

MONITORAMENTO CLÍNICO, HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE EQUINOS UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTI-SARS-CoV-2

NETO, Marcos Eduardo ¹;
WILBORN, Roberta ¹;
SILVA, Gabriela Castro da ¹;
GONÇALVES, Vitória Sequeira ²;
MÜLLER, Vitória ²;
CONRAD, Neida Lucia ²;
LEITE, Fabio Pereira Leivas ³;
NOGUEIRA, Carlos Eduardo Wayne ⁴.

Recebido: 19/12/2022

Aceito: 19/04/2023

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas/UFPEL; ²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFPEL; ³Médico Veterinário, Doutor, Professor, Curso de Biotecnologia, UFPEL; ⁴Médico Veterinário, Doutor, Professor, Faculdade de Veterinária, UFPEL.

RESUMO

Descoberta no final de 2019 e denominada COVID-19, a infecção pelo coronavírus SARS-CoV-2 é uma doença que impactou o mundo de diversas formas, atingindo o status de pandemia. Dentre as opções de tratamento, o soro hiperimune representou ser eficaz e de baixo custo, obtido através do fracionamento do soro a partir do sangue total contendo grande quantidade de anticorpos. Para a produção pode ser utilizada a espécie equina, que demonstra vantagens, como o volume de sangue que pode ser obtido e a facilidade de manejo. Diversos fatores individuais como a idade, o escore corporal, aspectos clínicos e hematológicos influenciam a resposta imunológica a um antígeno vacinal. O objetivo deste trabalho foi definir através de parâmetros clínicos e hematológicos os equinos com maior potencial para a produção de soro hiperimune contra o SARS-CoV-2. Para isso foram utilizados 26 cavalos hígidos, sendo realizadas coletas de sangue e obtenção de soro, para avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e monitoramento da produção de anticorpos (ELISA indireto), respectivamente. Correlacionando os dados clínicos e hematológicos com os níveis de anticorpos produzidos após 20 e 30 dias da última inoculação, observou-se que maiores níveis de anticorpos anti-SARS-CoV-2 foram produzidos por equinos machos castrados, com alta concentração de plaquetas. Concluímos que o processo de produção de soro hiperimune contra o SARS-CoV-2 causou reações inflamatórias locais e sistêmicas transitórias, porém as reações se reverteram sem causar danos relevantes aos animais. Os equinos machos castrados, quando comparados com fêmeas, produziram níveis mais elevados de anticorpos contra o SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Cavalos. Hemograma. Anticorpos. COVID 19. Imunidade.

INTRODUÇÃO

Descoberta no final de 2019 e denominada COVID-19, a infecção pelo coronavírus SARS-CoV-2, ainda em curso, acometeu mais de 539 milhões de indivíduos e registra mais de 6,32 milhões de mortes em todo o mundo. No Brasil, os casos confirmados passam de 30 milhões e cerca de 669 mil mortes (WHO, 2022). Segundo a Organização Mundial da Saúde, as ações contra a doença focaram na prevenção de infecções, detecção, monitoramento e cuidados de suporte, tendo em vista que nenhum tratamento específico contra a doença foi recomendado por falta de evidências (CHEN et al., 2020).

Evidências sugerem que a aplicação de soro ou plasma convalescente, bem como de imunoglobulinas específicas, produz efeito preventivo e uma melhora clínica no tratamento contra a COVID-19 em humanos (CASADEVALL; PIROFSKI, 2020), pois a transferência passiva de anticorpos confere imunidade imediata, diferente da imunização ativa, a qual requer o desenvolvimento de resposta imune (LU et al., 2016). Contudo, a administração de plasma ou soro convalescente, apresenta limitações, como possíveis reações alérgicas e transmissão de doenças, além de eficácia variável e disponibilidade de plasma ou soro convalescente, tornando tal abordagem controversa (ERHABOR; ADIAS, 2011).

O soro hiperimune é produzido através da imunização de animais com antígenos específicos (SOBRINHO et al., 2013). A espécie equina é a mais utilizada para a produção de soro hiperimune, pois apresenta como vantagens a docilidade e facilidade de manejo, a uniformidade da resposta imunológica, a volemia (11% do peso vivo) e a pouca toxicidade de sua albumina sérica (BETIOL et al., 2008). A fase de imunização se dá a partir da inoculação das soluções antigênicas nos equinos, organizadas em períodos correspondentes aos tempos de resposta do sistema imunológico do equino para cada antígeno específico administrado (PARRA et al., 2009). O soro, contendo quantidade significativa de anticorpos específicos, é obtido através do fracionamento do sangue total (LU et al., 2016). Durante o período de imunização são realizadas análises, com objetivo de avaliar os níveis de anticorpos específicos produzidos, para posteriormente proceder com a coleta para obtenção do soro hiperimune (PARRA et al., 2009). No Brasil, o Instituto Butantan produz cerca de 12 tipos de soros, como contravenenos de animais peçonhentos (escorpiões, cobras e aranhas), contra vírus como o da raiva, contra bactérias como *Clostridium* spp. e toxinas (IB, 2020). A produção do soro é

realizada em equinos (*Equus caballus*) pois permite a obtenção de um grande volume de soro, além da facilidade de manejo (BETIOL et al., 2008).

