

RELAÇÃO ENTRE A VACINAÇÃO MATERNA E A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE POTROS VACINADOS COM EMA-2 RECOMBINANTE DE *Theileria equi*

ALICE CORREA SANTOS¹; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA²; ANA
MUNOZ VIANNA²; GULHERME BORGES WEEGE²; MARIANA ANDRADE
MOUSQUER²; LETICIA DA SILVA SOUZA²; JEMHALLY DILLENBURG HACK²;
FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹Universidade Federal de Pelotas – alice.cs@live.com
^{2,3}Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

Theileria equi é um hemoparásito que, juntamente com *Babesia caballi*, são os agentes causadores de piroplasmose equina (WISE et al., 2014). A doença cursa com anemia, desidratação, pirexia, perda de peso e desempenho, podendo ocorrer também de forma assintomática, através de portadores crônicos no rebanho (ROTHSCHILD, 2013). A dinâmica da resposta imunológica a *T. equi*, embora não totalmente compreendida (WISE et al., 2014), envolve a imunidade adaptativa através do desenvolvimento de memória imunológica, que atua no controle da parasitemia (CUNHA et al., 2006). Os抗ígenos de superfície do parasita são os *Equine merozoite antigens* (EMAs), que são os principais sítios de reconhecimento, e consequentemente alvos da produção de anticorpos (HUANG et al., 2006). EMA-2 são os抗ígenos imunodominantes na interação com o citoesqueleto de eritrócitos (KUMAR et al., 2015), e por este motivo vêm sendo estudados tanto para o diagnóstico como para o desenvolvimento de ferramentas profiláticas, como vacinas (KUMAR et al., 2013; KUMAR et al., 2015; VIANNA et al., 2014).

Observamos em estudos anteriores que a vacinação de éguas gestantes com EMA-2 recombinante de *T. equi* foi capaz de estimular a resposta imune humoral e produzir quantidades detectáveis de imunoglobulinas vacinais no colostrum (SANTOS et al., 2016). Entretanto, ainda é importante entender como a resposta imune humoral ocorre em potros vacinados, tendo em vista a susceptibilidade imunológica observada no organismo ainda em amadurecimento (HODGINS & SHEWEN, 2012). O objetivo deste estudo foi avaliar a modulação da resposta imune humoral de potros do nascimento até seis meses frente à vacinação com rEMA-2 de *T. equi*, relacionando com o histórico de vacinação da mãe no periparto.

2. METODOLOGIA

A proteína EMA-2 recombinante foi obtida através de clonagem e expressão em *Pichia pastoris* (VIANNA et al., 2014). A produção da vacina utilizou 200μg de rEMA-2 por dose de vacina (2ml), com adjuvante Hidróxido de Alumínio a 10%. Todo o preparo foi realizado em fluxo laminar com controle de pH (7,0) e controle bacteriológico em ágar sangue.

Foram utilizados 18 potros pertencentes ao CEEEP UFPel (Centro de Estudo, Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma) nascidos nas temporadas reprodutivas de 2015 e 2016. Os potros foram avaliados desde o nascimento até o 6º mês de vida, onde foi realizada avaliação clínica e coletas de sangue para obtenção do soro sanguíneo. As coletas foram realizadas com 0 horas (nascimento), 12, 24 e 48 horas de vida, com 07 e 15 dias, e mensalmente do 1º ao 6º mês de vida. O parto foi assistido e com mínima intervenção em todas

as éguas. Antes da primeira mamada do potro, foram coletados 2ml de colostrum para posterior análise (Registro no Comitê de Ética e Experimentação Animal UFPel nº 8247).

Os animais foram divididos em três grupos: Grupo 1) Potros vacinados provenientes de mães vacinadas (n=8); Grupo 2) Potros vacinados provenientes de mães não vacinadas (n=6) e Grupo 3) Controle - Potros não vacinados provenientes de mães não vacinadas (n=4). O esquema vacinal nos potros dos Grupos 1 e 2 foi realizado a partir do 2º mês de vida, em três doses da vacina rEMA de *T. equi* via intramuscular, com intervalo de 21 dias entre as aplicações.

No processamento das amostras, a técnica para detecção de anticorpos foi ELISA indireto, utilizando como antígeno a proteína rEMA-2, conforme protocolo descrito por VIANNA et al. (2014). Os testes foram realizados com soros e colostros. Na análise estatística foram utilizadas Análise de Variância e comparação entre as médias pelo teste LSD, através do software Statistix 8.0® (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA), utilizando $p<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de realização do estudo não houveram reações vacinais ou efeitos colaterais causados pela rEMA-2 de *T. equi*. Os animais não apresentaram alterações clínicas, tampouco foram observadas infestações por carrapatos. A tabela 1 indica os resultados obtidos através de ELISA indireto para as amostras de soro e colostrum equino avaliadas.

