

## IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA EMA-2 RECOMBINANTE DE *Theileria equi*

YASMINE ALVES MENEGON<sup>1</sup>; ANA MUÑOZ VIANNA<sup>2</sup>; ANA PAULA DE SOUZA STORI DE LARA<sup>2</sup>; GUILHERME BORGES WEEGE<sup>2</sup>; RODRIGO CASQUERO CUNHA<sup>2</sup>; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – yasminealves27@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – a.munozvianna@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – ana.paula.central@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – gweege@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha\_vet@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

*Theileria equi* é um protozoário que parasita leucócitos, eritrócitos e células endoteliais de mamíferos (GARCIA, 2008). Esse protozoário é distribuído em todo o mundo e sua prevalência está relacionada com a presença de carrapatos responsáveis por sua transmissão. *Theileria equi* são organismos unicelulares que não produzem esporos, não tem flagelos, cílios ou formam pseudópodes, sendo parasitos intracelulares obrigatórios.

Os carrapatos adultos e ninfas transmitem a doença pois ao se alimentarem de um hospedeiro parasitado, ingerem eritrócitos infectados (REGO, 2008). Uma vez os esporozoítos presentes na saliva do carrapato, este os inocula em um novo hospedeiro suscetível quando do seu repasto. Em equídeos domésticos essa doença torna-se relevante, pois além dos sinais clínicos que vão desde queda de desempenho até óbitos, ainda é fator de restrição ao trânsito de equídeos (Sevinc et al. 2008). Tal fato interfere diretamente em grandes eventos internacionais, como as Olimpíadas, que em 2016 acontecerão no Brasil.

Os antígenos de superfície (EMAs- *Equi Merozoite Antigens*) exercem importante papel na aderência e penetração de *T. equi* nas células dos hospedeiros, desta forma tornam-se alvos especiais para a resposta imune contra este patógeno (NIZOLI, et al., 2009). EMA-2 de *T. equi* é expressa durante os vários estágios de seu ciclo, tanto no hospedeiro definitivo como no vetor (UETI, M. W. et al., 2003), sendo assim um excelente candidato como antígeno na detecção de anticorpos contra este parasito.

Dentre as estratégias utilizadas para a produção de antígenos, a utilização da levedura *Pichia pastoris* tem recebido especial destaque (TORRES & MORAES, 2000), uma vez que conciliam vantagens na manipulação genética associada ao crescimento em meios de cultivo simples, facilitando a sua utilização em escalas industriais (CEREGHINO & CREGG, 2000). No presente trabalho, por Imunofluorescência indireta e ELISA indireto, foi testada a imunogenicidade da proteína EMA-2 recombinante (rEMA-2) expressa em *Pichia pastoris*, no soro de camundongos previamente vacinados com a proteína.

### 2. METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido com 10 camundongos BALB/c, fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, aprovado pelo Comitê de Ética da UFPEL (CEEA 4256-2014). Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, com 5 animais

cada. Os grupos foram classificados pelos números 1 e 2, o Grupo 1 recebeu 150 µL da vacina subcutânea contendo PBS (pH = 7,0) e os animais do Grupo 2 receberam 150 µL da vacina subcutânea contendo 50 µg de proteína rEMA-2, 15 µL de hidróxido de alumínio como adjuvante e PBS (pH = 7,0) q.s.. Os camundongos foram vacinados nos dias 0 e 14. As amostras de sangue foram colhidas através de punção submandibular nos dias 0, 14 e 28.

Os soros dos camundongos foram testados por Imunofluorescência Indireta (IFAT) de acordo com Tender & Friedhoff (1986) com algumas modificações usando-se esfregaços sanguíneos feitos com sangue de um equino com alta parasitemia de *Theileria equi* fornecido pelo Laboratório de doenças parasitárias da UFPEL. A técnica de IFAT foi realizada com a adição de 20 µL de soro dos camundongos diluído 1:80 em PBS mais 1% de soro fetal de bovino (SFB). Após incubação durante 1 h a 37 °C, a lâmina foi lavada com PBS e, em seguida, adicionado o anticorpo secundário polivalente anti-camundongo conjugado com FITC (Sigma) diluído a 1: 800 em PBS. Incubou-se durante 1 h a 37 °C e, depois da lavagem e secagem da lâmina, essa foi observada em microscópio de fluorescência (Olympus B51) com objetivas de 40 x.