O processo de produção e obtenção de soro hiperimune exige cuidados com os animais, tais como os relacionados ao manejo, nutrição, sanidade e bem-estar, e falhas nesses cuidados podem refletir diretamente tanto na produção dos soros quanto nos níveis de anticorpos e o tempo para o processo de produção (MOTA; NASCIMENTO, 2019). Fatores individuais estão intimamente ligados à capacidade de resposta imunológica dos equinos, podendo refletir na capacidade da produção de anticorpos contra os antígenos inoculados (ESCODRO et al., 2013), tornando relevante o acompanhamento dos parâmetros relacionados a saúde e bem-estar animal durante o processo. A avaliação clínica permite verificar a presença de reações inflamatórias locais e dor, bem como hipertermias causadas pela reação ao imunizante (SPEIRS, 1999). Os dados hematológicos indicarão resposta sistêmica do indivíduo frente ao desafio da inoculação, com uma possível alteração no seu leucograma e resposta inflamatória sistêmica (WEISS; WARDROP, 2010). A avaliação das enzimas hepáticas, musculares e renais demonstram o grau das lesões locais e alterações nos processos de metabolização e excreção (GONZÁLEZ; SILVA, 2017). Após a inoculação do antígeno, o indivíduo deve se manter “hígido” para que consiga a produção necessária de anticorpos (ESCODRO et al., 2013). O objetivo deste estudo foi descrever a resposta clínica, hematológica e bioquímica dos animais selecionados, bem como definir através de um padrão clínico e hematológico os equinos com potencial para uso na produção de soro hiperimune.

MATERIAL E MÉTODOS

Os equinos com melhores condições sanitárias e mais pesados, dentro do plantel disponível, foram selecionados para participar deste estudo, todos os animais selecionados possuíam escore de condição corporal (ECC) acima de 4 (HENNEKE et al., 1983). Foram utilizados 26 animais, sendo 10 fêmeas e 16 machos castrados, optando por equinos castrados somente pela facilidade de manejo e temperamento dos animais, provenientes do plantel experimental do Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEPP), pertencente a Universidade Federal de Pelotas, que estão descritos na Tabela 1, sendo que dois deles foram excluídos durante a primeira semana de experimento por problemas sanitários. O experimento foi desenvolvido no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Pelotas (HCV-UFPEL). Os animais foram submetidos à avaliação clínica geral, segundo descrito

por Speirs (1999), e em seguida foi realizada a coleta de uma amostra de sangue (5 mL), por punção da veia jugular, em tubos contendo anticoagulante (EDTA), e posterior análises de hemograma no Laboratório de Análises Clínicas do HCV-UFPEL. Além do hemograma foram analisadas as enzimas Fosfatase Alcalina (FA), Gama Glutamil Transferase (GGT), Aspartato Aminotransferase (AST), Ureia, albumina e Creatinina, conforme descrito por Weiss e Wardrop (2010).

A partícula vírica SARS-CoV-2 e proteínas recombinantes foram utilizadas como antígeno para a produção de soro hiperimune. A partícula vírica SARS-CoV-2 foi cultivada e propagada em células Vero (ATCC CRL-1586) até a obtenção de 10^8 unidades formadoras de placas (UPF)/mL. A suspensão viral foi inativada pela adição de formaldeído (5%) ou 1 mM de bromoetilenimina (BEI, Sigma-Aldrich) (MÖLLER et al., 2015; SILVA et al., 2004). Para controlar o vírus infeccioso residual, SARS-CoV-2 inativado foi inoculado em cultura de células Vero, e a presença e/ou ausência de efeito citopático foi monitorada por 72 horas. Os antígenos recombinantes de SARS-CoV-2 foram selecionados através de vacinologia reversa e expressos em sistema procarioto utilizando células de *Escherichia coli*, conforme recomendações de Sambrook e Russell (2001).

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 6 grupos de 4 indivíduos cada. Além destes, dois animais foram usados como controle. Cada grupo foi inoculado com uma formulação vacinal distinta: Grupo 1: SARS-CoV-2 inativado com formaldeído + adjuvante de Freund (AF); Grupo 2: SARS-CoV-2 inativado com formaldeído + hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$); Grupo 3: antígenos recombinantes purificados (rS) + AF; Grupo 4: SARS-CoV-2 inativado com bromoetilenolamina (BEI) + AF; Grupo 5: SARS-CoV-2 inativado com BEI + $Al(OH)_3$; Grupo 6: bacterina recombinante + $Al(OH)_3$. Dois equinos mantidos nas mesmas condições dos animais do experimento foram utilizados como controle para reações cutâneas, sendo inoculados da mesma forma, porém utilizando apenas o adjuvante em solução salina, um recebeu $Al(OH)_3$ e outro AF, para avaliação das reações locais e excluir a influência dos antígenos nas reações locais.