Tabela 1 - ELISA indireto de soro e colostrum equino. Média e desvio padrão da absorbância em leitura óptica (492nm) entre os grupos. Grupo 1) Potros vacinados provenientes de mães vacinadas (n=8); Grupo 2) Potros vacinados provenientes de mães controle (n=6) e Grupo 3) Potros controle provenientes de mães controle (n=4). As letras a e b indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

	Grupo 1 (n=8)	Grupo 2 (n=6)	Grupo 3 (n=4)
Colostrum	1,4769±0,4294a	0,6705±0,007b	0,5558±0,1999b
12 horas	0,9037±0,3444a	0,1462±0,1078b	0,1966±0,0617b
24 horas	0,8154±0,3239a	0,1405±0,1266b	0,1497±0,0177b
48 horas	0,8175±0,3227a	0,1305±0,0792b	0,1166±0,059b
07 dias	0,7679±0,3069a	0,0998±0,052b	0,0832±0,0712b
15 dias	0,6583±0,2843a	0,0253±0,0357b	0,0770±0,0632b
1º mês	0,4297±0,2091a	0,0130±0,0184b	0,0616±0,0494b
2º mês	0,2351±0,1471a	0,056±0,001a	0,0509±0,0388a
3º mês	0,5196±0,4282a	0,7065±0,3514a	0,0666±0,0698b
4º mês	1,122±0,3568a	1,269±0,3429a	0,0909±0,1117b
5º mês	1,080±0,2538a	1,041±0,4052a	0,0749±0,0887b
6º mês	0,9426±0,1513a	0,7310±0,3239ab	0,1024±0,1186b

Conforme demonstra a Tabela 1, a concentração de imunoglobulinas no colostrum das éguas do Grupo 1 foi superior aos Grupos 2 e 3 ($p<0,05$), decorrente da vacinação com rEMA-2 no periparto. A absorção efetiva das imunoglobulinas através de imunidade passiva pode ser confirmada através dos valores alcançados logo após a primeira mamada (12 horas), que tendem a decrescer próximo do 2º mês de vida. KUMAR et al. (2013) descrevem resultados semelhantes avaliando potros provenientes de éguas infectadas por *T. equi*, que apresentaram decréscimo dos níveis de anticorpos anti-*T. equi* em torno de 63-77 dias de vida.

Para melhor compreensão da soroconversão vacinal, a Figura 1 demonstra graficamente as médias e desvio padrão das leituras de absorbância no soro equino, durante o período avaliado, nos três grupos.

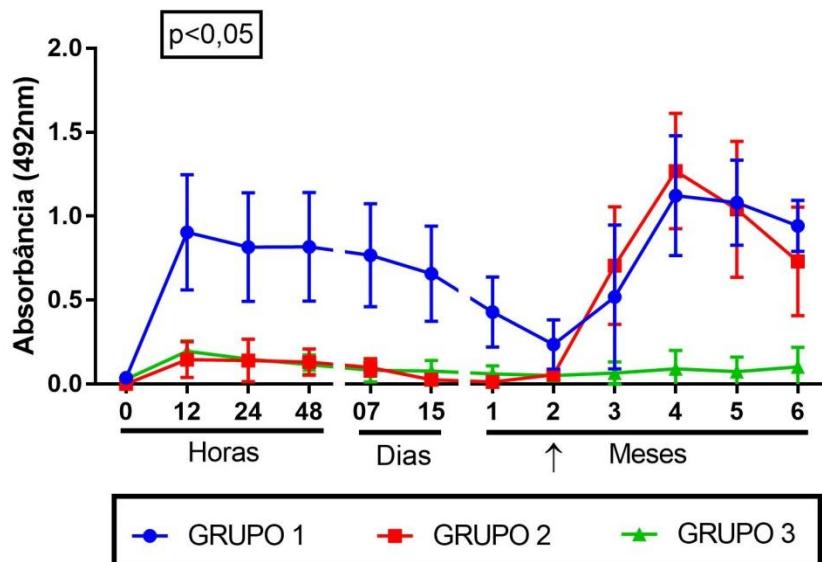


Figura 1 - ELISA indireto de soro equino. Média e desvio padrão das absorbâncias em leitura óptica (492nm) dos grupos avaliados. Grupo 1) Potros vacinados provenientes de mães vacinadas (n=8); Grupo 2) Potros vacinados provenientes de mães controle (n=6) e Grupo 3) Potros controle provenientes de mães controle (n=4). A seta indica o início do esquema vacinal nos grupos 1 e 2.

Analisando em conjunto os dados da Figura 1 e da Tabela 1, observamos que a vacinação com rEMA-2 em potros com 2 meses de vida foi capaz de estimular a produção de anticorpos. Entretanto, observamos que embora apresentem imunoglobulinas anti-EMA-2 de *T. equi* prévio a vacinação, potros provenientes de mães vacinadas (Grupo 1) não apresentaram diferença estatística em relação aos potros provenientes de mães não vacinadas (Grupo 2) no que tange à resposta vacinal. Em um animal adulto que já apresente anticorpos contra determinado antígeno, um *boost* vacinal tenderia a incrementar rapidamente o título de anticorpos contra tal patógeno em razão da memória imunológica (GOEHRING et al., 2010). É possível que as imunoglobulinas colostrais não causem o mesmo efeito por terem sido adquiridas de forma passiva, e não produzidas pelo próprio sistema imune do potro.