A imunogenicidade de rEMA-2 também foi testada por ELISA. A placa foi sensibilizado com rEMA-2 na concentração de 200 ng. *well*. Utilizou-se os soros dos camundongos em uma diluição de 1:50 e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluído a 1: 4000.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os soros dos camundongos imunizados com a proteína rEMA-2 mostraram fluorescência positiva, demonstrando que a proteína é imunogênica e induziu a produção de anticorpos que reconheceram os antígenos dos equinos expressos no esfregaço sanguíneo (Figura 1). Da mesma forma, na técnica de ELISA a proteína mostrou imunogenicidade com diferença significativa entre a amostra de soro a partir do dia 0 (primeira vacinação), 14 (segunda dose) e 28 dias pós vacinação (Figura 2).

Figura 1: Técnica de Imunofluorescência Indireta utilizando esfregaço sanguíneo de equinos com alta parasitemia e os soros dos animais controle e vacinados com a rEMA-2, respectivamente.

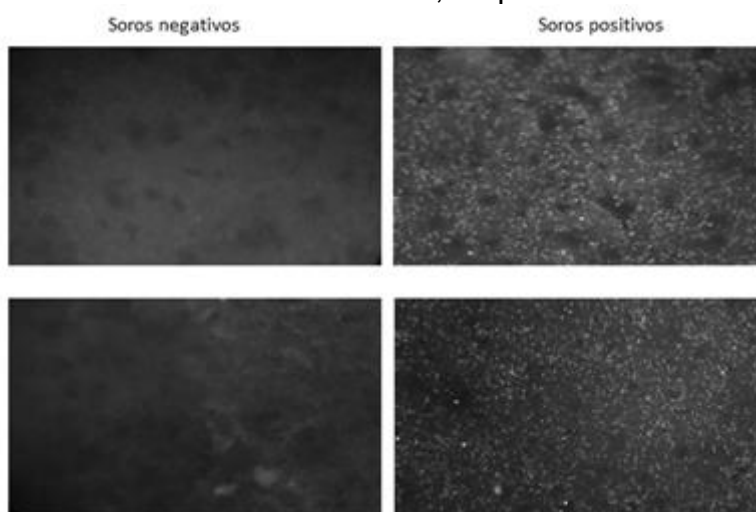
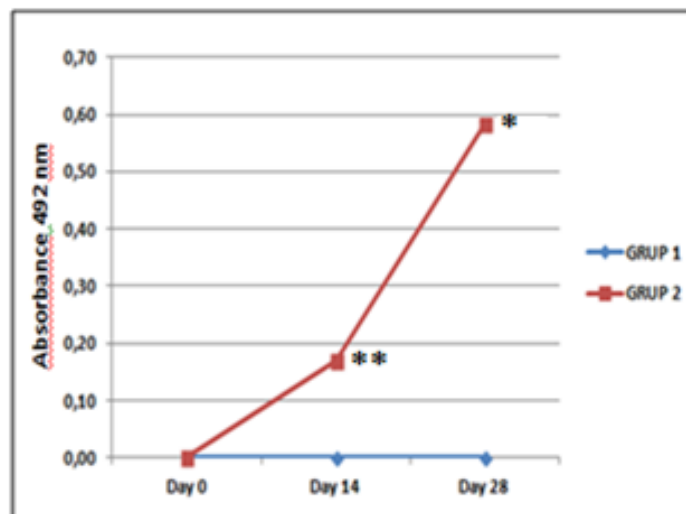


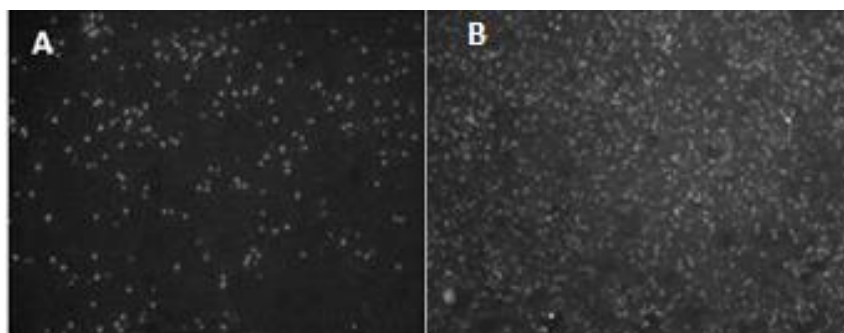
Figura 2: Cinética de produção de anticorpos neutralizantes dos animais controle (Grupo1) e vacinados com a proteína rEMA-2 (Grupo 2).