As formulações vacinais foram administradas por via subcutânea, após tricotomia e antisepsia prévia, ao longo do dorso dos animais, na dose de 4 mL, 2 mL de cada lado. As injeções foram realizadas nos dias 0, 10, 20, 30 e 40 (Figura 1). Cada animal recebeu um total de 10 aplicações, 5 em cada lado do dorso. Dez dias após a última dose, no dia 50, foi realizada a coleta de sangue final, no volume de 6 L por animal, visando a coleta do soro hiperimune.

Tabela 1 - Descrição geral dos parâmetros dos equinos selecionados, para obtenção de soro hiperimune anti-SARS-CoV-2.

EQUINO	GRUPO	ANTÍGENO	RAÇA	GÊNERO	IDADE	PESO INICIAL	ECC INICIAL	HEMÁCIAS (X10 ⁶) milhões/uL	LEUC. TOTAIS/uL	PLAQUETAS g/dL
N1	1	SARS-CoV-2 inativado com formaldeído + AF	SRD	Fêmea	5 anos	409 kg	5	9,71	14300	201
N2			SRD	Macho	15 anos	390 kg	6	8,02	9800	243
N3			SRD	Macho	7 anos	380 kg	5	8,48	11900	136
N4	2	SARS-CoV-2 inativado com formaldeído + Al(OH) ₃	SRD	Fêmea	6 anos	338 kg	5	7,88	8800	174
N5			SRD	Fêmea	6 anos	405 kg	6	8,13	12600	314
N6			SRD	Macho	4 anos	348 kg	5	6,19	14500	197
N7	3	qCov-1 e qCoV-6 (rS) + AF	SRD	Macho	8 anos	370 kg	5	7,1	8100	138
N8			SRD	Fêmea	6 anos	373 kg	5	6,88	12300	198
N9			SRD	Macho	5 anos	323 kg	5	7,46	12400	137
N10			SRD	Macho	7 anos	390 kg	5	5,83	4800	240
N11	4	SARS- CoV-2 inativado com BEI + AF	SRD	Macho	2 anos	290 kg	6	7,67	14200	199
N12			SRD	Macho	6 anos	310 kg	5	6,18	9700	151
N13			SRD	Fêmea	20 anos	350 kg	5	6,39	12100	157
N14			SRD	Macho	15 anos	348 kg	5	5,96	10800	400
N15	5	SARS- CoV-2 inativado com BEI + Al(OH) ₃	SRD	Macho	20 anos	317 kg	5	6,62	11400	400
N16			SRD	Macho	20 anos	270 kg	4	8,36	11300	177
N17			SRD	Fêmea	13 anos	375 kg	5	8,97	8700	121
N18	6	qCoV1 + bacterina q-CoV6 + Al(OH) ₃	SRD	Macho	20 anos	345 kg	5	5,7	10000	150
N19			SRD	Fêmea	3 anos	250 kg	5	8,04	12100	281
N20			SRD	Fêmea	7 anos	340 kg	5	9,3	9900	136
N21			SRD	Fêmea	13 anos	316 kg	4	7,93	9000	153
N22	Controle 1	Al(OH) ₃	SRD	Macho	15 anos	312 kg	5	10,08	10900	182
N23			SRD	Macho	6 anos	300 kg	5	10,7	9500	192
N24	Controle 2	AF	SRD	Macho	7 anos	320 kg	5	9,67	10300	200
Média			SRD	M=15 F=09	10 anos	343 kg	5	7,58	10890	180

Juntamente com cada inoculação foi realizada a pesagem, avaliação do escore de condição corporal (ECC), hemograma e exames bioquímicos. O exame clínico foi realizado diariamente avaliando frequência cardíaca, frequência respiratória, motilidade intestinal, temperatura retal, pulso distal, coloração de mucosas e avaliação do local da aplicação do imunizante (SPEIRS, 1999). As reações nos locais de aplicação foram categorizadas e adaptadas utilizando o método descrito por Pratanaphon et al. (1997), pontuando as reações de acordo com o diâmetro da área, pelo aumento de volume, com ou sem lesões, da seguinte forma: (0) sem aumento de volume e sem lesões; (1+) 1-2 cm de diâmetro com ou sem lesões; (2+) 2-3 cm de diâmetro sem lesões; (3+) 2-3 cm de diâmetro com lesões; (4+) mais de 3 cm de diâmetro com ou sem lesões.

Uma vez que o número total de inoculações por cavalo foram 10 (5 de cada lado do dorso), a pontuação máxima de reação por cavalo seria 40. Dessa forma, 0 a 9 pontos corresponde a uma reação normal ou leve; 10 a 19 pontos reação moderada e mais de 20 pontos como reação grave.

