno, alcançando um título máximo em 6 a 8 dias, e declinando depois disso. O título de anticorpos pode ser fortemente aumentado por imunizações de reforço. Anticorpos específicos do soro são transportados para gema com um atraso de 3-6 dias, devido ao desenvolvimento do folículo ovariano e ovopostura (CORREIA NETO, 2020). Dentro desta quantidade de IgY produzida, apenas cerca de 3 a 3,2% dos anticorpos são específicos aos antígenos administrados (AKITA; LI CHAN, 1998).

## 5.7 NEUTRALIZAÇÃO

O ensaio baseado em pseudovírus pode detectar anticorpos neutralizantes e inibidores de entrada viral, que podem prever sua função e eficácia. Comparado a um ensaio de neutralização com vírus vivo, este ensaio é mais seguro e pode ser facilmente realizado em condições biossegurança 2 porque os vírus pseudotipados podem se replicar apenas por um único ciclo após entrar nas células. Enquanto isso, os pseudovírus carregam genes repórter, que podem ser expressos após a infecção para facilitar a detecção. A detecção quantitativa de vírus infectados é realizada por luminescência, o que torna o ensaio passível de detecção de alto rendimento e fácil de padronizar (NIE et al., 2020).

Artman et al., 2021, imunizaram galinhas com glicoproteína recombinante S1 de SARS-CoV-2, e avaliaram o potencial de inibição e de neutralização dos anticorpos produzidos. A capacidade de inibir a replicação viral foi realizada com ensaio de redução de placa com o vírus, os anticorpos IgY não diluídos apresentaram 38,3% de redução nas unidades formadoras de placa. Wei et al.,

imunizaram galinhas com a proteína S do SARS-CoV-2 e na avaliação da neutralização com pseudovírus obtiveram resultado de 75,86% de inibição. Schmidt et al., 2021, em análises com anticorpos neutralizantes policlonais de pacientes vacinados ou infectados com COVID-19, sugerem que a maturação de afinidade, ao longo de meses de convalescença, confere flexibilidade e afinidade ao anticorpo. No caso do SARS-CoV-2 um alvo chave para neutralizar anticorpos (NAbs) está no domínio de ligação ao receptor da proteína viral S.

O ensaio de neutralização tem quatro aplicações principais no gerenciamento de um surto pandêmico como SARS-CoV-2. Usando esta ferramenta, é possível avaliar a presença e a duração da proteção mediada por anticorpos em indivíduos naturalmente infectados, rastrear preparações de plasma convalescente para doação, testar a eficácia da imunoterapia e analisar os títulos de NAb da vacinação (MATUSALI et al., 2021).

O'donnell et al., 2020 imunizaram gansas para produção de IgY contra dengue, que foram capazes de neutralizar a infecção. Nguyen et al., 2010 imunizaram galinhas com vírus da Influenza H1N1 A/PR/8/34 inativado, modelo da pandemia de H1N1/09, e conseguiram IgY específicos para H1N1 protetor para camundongos desafiados com infecção letal pelo vírus influenza, nos testes de neutralização os anticorpos foram 50% neutralizantes.

Como a proteína S determina a eficiência de ligação com ACE2, ela fornece um alvo importante para o reconhecimento e neutralização molecular de COVID-19 (WANG et al., 2021). Os anticorpos produzidos neste estudo, testados contra o pseudovírus da proteína S do SARS-CoV-2, apresentaram resultados baixos de neutralização, o anticorpo contra o antígeno peptídico 203 apresentou 42,9% de neutralização quando exposto a pseudovírus do SARS-CoV-2.

## 6 CONCLUSÃO

Os peptídeos sintetizados e avaliados quanto a sororreatividade de peptídeos da proteína Spike para os anticorpos IgG em amostras de indivíduos que tiveram COVID-19 pela técnica de ELISA indireto, e foram selecionados os que induziram anticorpos IgG de alta avidez.

Dessa forma os peptídeos usados como antígeno para produção dos anticorpos IgY em galinhas contra as proteínas S e N do SARS-CoV-2. Esses anticorpos apresentaram potencial neutralizantes, foram purificados da gema do ovo com técnicas de baixo custo e baixa complexidade, além de preservar o bem estar animal, se tornando mais acessível.

Os anticorpos contra o peptídeo 203 apresentaram melhores resultados de neutralização, se tornando o melhor candidato para pesquisas futuras. Os resultados de cinética de produção não apresentaram crescimento linear e padronizado entre os grupos, sendo os anticorpos contra os grupos 137 e 203 os que apresentaram maior pico produção. E todos os anticorpos apresentaram índice avidez médio ou alto durante todo período de avaliação.