As técnicas empregadas para o diagnóstico da theileriose usadas atualmente são demoradas e dispendiosas. Métodos de microscopia direta são pouco eficazes, pois não detectam o parasito nas fases crônicas da enfermidade (HUANG et al., 2006). A detecção da theileriose equina por PCR também envolve procedimentos complexos e demorados sem custo-benefício para a rotina de diagnóstico (ALHASSAN et al., 2004). O teste de Fixação de Complemento (TFC) é restrito por limites de detecção de anticorpos e por reações cruzadas.

A proteína EMA-1 recombinante expressa em *P. pastoris* apresentou potencial para utilização como antígeno em testes imunobiológicos (NIZOLI et al., 2009). Porém, a proteína EMA-2 de *T. equi* por ser um antígeno de superfície e ser expresso em diferentes estágios do parasita se torna um alvo mais promissor que a EMA-1 para ser utilizado em imunodiagnóstico. O que foi confirmado nesse trabalho, onde a proteína apresentou imunogenicidade por IFAT e ELISA. Abaixo, a Figura 3 compara a imunogenicidade por IFAT utilizando a rEMA-1 e rEMA-2, demonstrando a maior fluorescência na proteína rEMA-2.

Figura 3: Imunofluorescência – comparação da imunogenicidade utilizando rEMA-1 (A) e rEMA-2 (B).



#### 4. CONCLUSÕES

A proteína EMA-2 recombinante de *T. equi* demonstrou-se imunogênica, induzindo a produção de anticorpos que reconheceram os antígenos do esfregaço sanguíneo na técnica de IFAT. Da mesma forma, na técnica de ELISA a proteína mostrou imunogenicidade significativa. Desta maneira, é possível sugerir que a proteína rEMA-2 de *T. equi* tem potencial imunogênico e poderá ser usada em vacinas de subunidade para os equinos.

## 5. REFERÊNCIAS

ALHASSAN, A.; PUMIDONMING, W.; OKAMURA, M.; HIRATA, H.; BATTSETSEG, B.; FUJISAKI, K.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. **Veterinary Parasitology**. V.129, p. 43- 49, 2004.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

GARCIA, L. F. P. **Alterações hematológicas encontradas em equinos com *Theileria equi* (*T. equi*) e *Babesia caballi***. 2008. Trabalho monográfico de conclusão do curso de Especialização em Patologia Clínica Veterinária. Universidade Castelo Branco. Centro de Ciências Agrárias. Sorocaba, SP.

HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; KATAYAMA, Y.; ANZAI, T.; IGARASHI, I. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. **Veterinary Parasitology**. Short communication, 2006.

NIZOLI, L. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; DUMMER, L. A.; SANTOS JR, A. G.; LEITE, F. P. L. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Brazil. **Journal Veterinary Parasitology**, v.18, 2009.

REGO, B. M.; **Estudo da Infecção Natural por Protozoários dos Gêneros *Babesia* e *Theileria* numa Exploração Coudélica do Ribatejo**. 2008. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

SEVIC F., MADEN M., KUMAS C., SEVINC M. & EKICI O.D. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. **Veterinary Parasitology**, 156:173-177, 2008.

UETI, M. W., PALMER, G. H., KAPPMAYER, L. S., SCOLES, G. A., KNOWLES, D. Expression of Equi Merozoite Antigen 2 during Development of *Babesia equi* in the Midgut and Salivary Gland of the Vector Tick *Boophilus microplus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5803-5809, 2003.

TORRES, F. A. G.; MOARES, L. M. P. de. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia, ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 20-22, 2000.