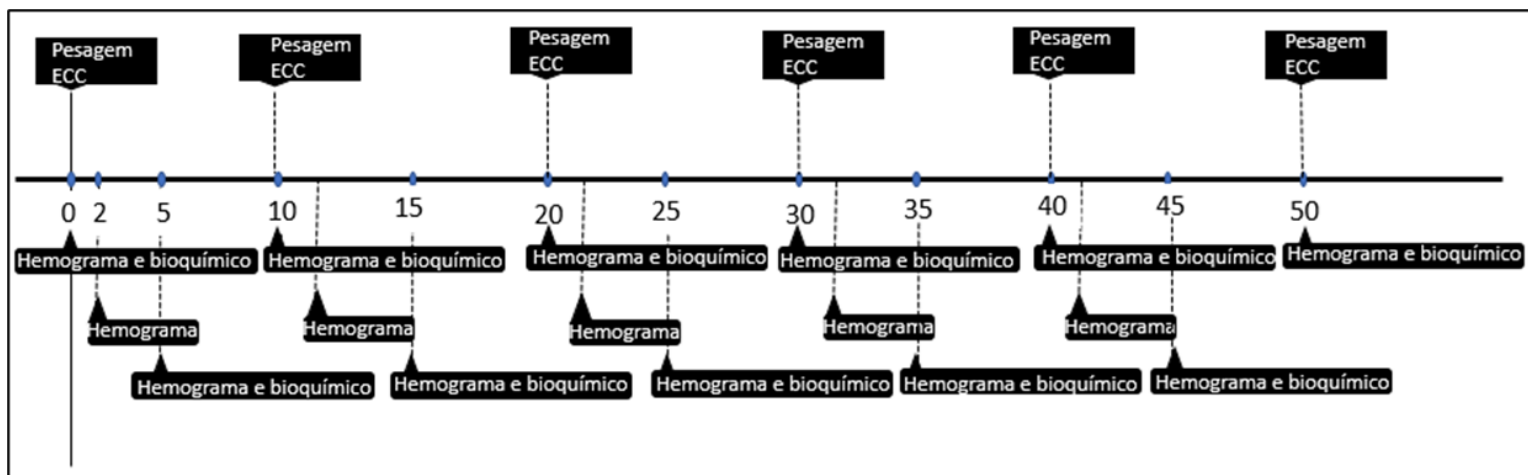


Figura 1 - Delineamento experimental. Linha do tempo demonstrando os dias das avaliações.

No dia vinte, após as inoculações, foram coletadas amostras de sangue total via punção da veia jugular, o soro assim obtido foi utilizado para quantificação dos níveis de anticorpos (IgG) através de ELISA indireto. Resumidamente, placas de poliestireno de 96 cavidades (Cral) foram

impregnadas com a partícula vírica SARS-CoV-2 (10^6 UFP/cavidade) ou com o antígeno recombinante rS (100 ng/cavidade), ambos diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,8). Os soros foram diluídos (1:100) em tampão fosfatado (PBS) e avaliados em triplicata. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP) anti-horse (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000 em PBS. Entre cada uma das etapas as placas foram lavadas com PBS contendo *Tween* 20 (PBS-T) e incubadas por 1h a 37 °C. As reações foram mensuradas após adição de substrato cromógeno [10 mg ortho-phenylenodiamine (OPD, Sigma-Aldrich) em 10 mL de tampão fosfato-citrato (0,1 M), pH 4,0 e 10 µl de H₂O₂]. Esse procedimento foi repetido no dia 30 após a inoculação, e através de média aritmética estipulou-se a média de produção de anticorpos de cada animal.

Análise estatística

Foi utilizado o teste t de Student para avaliar a resposta imune com diferentes antígenos considerando diferenças com $p < 0,05$. Foi utilizado o teste de correlação de Pearson entre dados clínicos e hematológicos e níveis de anticorpos. Foi realizada a correlação simples entre a média de produção de anticorpos de cada indivíduo com o gênero, idade, peso, ECC e dados hematológicos, correlacionando cada um dos dados de forma isolada, considerando correlação $p < 0,05$. Para realização das correlações e a análise estatística alguns dados foram agrupados e categorizados como está demonstrado na Tabela 2 (STATISTIX, 2022).

Tabela 2 – Descrição do agrupamento dos dados para a execução das avaliações estatísticas.

	Categorias	Grupo
Gênero	Fêmea	1
	Macho	2
Idade	0 a 5 anos	1
	6 a 10 anos	2
	11 a 15 anos	3
	16 a 20 anos	4
Peso	0 a 99 kg	1
	100 a 199	2
	200 a 299 kg	3
	300 a 399 kg	4
	400 a 499 kg	5
Ecc	1 a 4 ECC	1
	5 a 9 ECC	2
Plaquetas	Plaquetas de 0 a 137	1
	Plaquetas de 138 a 197	2
	Plaquetas de 198 a 400	3
Hemácias	Hemácias de 0 a 6,62	1
	Hemácias de 6,63 a 8,12	2
	Hemácias de 8,13 a 10,08	3
Leucócitos totais	Leucócitos de 0 a 9800	1
	Leucócitos de 9801 a 12099	2
	Leucócitos de 12100 a 14500	3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve alteração do manejo alimentar durante o experimento, os animais não apresentaram diminuição do apetite ou perda de peso, mantendo seu escore corporal. Em estudos semelhantes, visando a produção de soro antiofídico, também não foram observadas diferenças no peso dos animais, apetite e ECC (WAGHMARE et al., 2009).