Para próximos trabalhos, sugere-se avaliar os anticorpos como ferramenta de diagnóstico, como ELISA de captura, e avaliar a combinação dos peptídeos ou a purificação dos anticorpos específicos como uma maneira de obter maior neutralização.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ABDOOL KARIM, Salim S.; DE OLIVEIRA, Tulio. New SARS-CoV-2 Variants — Clinical, Public Health, and Vaccine Implications. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 384, n. 19, p. 1866–1868, 2021. DOI: 10.1056/NEJMc2100362. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2100362>.

AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with a enterotoxigenic Escherichia coli strain. *Journal of Immunological Methods*, v. 2, p. 207-214, 1993. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-B)

ARABI, Yaseen M. et al. Feasibility of Using Convalescent Plasma Immunotherapy for MERS-CoV Infection, Saudi Arabia. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 1554–1561, 2016. DOI: 10.3201/eid2209.151164. Disponível em: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/9/15-1164\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/9/15-1164_article.htm).

ARTMAN, Chad; BRUMFIELD, Kyle D.; KHANNA, Sahil; GOEPP, Julius. Avian antibodies (IgY) targeting spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) inhibit receptor binding and viral replication. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 5 May, p. 1–14, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0252399. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0252399>.

BLANCO-MELO, Daniel et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, [S. l.], v. 181, n. 5, p. 1036- 1045.e9, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.026. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286742030489X>.

BOECHAT, J. L.; CHORA, I.; MORAIS, A.; DELGADO, L. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. **Pulmonology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 423–437, 2021. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2021.03.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531043721000842>.

CARLANDER, David; KOLLBERG, Hans; WEJÅKER, Per-Erik; LARSSON, Anders. Peroral Immunotherapy with Yolk Antibodies for the Prevention and Treatment of Enteric Infections. **Immunologic Research**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–6, 2000. DOI: 10.1385/IR:21:1:1. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1385/IR:21:1:1>.

CARTER, J. Mark. Conjugation of peptides to carrier proteins via glutaraldehyde. In: *The protein protocols handbook*. Humana Press, 1996. p. 679-687.

CASADEVALL, Arturo; PIROFSKI, Liise Anne. The convalescent sera

option for containing COVID-19. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 130, n. 4, p. 1545–1548, 2020. DOI: 10.1172/JCI138003.

CORREIA NETO, Corneville. Produção e purificação parcial de IgY anti-lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)(Leguminosae) em galinhas poedeiras. 2015.

CRON, Randy Q.; CARICCHIO, Roberto; CHATHAM, W. Winn. Calming the cytokine storm in COVID-19. **Nature Medicine**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1038/s41591-021-01500-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01500-9>.

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41579-018-0118-9>.

DA SILVA, Mayara Torquato Lima; DEODATO, Raissa Martins; VILLAR, Livia Melo. Exploring the potential usefulness of IgY for antiviral therapy: A current review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 189, p. 785–791, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.078. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021017372>.

DIAS, Greicy Malaquia. Protocolo Soroneutralização. Laboratorio de Imunobiologia. UFSC.

FATHI, Javad; EBRAHIMI, Firouz; NAZARIAN, Shahram; HAJIZADE, Abbas; MALEKZADEGAN, Yalda; ABDI, Ali. Production of egg yolk antibody (IgY) against shiga-like toxin (stx) and evaluation of its prophylaxis potency in mice. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 145, p. 104199, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104199. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401020304861>.

FERREIRA JÚNIOR, Álvaro et al. Anticorpos IgY policlonais: ferramentas auxiliares para o estudo in vitro de *Toxoplasma gondii*. 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/16578>.

FONTANET, Arnaud; AUTRAN, Brigitte; LINA, Bruno; KIENY, Marie Paule; KARIM, Salim S. Abdool; SRIDHAR, Devi. SARS-CoV-2 variants and ending the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, [S. l.], v. 397, n. 10278, p. 952–954, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00370-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673621003706>.

GAJIC, Ognjen et al. Transfusion-related Acute Lung Injury in the Critically Ill. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 176, n. 9, p. 886–891, 2007. DOI: 10.1164/rccm.200702-271OC. Disponível em: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200702-271OC>.