Em nosso trabalho, optamos por avaliar a resposta vacinal de potros a partir do 2º mês de vida em função da janela imunológica decorrente do declínio de imunoglobulinas passivas (2º mês) até o estabelecimento eficiente da imunidade ativa (4º mês) (PERKINS & WAGNER, 2015). Alguns autores indicam que os anticorpos adquiridos via imunidade passiva interferem na resposta humoral de potros vacinados antes do 6º mês de vida (VAN OIRSCHOT et al., 1991), e que as imunoglobulinas colostrais possam ter efeito supressor nas células B de potros jovens (PERKINS & WAGNER, 2015; TIZARD, 2014). Entretanto, observamos que os potros do Grupo 1 não apresentaram diferença na produção de anticorpos quando comparados aos potros do Grupo 2, os quais não apresentavam níveis significativos prévios de imunoglobulinas colostrais.

4. CONCLUSÕES

A vacinação de éguas no periparto com rEMA-2 de *T. equi* contribui para o fornecimento de imunoglobulinas colostrais nos primeiros momentos de vida, e sem dúvida tem importante papel na imunidade de potros ainda em

amadurecimento. Entretanto, estas imunoglobulinas, uma vez alcançado níveis basais (2º mês de vida), não parecem interferir na magnitude da resposta imune quando o animal é exposto novamente ao antígeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUNHA, C.W., McGUIRE, T.C., KAPPMEYER, L.S., HINES, S.A., LOPEZ, A.M., DELLAGOSTIN, O. A. Development of specific immunoglobulin Ga (IgGa) and IgGb antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 13, p. 297–300, 2006.

GOEHRING, L.S., WAGNER, B., BIGBIE, R., HUSSEY, S.B., RAO, S., MORLEY, P.S.; LUNN, D.P. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. **Vaccine**. v. 28, p. 5203-5211, 2010.

HODGINS, D.C. & SHEWEN, P.E. Vaccination of neonates: Problem and issues. **Vaccine**. v. 30, p. 1541-1559, 2012.

HUANG, X., XUAN, X., VERDIDA, R. A., ZHANG, S., YOKOYAMA, N., XU, L., IGARASHI, I. Immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of *Babesia caballi* and *B. equi* infections in horses. **Clinical Vaccine and Immunology**. v.13, n.5, p. 553-555, 2006.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; GUPTA, A.K.; YADAV, S.C.; GOYAL, S. K.; KHURANA, S.K.; et al Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. **Veterinary Parasitology**, v.198, p.10-17, 2013.

KUMAR, S.; RAKHA, N.K.; GOYAL, L.; GOEL, P.; KUMAR, R.; KUMAR, A.; KUMAR, S. Diagnostic application of recombinant equine merozoite surface antigen-1 in ELISA for detection of *Theileria equi* specific antibodies. **Japanese Journal of Veterinary Research**. v. 63, n.3, p.129-137, 2015.

PERKINS, G.A. & WAGNER, B. The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. **Equine Veterinary Journal**. v.47, p. 267 – 274, 2015.

ROTHSCHILD, C. M. Equine piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.33, p.497-508, 2013.

SANTOS, A.C.; LEITE, F.P.L.; WEEGE, G. B.; VIANNA, A. M.; LEAL, L.L.C.; NOGUEIRA, C.E.W. In: **XVIII ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO UFPEL**, 18., Pelotas, 2016. Anais do XVIII Encontro de Pós Graduação da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, 2016. Acessado em 23 set. 2017. Online. Disponível em: < <http://wp.ufpel.edu.br/enpos/anais/anais2016/>>.

TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária 9. ed.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

VAN OIRSCHOT, J.T., BRUIN, G., DE BOER-LUYTZE, E.; SMOLDERS, G. Maternal antibodies against equine influenza virus in foals and their interference with vaccination. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B**. v. 38, p. 391-396, 1991.

VIANNA, A.M.; GONÇALES, R.A.; LARA, A.P.S.S.; PINTO, L.S.; NIZOLI, L.Q.; LEITE, F.P.L. Expressão heteróloga da EMA-2 (*equi merozoite antigen*) de *Theileria equi* em *Pichia pastoris* com potencial utilização em imunobiológicos. **Ciência Rural**. v. 44, n.10, p. 1830 - 1836, 2014.

WISE, L. N; PELZEL-McCLUSKEY, A. M; MEALEY, R.H; KNOWLES, D.P. Equine piroplasmosis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 30, p. 677–693, 2014.