Os animais apresentaram episódios de hipertermia durante as primeiras 36 horas após a inoculação do antígeno, principalmente os grupos 2, 3 e 6, retornando aos valores basais em

aproximadamente 24 horas. Pratanaphon et al. (1997), em um experimento para produção de soro antiofídico, relataram alterações como o aumento transitório da temperatura e reações cutâneas nos locais de aplicação do antígeno.

Todos os cavalos demonstraram algum tipo de reação cutânea após a inoculação com o antígeno SARS-CoV-2. As reações foram caracterizadas pela formação de abscessos, edema, lesões com ou sem secreção. Os grupos 1 e 3 foram os únicos que demonstraram reações classificadas como graves. Os grupos 4 e 5 apresentaram apenas reações leves. Reações moderadas foram observadas em um animal do grupo 2 e dois animais do grupo 6. Os animais do grupo controle apresentaram reações locais consideradas leves (PRATANAPHON et al., 1997).

O adjuvante utilizado nos grupos 1, 2, 3 e 4 (AF) causa reação inflamatória sistêmica e local, como granulomas, abscessos estéreis e necrose, o que pode ser minimizado dependendo da dose utilizada, via de aplicação e tipo de antígeno (CLAASSEN et al., 1992). O uso do $Al(OH)_3$ é considerado seguro, porém também pode causar reações locais como granulomas, eritema, nódulos e hipersensibilidade, embora seja relatado com menos frequência (HE et al., 2015). Os animais do grupo 5 e 6, que receberam o antígeno adsorvido em $Al(OH)_3$, não apresentaram reações graves, indo ao encontro com o que é relatado na literatura (PRATANAPHON et al., 1997). O animal controle nº 1, que foi inoculado apenas com $Al(OH)_3$ sem antígeno, apresentou reações locais leves sem manifestação de comprometimento sistêmico.

Os animais selecionados como doadores neste experimento não apresentavam alterações clínicas ou no leucograma, um dos critérios de inclusão, de modo a descartar quadros infecciosos e ou inflamatórios (THEML et al., 2004), fator fundamental para a seleção de doadores. Avaliando os parâmetros de concentrações de hemácias, hemoglobina, porcentagem de hematócrito, série branca das células sanguíneas e concentração de fibrinogênio, todos encontravam-se dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie (WEISS; WARDROP, 2010), não havendo correlação com a produção de anticorpos.

O fibrinogênio teve um aumento ($p < 0,043$) durante os dias do experimento, sendo que com exceção do grupo 5, todos os grupos ultrapassaram o valor de referência para a espécie

(CRISMAN et al., 2008). O fibrinogênio é uma glicoproteína dimérica composta por três pares de cadeias polipeptídicas (DI FILIPPO et al., 2009), que aumenta durante as reações inflamatórias de fase aguda, como as que ocorrem após procedimentos cirúrgicos, doenças inflamatórias e infecciosas ou qualquer atividade que induz resposta inflamatória (JENSEN et al., 2000). O fibrinogênio tem grande especificidade diagnóstica para determinação de processos inflamatórios (TAMZALI et al., 2001).

Os valores das enzimas musculares, hepáticas e renais não apresentaram alterações de acordo com os valores de referência, determinados por González e Silva (2017) para a espécie, durante o período analisado, não evidenciando possíveis alterações nesses sistemas. Quanto a avaliação da produção de anticorpos, fatores como a idade, peso, ECC, série vermelha e série branca não tiveram correlação, não interferindo na produção de anticorpos para produção de soro contra SARS-COV-2 ($p>0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Estatística descritiva com médias, desvio padrão e valor de p para a correlação das variáveis avaliadas de cada equino.

	Número de animais (n)	Nível de anticorpos (média + desvio padrão) i	Valor de p
Gênero			
Fêmea	09	0,70±0,18	>0,05
Macho	13	0,87±0,24	0,008
Idade			
0 a 5 anos	5	0,77±0,25	>0,05
6 a 10 anos	8	0,82±0,19	>0,05
11 a 15 anos	5	0,94±0,27	>0,05
16 a 20 anos	4	0,67±0,22	>0,05
Peso			
100 a 199 kg	3	0,66±0,29	>0,05
200 a 299 kg	17	0,84±0,22	>0,05
300 a 399 kg	2	0,72±0,24	>0,05
ECC			
1 a 4 ECC	5	0,67±0,19	>0,05
5 a 9 ECC	17	0,85±0,23	>0,05

A correlação do gênero com a quantidade de anticorpos produzidos por cada animal através do teste de Pearson demonstrou $p=0,008$ (Figura 2).

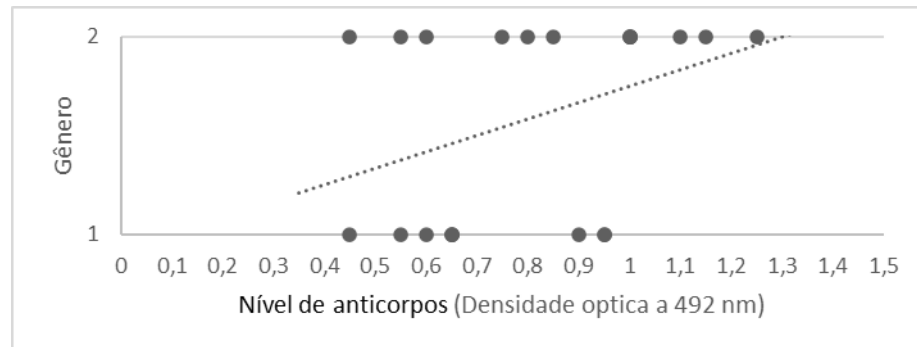


Figura 2 - Correlação do nível de anticorpos com o gênero. Correlação dos valores de ELISA com o gênero [macho (2) e fêmea (1)], apresentando a linha de tendência entre os maiores valores e o gênero macho castrado.