GUJRAL, Naiyana; LÖBENBERG, Raimar; SURESH, Mavanur; SUNWOO, Hoon. In-Vitro and In-Vivo Binding Activity of Chicken Egg Yolk

Immunoglobulin Y (IgY) against Gliadin in Food Matrix/. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 12, p. 3166–3172, 2012. DOI: 10.1021/jf205319s. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf205319s>.

HE, Xuemei; HONG, Weiqi; PAN, Xiangyu; LU, Guangwen; WEI, Xiawei. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. **MedComm**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 838–845, 2021. DOI: 10.1002/mco2.110. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mco2.110>.

HOFFMANN, Markus et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, [S. l.], v. 181, n. 2, p. 271–280.e8, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420302294>.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, [S. l.], v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

JIANG, Shibo; HILLYER, Christopher; DU, Lanying. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 355–359, 2020. DOI: 10.1016/j.it.2020.03.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490620300570>.

KNIES, Andrea; LADAGE, Dennis; BRAUN, Ralf J.; KIMPEL, Janine; SCHNEIDER, Miriam. Persistence of humoral response upon SARS-CoV-2 infection. **Reviews in Medical Virology**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1002/rmv.2272. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2272>.

KOVACS-NOLAN, Jennifer; MINE, Yoshinori. Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 163–182, 2012. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101137. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-022811-101137>.

LARSSON, Anders; CARLANDER, David; WILHELMSSON, Martin. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 29–36, 1998. DOI: 10.1080/09540109809354966. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09540109809354966>.

LAURING, Adam S.; HODCROFT, Emma B. Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? **JAMA**, [S. l.], v. 325, n. 6, p. 529, 2021. DOI: 10.1001/jama.2020.27124. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2775006>.

LEE, Eunjin; OH, Ji Eun. Humoral Immunity against SARS-CoV-2 and the Impact on COVID-19 Pathogenesis. **Molecules and Cells**, [S. l.], v. 44, n. 6, p. 392–400, 2021. DOI: 10.14348/molcells.2021.0075. Disponível em: <http://molcells.org/journal/view.html?doi=10.14348/molcells.2021.0075>.

LEIVA, Carlos Leónidas; GALLARDO, M. Julián; CASANOVA, Natalia; TERZOLO, Horacio; CHACANA, Pablo. IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 81, n. October 2019, p. 106269, 2020. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106269. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106269>.

LI, Geng et al. Coronavirus infections and immune responses. **Journal of Medical Virology**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 424–432, 2020. a. DOI: 10.1002/jmv.25685. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25685>.

LI, Xiaowei; GENG, Manman; PENG, Yizhao; MENG, Liesu; LU, Shemin. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 102–108, 2020. b. DOI: 10.1016/j.jpha.2020.03.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177920302045>.

LIMA, Claudio Márcio Amaral de Oliveira. Information about the new coronavirus disease (COVID-19). **Radiologia Brasileira**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. V–VI, 2020. DOI: 10.1590/0100-3984.2020.53.2e1. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-39842020000200001&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-39842020000200001&tlng=en).

LIMA, Luana Nepomuceno Gondim Costa; DE SOUSA, Maisa Silva; LIMA, Karla Valéria Batista. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. **Journal of Health & Biological Sciences**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1, 2020. DOI: 10.12662/2317-3076jhbs.v8i1.3232.p1-9.2020.

LOPES, Camila de Almeida et al. Imunodiagnóstico da ascaridíase humana: uma nova abordagem sorológica utilizando a tecnologia IgY. 2018.

MASIÁ, Mar et al. Impact of interleukin-6 blockade with tocilizumab on SARS-CoV-2 viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19: A prospective cohort study. **EBioMedicine**, [S. l.], v. 60, p. 102999, 2020. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396420303753>.

MATSUYAMA, Shutoku; TAGUCHI, Fumihito. Two-Step Conformational Changes in a Coronavirus Envelope Glycoprotein Mediated by Receptor Binding and Proteolysis. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 83, n. 21, p. 11133–11141, 2009. DOI: 10.1128/JVI.00959-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00959-09>.

MATUSALI, Giulia et al. SARS-CoV-2 Serum Neutralization Assay: A Traditional Tool for a Brand-New Virus. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 655, 2021. DOI: 10.3390/v13040655. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/4/655>.

NGUYEN, Huan H. et al. Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Avian Antibodies Against Influenza Virus H5N1 and H1N1 in Mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. e10152, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0010152. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010152>.

NIE, Jianhui et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 3699–3715, 2020. DOI: 10.1038/s41596-020-0394-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41596-020-0394-5>.