Os animais que produziram os mais altos níveis de anticorpos anti-SARS-CoV-2, apresentaram também a contagem de plaquetas elevada ($p=0,007$) (Figura 3).

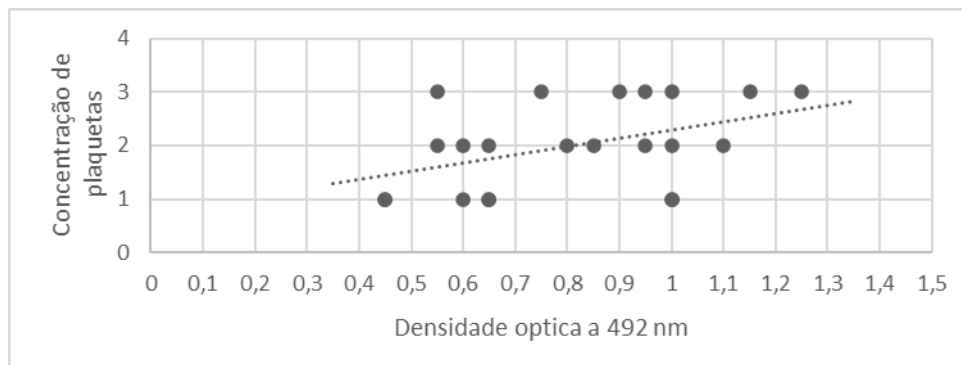


Figura 3 - Correlação da concentração de plaquetas com o nível de anticorpos. Plaquetas de 0 a 137 = 1, plaquetas de 138 a 197 = 2, plaquetas de 198 a 400 = 3.

Realizando a correlação entre as maiores concentrações de anticorpos e as maiores concentrações de plaquetas com o gênero, para analisar a influência das plaquetas no processo de produção de anticorpos, não se obteve correlação com ambos os gêneros, são

necessários mais estudos para definir a possível influência das plaquetas na produção de anticorpos.

A importância da concentração de plaquetas para a produção de anticorpos, se justifica através da presença de fatores de crescimento e estímulo ao sistema imune (VENDRAMIN et al., 2006). As plaquetas são fonte de fatores proliferativos, Souza et al. (2014) observaram a maior quantidade de fatores de crescimento na pele de equinos, após tratamento com plasma rico em plaquetas. As plaquetas armazenam uma grande quantidade de fatores de crescimento, que são peptídeos sinalizadores responsáveis pela regulação do metabolismo celular, este processo de regulação ocorre pelas vias de sinalização intracelular pela interação com um grupo de receptores de superfície celular resultando no aumento da transcrição dos fatores e produção de proteínas que desencadeiam a proliferação e diferenciação celular, além do aumento da produção da matriz extracelular (DAHLGREN et al., 2001).

Machos e fêmeas diferenciam-se entre si desde sua anatomia e fisiologia hormonal até a diferente capacidade de resposta imune (KLEIN, 2000), tais diferenças biológicas, baseiam-se no material genético diferente que carregam machos e fêmeas (MUSSÁ et al., 2018). Alguns estudos já reportaram a influência dos mecanismos imunológicos que são afetados por hormônios sexuais (BOUMAN et al., 2005; KLEIN, 2000; ROBERTS et al., 2001). Os machos castrados foram os animais que apresentaram os maiores níveis de IgG específica aos antígenos de SARS-CoV-2. Na Figura 2 observa-se que machos castrados tiveram maiores valores no ELISA para anticorpos contra o SARS-CoV-2. Os hormônios sexuais possuem uma influência direta no controle e desenvolvimento de resposta imunológica (REIS et al., 2021). A testosterona tem uma característica imunossupressora, podendo levar a uma limitada resposta pró-inflamatória, por sua vez a progesterona e o estradiol desenvolvem um papel modulador do sistema imune suprimindo a capacidade de resposta (VÁZQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2018), desta forma machos castrados podem sofrer menores influências dos hormônios sexuais na sua capacidade de resposta imune. Entretanto, estudar o possível papel hormonal na resposta contra os antígenos de SARS-CoV-2 estava fora do escopo do presente estudo.

CONCLUSÃO

O processo de produção de soro hiperimune contra o SARS-CoV-2 causou alterações inflamatórias locais e sistêmicas transitórias, porém as reações se reverteram sem causar danos relevantes aos animais. Os equinos machos castrados, quando comparados com fêmeas, produziram níveis mais elevados de anticorpos contra o SARS-CoV-2. Mais estudos são necessários para esclarecer a relação das plaquetas, bem como hormonal, no processo de produção de soro hiperimune em equinos.

CLINICAL, HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MONITORING OF EQUINES USED FOR THE PRODUCTION OF ANTI-SARS-CoV-2 HYPERIMMUNE SERUM

ABSTRACT

Discovered at the end of 2019 and named COVID-19, the infection by the Coronavirus (SARS-CoV-2), is a disease that has impacted the world in many ways, reaching the status of a pandemic. Among the treatment options, hyperimmune serum represented an effective and low-cost option, obtained through the fractionation of whole blood serum containing large amounts of antibodies. For the production, the equine species demonstrates advantages, such as the volume of blood that can be obtained, and the ease of handling. Several individual factors, such as age, body score, clinical and hematological aspects, influence the immune response to a vaccine antigen. The objective of this work was to define, through clinical and hematological parameters, the horses with the greatest potential for the production of hyperimmune serum against SARS-CoV-2. For this, 26 healthy horses were used. Blood and serum collections were performed to evaluate biochemical and hematological parameters and to monitor antibody production (indirect ELISA), respectively. Correlating the clinical and hematological data with the levels of antibodies produced 20 and 30 days after the last inoculation, it was observed that higher levels of anti-SARS-CoV-2 antibodies were produced by castrated male horses, with a high concentration of platelets. We concluded that the process of producing hyperimmune serum against SARS-CoV-2 caused transient local and systemic inflammatory reactions, but the reactions were reversed without causing relevant damage to the animals. Castrated male horses, when compared to females, produced higher levels of antibodies against SARS-CoV-2.

Keywords: Horses. Blood count. Antibodies. COVID 19. Immunity.

MONITOREO CLÍNICO, HEMATOLÓGICO Y BIOQUÍMICO DE EQUINOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE ANTI-SARS-CoV-2

RESUMEN

Descubierta a finales de 2019 y denominada COVID-19, la infección por el Coronavirus (SARS-CoV-2), es una enfermedad que ha impactado al mundo de muchas formas, alcanzando el estatus de pandemia. Entre las opciones de tratamiento, el suero hiperinmune representó una opción efectiva y de bajo costo, obtenida a través del fraccionamiento de suero de sangre total que contiene grandes cantidades de anticuerpos. Para la producción se utilizan las especies equinas que demuestren ventajas, como el volumen de sangre que se puede obtener, y la facilidad de manejo. Varios factores individuales, como la edad, el score corporal, los aspectos clínicos y hematológicos, influyen en la respuesta inmunitaria a un antígeno vacunal. El objetivo de este trabajo fue definir, a través de parámetros clínicos y hematológicos, los caballos con mayor potencial para la producción de suero hiperinmune contra el SARS-CoV-2. Para ello se utilizaron 26 caballos sanos. Se realizaron recolecciones de sangre y suero para evaluar parámetros bioquímicos y hematológicos, para monitorear la producción de anticuerpos (ELISA indirecto). Correlacionando los datos clínicos y hematológicos con los niveles de anticuerpos producidos 20 y 30 días después de la última inoculación, se observó que los caballos machos castrados, con una alta concentración de plaquetas, producían niveles más altos de anticuerpos anti-SARS-CoV-2. Concluimos que el proceso de producción de suero hiperinmune contra el SARS-CoV-2 provocó reacciones inflamatorias locales y sistémicas transitorias, pero las reacciones fueron revertidas sin causar daños relevantes a los animales. Los caballos machos castrados, en comparación con las hembras, produjeron niveles más altos de anticuerpos contra el SARS-CoV-2.

Palabras clave: Caballos. Conteo de glóbulos. anticuerpos COVID 19. Inmunidad.

REFERÊNCIAS

BETIOL, P. S.; TÁVORA, J. P. F.; PARRA, A. C.; et al. Determinação sérica de colesterol e triglicérides em cavalos soro produtores alimentados com concentrados com teores de 15% ou 22% de proteína bruta. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, suplemento, p. 20-26, 2008.

BOUMAN, A.; HEINEMAN, M. J.; FAAS, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**. v. 11, n. 4, p. 411-423, 2005.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. The convalescent sera option for containing COVID-19. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 4, p. 1545-1548, 2020.

CHEN, L.; XIONG, J.; BAO, L.; et al. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. **The Lancet - Infectious Diseases**, v. 20, p. 398-400, 2020.

CLAASSEN, E.; LEEUW, W.; GREEVE, P.; et al. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. **Research In Immunology**, v. 143, n. 5, p. 478-483, 1992.

CRISMAN, M. V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K. L. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 24, n. 2, p. 285-297, 2008.

DAHLGREN, L. A.; NIXON, A. J.; BROWER-TOLAND, B. D. Effect of beta aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 10, p. 1557-1562, 2001.

DI FILIPPO, P. A.; SANTANA, Á. E.; REZENDE, L. G. Estudo comparativo entre as técnicas de Schalm e de Clauss na determinação da concentração plasmática do fibrinogênio em equinos hípidos e com cólica. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1231-1236, 2009.