O'DONNELL, Kyle L. et al. Avian anti-NS1 IgY antibodies neutralize dengue virus infection and protect against lethal dengue virus challenge. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 183, p. 104923, 2020. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104923. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354220303375>.

OU, Xiuyuan et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1620, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-15562-9. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-15562-9>.

PEREIRA, E. P. V.; VAN TILBURG, M. F.; FLOREAN, E. O. P. T.; GUEDES, M. I. F. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 73, p. 293–303, 2019. a. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.05.015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576919302206>.

PEREIRA, E. P. V.; TILBURG, M. F. Van; FLOREAN, E. O. P. T.; GUEDES, M. I. F. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information. **International Immunopharmacology**, [S. l.], n. January, p. 293–303, 2019. b.

ROKNI, Mohsen; GHASEMI, Vida; TAVAKOLI, Zahra. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. **Reviews in Medical Virology**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 1–6, 2020. DOI: 10.1002/rmv.2107.

SABINO, Ester C. et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. **The Lancet**, [S. l.], v. 397, n. 10273, p. 452–455, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00183-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673621001835>.

SANTIANI; Manuel H. Novel synthetic peptide for COVID-19 Immune diagnostic, Universidade Federal do Paraná, 2021.

SCHMIDT, Fabian et al. High genetic barrier to SARS-CoV-2 polyclonal neutralizing antibody escape. **Nature**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-



04005-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-04005-0>.

SETHURAMAN, Nandini; JEREMIAH, Sundararaj Stanleyraj; RYO, Akihide. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **JAMA**, [S. l.], v. 323, n. 22, p. 2249, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.8259. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2765837>.

SHOLUKH, Anton M. et al. Evaluation of SARS-CoV-2 neutralization assays for antibody monitoring in natural infection and vaccine trials. **medRxiv**, [S. l.], 2020.

SINGHAL, Tanu. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). **The Indian Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 281–286, 2020. DOI: 10.1007/s12098-020-03263-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12098-020-03263-6>.

SOBH, Ali; BONILLA, Francisco A. Vaccination in Primary Immunodeficiency Disorders. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 1066–1075, 2016. DOI: 10.1016/j.jaip.2016.09.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213219816304081>.

SUTHAR, Mehul S. et al. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. **Cell Reports Medicine**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 100040, 2020. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100040. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666379120300525>.

WAN, Yushun et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 94, n. 5, 2020. DOI: 10.1128/JVI.02015-19. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02015-19>.

WANG, Tao et al. Synthetic Neutralizing Peptides Inhibit the Host Cell Binding of Spike Protein and Block Infection of SARS-CoV-2. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 64, n. 19, p. 14887–14894, 2021. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01440. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.1c01440>.

WEI, Shuangshi et al. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgYs) block the binding of multiple SARS-CoV-2 spike protein variants to human ACE2. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 90, p. 107172, 2021. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107172. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021017372>.

WEST, Rachel M.; KOBOKOVICH, Amanda; CONNELL, Nancy; GRONVALL, Gigi Kwik. Antibody (Serology) Tests for COVID-19: a Case Study. **mSphere**, [S. l.], v. 6, n. 3, 2021. DOI: 10.1128/mSphere.00201-21. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00201-21>.

WRAPP, Daniel; WANG, Nianshuang; CORBETT, Kizzmekia S.;

GOLDSMITH, Jory A.; HSIEH, Ching-Lin; ABIONA, Olubukola; GRAHAM, Barney S.; MCLELLAN, Jason S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, [S. l.], v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020. DOI: 10.1126/science.abb2507. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abb2507>.

WU, Jun et al. SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1813, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-22034-1. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-021-22034-1>.

XU, Yongping; LI, Xiaoyu; JIN, Liji; ZHEN, Yuhong; LU, Yanan; LI, Shuying; YOU, Jiansong; WANG, Linhui. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 860–868, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011001133>.

## ANEXOS

## Artigos publicados (1 e 2)

## A Review on COVID-19 Diagnosis Tests Approved for Use in Brazil and the impact on Pandemic Control.

Vol.64: e21200147, 2021  
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-75years-2021200147>  
 ISSN 1678-4324 Online Edition