ERHABOR, O.; ADIAS, T. C. From whole blood to component therapy: the economic, supply/demand need for implementation of component therapy in sub-Saharan Africa. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 18, n. 5-6, p. 516-526, 2011.

ESCODRO, P. B.; BERNARDO, J. O.; ROVERI, E. G.; et al. Padronização da técnica de plasmaférese automatizada em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1049-1056, 2013.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2017. 538p.

HE, P.; ZOU, Y.; HU, Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 477-488, 2015.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L.; et al. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 4, p. 371-372, 1983.

IB - INSTITUTO BUTANTAN. **Soros e vacinas**. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/soros-e-vacinas/soros>>. Acesso em 01 de novembro de 2020.

JENSEN, T.; HALVORSEN, S.; GODAL, H. C.; et al. Discrepancy between fibrinogen concentrations determined by clotting rate and clottability assays during the acute-phase reaction. **Thrombosis Research**, v. 100, n. 5, p. 397-403, 2000.

- KLEIN, S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 6, p. 627-638, 2000.
- LU, C.; MURAKOWSKI, D. K.; BOURNAZOS, S.; et al. Enhanced clearance of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies against HIV-1 *in vivo*. **Science**, v. 352, n. 6288, p. 1001-1004, 2016.
- MÖLLER, L.; SCHÜNADEL, L.; NITSCHKE, A.; et al. Evaluation of virus inactivation by formaldehyde to enhance biosafety of diagnostic electron microscopy. **Viruses**, v. 7, n. 2, p. 666-679, 2015.
- MOTA, R. G.; NASCIMENTO, E. E. Estudo, características *Post mortem* e possíveis medidas de prevenção na ocorrência dos casos de amiloidose hepática em equinos utilizados para produção de soros hiperimune. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 13, n. 1, p. 27-32, 2019.
- MUSSÁ, T.; BERO, D.; COSSA-MOIANE, I.; et al. Diferenças de Género e Sexo na Susceptibilidade às Doenças Infecciosas. **Revista Moçambicana de Ciências de Saúde**, v. 4, n. 1, p. 37-40, 2018.
- PARRA, A. C.; TÁVORA, J. P. F.; FERREIRA, R. A.; et al. Alterações hematológicas durante a imunização e após a sangria e plasmaferese em equinos de produção de soro hiperimune anticrotálico. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1225-1230, 2009.
- PRATANAPHON, R.; AKESOWAN, S.; KHOW, O.; et al. Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (*Naja kaouthia*). **Vaccine**, v. 15, n. 14, p. 1523-1528, 1997.
- REIS, D. M.; GAMA, L. P. S. R.; TEIXEIRA, I. A.; et al. A influência dos hormônios sexuais na resposta imunológica da COVID-19: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 11, p. 1-10, 2021.
- ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 476-488, 2001.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 3. ed. Vol. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.
- SILVA, L. C.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; et al. Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarreia viral bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 201-206, 2004.
- SOBRINHO, A. P.; MEIRELLES, L. G.; DACASA, J. A. L.; et al. Avaliação hematológica dos equinos produtores de soros hiperimunes antitoxotrópico da fazenda Vital Brazil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 1, p. 61-62, 2013.

- SOUZA, M. V.; PINTO, J. O.; COSTA, M. M.; et al. Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 599-612, 2014.
- SPEIRS, V. C. **Exame Clínico de Equinos**. Porto Alegre: Artmed, 1999. 366p.
- STATISTIX. **Statistix 10 - Data analysis software for researchers**, 2022. Disponível em: <<https://www.statistix.com/>> .
- TAMZALI, Y.; GUELFY, J. F.; BRAUN, J. P. Plasma fibrinogen measurement in the horse: comparison of Millar's technique with a chronometric technique and the QBC-Vet Autoreader. **Research in Veterinary Science**, v. 71, n. 3, p. 213-217, 2001
- THEML, H.; DIEM, H.; HAFERLACH, T. **Color Atlas of Hematology: Practical Microscopic and Clinical Diagnosis**. 2. ed. New York: Thieme Stuttgart, 2004. 209p.
- VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, E. R.; GARCÍA-GÓMEZ, E.; CAMACHO-ARROYO, I.; et al. Sexual dimorphism in bacterial infections. **Biology of Sex Differences**, v. 9, n. 27, p. 1-20, 2018.
- VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24-28, 2006.
- WAGHMARE, A.; DEOPURKAR, R. L.; SALVI, N.; et al. Comparison of Montanide adjuvants, IMS 3012 (Nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (Emulsion based) alongwith incomplete Freund's adjuvant for hyperimmunization of equines used for production of polyvalent snake antivenom. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 1067-1072, 2009.
- WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.) **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2010. 1456p.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **COVID-19 Weekly Epidemiological Update**, Edition 120 published 30 November 2022. 2022. Disponível em: <file:///C:/Users/pricc/Downloads/20221130_Weekly_Epi_Update_120.pdf>. Acesso em 30 de novembro de 2022.

*Autor para correspondência:
Marcos Eduardo Neto.*

*Hospital de Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Campus
Universitário Capão do Leão S/Nº. Capão do Leão (RS). CEP 96160-000.
netomarcoseduardo@gmail.com*