Review - 75 years - Special Edition

### A Review on COVID-19 Diagnosis Tests Approved for Use in Brazil and the Impact on Pandemic Control

**Jean Michel Dela Vedova-Costa<sup>1</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0002-5656-7239>

**Eliézer Lucas Pires Ramos<sup>1</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0002-9437-5545>

**Raphael Aparecido Boschero<sup>1</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0002-9668-7526>

**Gabriela Nascimento Ferreira<sup>1</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0003-4313-479X>

**Vanete Thomaz Soccol<sup>1\*</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0001-9301-541X>

**Manuel Hospinal Santiani<sup>1</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0002-4775-9415>

**Violetta Dias Pacce<sup>1</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0003-1576-5949>

**Bruno Paulo Rodrigues Lustosa<sup>2</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0002-0150-5962>

**Vânia Aparecida Vicente<sup>2</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0002-2953-4861>

**Carlos Ricardo Soccol<sup>1</sup>**  
<https://orcid.org/0000-0001-7630-6864>

<sup>1</sup>Federal University of Paraná, Laboratory of Molecular Biology, Bioprocess Engineering and Biotechnology Department, Curitiba, Paraná, Brazil. <sup>2</sup>Federal University of Parana, Basic Pathology Department, Curitiba, Paraná, Brazil.

Editor-in-Chief: Alexandre Rasi Aoki  
 Associate Editor: Bruno Pedroso

Received: 2021.03.10; Accepted: 2021.05.07.

\*Correspondence: soccol@ufpr.br; Tel.: +55-41-33613555 (C.R.S.).

#### HIGHLIGHTS

- The main COVID-19 diagnostic methods in Brazil are updated.
- More than 80% of the approved products are from other countries.
- The tests are based on the detection of nucleic-acid (15.8%), antigen (13%) and antibody (71.2%).
- The most of Brazilian federative units show an elevated percentage of cases per samples tested.

**Abstract:** With the COVID-19 pandemic, many diagnostic tests (molecular or immunological) were rapidly standardised, given the urgency of the situation, many are still in the process of being validated. The main objective of this study was to review the aspects of the diagnostic kits approved in Brazil and their application in the different federative units to gather epidemiological information. In order to achieve these objectives, a survey was carried out on the data available at the regulatory agency (ANVISA) and in the literature. The main countries that have registered products in Brazil are China (51.4%), Brazil (16.6%), South Korea (9.2%), USA (8.8%) and Germany (3.6%). The methodologies of these products are based on the detection of nucleic-acid (15.8%), antigen (13%) and antibody (71.2%). In the immunological tests, it was verified that the sensitivity ranged from 55 to 100% and the specificity from 80 to 100%. The percentage of cases in the samples tested in Brazil is elevated in almost all federative units since eight states showed 40% of positive cases in tested samples, while 18 states displayed between 20 and 40%. In conclusion, this review showed

## New age in vaccinology: The impact of the COVID-19 pandemic on third-generation vaccine development

Biotechnology Research and Innovation, 2021, 5(1): e2021003. <https://doi.org/10.4322/biori.202103>



REVIEW ARTICLE

### New age in vaccinology: the impact of the COVID-19 pandemic on third-generation vaccine development

Eliézer Lucas Pires Ramos<sup>a</sup>, Jean Michel Dela Vedova-Costa<sup>a</sup>, Violetta Dias Pacce<sup>a</sup>, Gabriela Nascimento Ferreira<sup>a</sup>, Yessenia Cristhel Manrique Guzmán<sup>a</sup>, Raphael Aparecido Boschero<sup>a</sup>, Manuel Hospinal Santiani<sup>a</sup>, Vanete Thomaz-Soccol<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Molecular Biology Laboratory, Bioprocess and Biotechnology Department, Federal University of Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brazil

#### Highlights

- An analysis of vaccine technologies is conducted in this study.
- A third generation vaccine has been developed with the COVID19 pandemic.
- The different platforms, immune characteristics and production processes are reviewed.

Received 16 August, 2021; Revised 15 September, 2021; Accepted 03 October, 2021.

#### KEYWORDS

Vaccines;  
mRNA;  
Viral vector;  
DNA;  
Vaccine production;  
Biotechnology;  
Bioprocess.

**Abstract:** The emergency caused by the COVID-19 pandemic required fast and effective vaccine development. Thus, third-generation vaccine technologies were pushed forward and, for the first time, obtained approval for human use. This review presents an analysis on the production, efficacy, and safety of different third-generation vaccines for infectious diseases. DNA, mRNA, and viral vector vaccines in phase III and IV clinical trials were explored here, with considerations and comparisons between them. Two databases of clinical trial vaccines were also analyzed, revealing that 7.9% of phase III and IV clinical trial studies are related to third-generation vaccines. Most of these studies started in 2020 (28.6%) and 2021 (63.1%). The target disease is primarily COVID-19 (92.9%), and most trials are concentrated in developed countries. Scientific, economic, and political factors influenced the rapid development of third-generation vaccines, marking the beginning of a new age in vaccinology. The knowledge obtained during this brief period will influence future vaccine development and treatment of infectious diseases.

\*Corresponding author.  
E-mail: vanetesoccol@gmail.com (V. Thomaz-Soccol).

## Patentes 1 a 5

**“ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 APLICADO EM KIT E MÉTODO ELISA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE COVID-19”, sob o número de processo BR102020024378-0**

**“ANTÍGENOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O DIAGNÓSTICO DO SARS-COV-2”, sob o número de processo BR102020024403-5**

**“USO DE PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S118 PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 USANDO PLATAFORMA DE IMUNODIAGNÓSTICO”** sob o número de processo **BR102020024371-3**

**"PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.129 PARA IMUNODETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM, IGA E IGG CONTRA COVID-19"**, sob o número de processo **BR102020024380-2**

**"PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.132 PARA KIT ELISA DE AVIDEZNO DIAGNÓSTICO DE COVID-19"**, sob o número de processo **BR102020024390-0**



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 024378 0

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 75095679000149

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua João Negrão, 280 2o andar

**Cidade:** Curitiba

**Estado:** PR

**CEP:** 80010-200

**País:** Brasil

**Telefone:** (41) 3360 7441

**Fax:** (41) 3360 7416

**Email:** coord.pi@ufpr.br



30/11/2020 870200150515  
12.51  
29409161921769857

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 024403 5

**Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 2**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 75095679000149

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua João Negrão, 280 2o andar

**Cidade:** Curitiba

**Estado:** PR

**CEP:** 80010-200

**País:** Brasil

**Telefone:** (41) 3360 7441

**Fax:** (41) 3360 7416

**Email:** coord.pi@ufpr.br



30/11/2020 870200150289  
09:52  
29409161921769768

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 024371 3

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 75095679000149

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua João Negrão, 280 2o andar

**Cidade:** Curitiba

**Estado:** PR

**CEP:** 80010-200

**País:** Brasil

**Telefone:** (41) 3360 7441

**Fax:** (41) 3360 7416

**Email:** coord.pi@ufpr.br



30/11/2020 870200150395  
11:14  
29409161921769830

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 024380 2

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 75095679000149

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua João Negrão, 280 2o andar

**Cidade:** Curitiba

**Estado:** PR

**CEP:** 80010-200

**País:** Brasil

**Telefone:** (41) 3360 7441

**Fax:** (41) 3360 7416

**Email:** coord.pi@ufpr.br



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo:** BR 10 2020 024390 0

**Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 2**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 75095679000149

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua João Negrão, 280 2o andar

**Cidade:** Curitiba

**Estado:** PR

**CEP:** 80010-200

**País:** Brasil

**Telefone:** (41) 3360 7441

**Fax:** (41) 3360 7416

**Email:** coord.pi@ufpr.br



## APÊNDICE

Tabela 1. Porcentagem de neutralização dos anticorpos

Grupo	Diluição	%Neutralização
203 1	25	0
	50	0
	100	31,5477294
203 2	25	24,5572802
	50	0
	100	14,09317095
203 3	25	0
	50	13,21604169
	100	0,976451667
203 4	25	0
	50	0,65247007
	100	0
203 5	25	0
	50	38,81429604
	100	5,857112626
203 6	25	42,98110215
	50	0
	100	10,38663664
137 2	25	2,485129243
	50	14,30111588
	100	0
137 3	25	19,07058848
	50	0
	100	7,533908306
137 4	25	4,720929934
	50	4,187819463
	100	17,71548962
137 5	25	0
	50	11,88410002
	100	0
137 6	25	19,8264118
	50	0

	100	0
132 2	25	0
	50	0
	100	0
132 3	25	0
	50	0
	100	0
132 4	25	0
	50	2,930210736
	100	1,146857201
132 5	25	0
	50	23,16066223
	100	0
309 2	25	0
	50	23,30242914
	100	0
309 3	25	17,18437412
	50	0
	100	0
309 4	25	3,604986987
	50	16,05383295
	100	0
309 5	25	0
	50	0
	100	18,62524761
309 6	25	23,44
	50	11,985
	100	0
C1	25	13,28949716
	50	20,75105238
	100	0
C2	25	0
	50	0
	100	0
C3	25	0
	50	0
	100	0
C4	25	0
	50	16,48475538
	100	0

C5	25	0
	50	0
	100	0
C6	25	1,870950522
	50	0
	100	2,461875118

