UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária

Dissertação

Resposta vacinal à proteína recombinante EMA-2 de *Theileria equi* em éguas prenhes e seu reflexo no neonato

Alice Correa Santos

Pelotas, 2017

Alice Correa Santos

Resposta vacinal à proteína recombinante EMA-2 de *Theileria equi* em éguas prenhes e seu reflexo no neonato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S237r Santos, Alice Correa

Resposta vacinal à proteína recombinante EMA-2 de *Theileria equi* em éguas prenhes e seu reflexo no neonato. / Alice Correa Santos ; Carlos Eduardo Wayne Nogueira, orientador. — Pelotas, 2017.

31 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Resposta imune humoral. 2. Éguas gestantes. 3. Potros. 4. Vacina. 5. EMA-2 recombinante. I. Nogueira, Carlos Eduardo Wayne, orient. II. Título.

CDD : 636.1

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Alice Correa Santos

Resposta vacinal à proteína recombinante EMA-2 de *Theileria equi* em éguas prenhes e seu reflexo no neonato

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 10/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade de Wisconsin

Dra. Lorena Alvariza Amaral
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Ana Muñoz Vianna
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

À Deus, soberanamente justo e bom.

Aos meus pais, Cezar Augusto e Adriana, pela oportunidade da vida, os ensinamentos, o apoio e o amor incondicionais em todos os passos da minha caminhada.

Ao meu companheiro, amigo e amor, Wilian. Obrigada por entender meus anseios e adequar tua vida na minha, de eterna estudante.

Á minha família, em especial à minha irmã Amanda, meu Tio Vinícius e minha avó Lorena, por me auxiliarem sempre que precisei, e acima de tudo serem meus grandes incentivadores.

Á família ClinEq, pelo companheirismo e auxílio durante a execução do experimento. Agradecimento especial às amigas do coração, Bruna Suñé, Ilusca Finger e Vitória Müller, por me devotarem os mais sinceros sentimentos de amizade.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia da UFPel, especialmente a Ana Vianna e Guilherme Weege, pelo auxílio na execução do trabalho, bem como as trocas de ideias sempre construtivas.

Á todos os professores que colaboraram com a minha formação moral e intelectual, desde o princípio.

Ao Professor Fábio Leivas Leite, pelo acolhimento, atenção dispensada e ensinamentos durante todo o período da execução deste trabalho.

Ao Professor Carlos Eduardo Wayne Nogueira, pela dedicação, seriedade e responsabilidade pela qual orienta seus alunos. Sinto-me orgulhosa e feliz por ter sido sua orientada.

Resumo

SANTOS, Alice Correa. **Resposta vacinal à proteína recombinante EMA-2 de *Theileria equi* em éguas prenhes e seu reflexo no neonato**. 2017. 31p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O objetivo desse estudo foi avaliar a dinâmica da resposta imune humoral à vacina elaborada com proteína rEMA-2 de *T. equi* em éguas gestantes, bem como a transmissão de imunidade passiva ao neonato. A piroplasmose equina, causada por *T. equi*, tem impacto sanitário e econômico internacional. Éguas gestantes infectadas cursam com abortos e danos ao neonato, caracterizando grande susceptibilidade à doença no período neonatal. A vacina foi produzida através de clonagem do gene de expressão de EMA-2 e expressa em *Pichia pastoris*, utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante. Foram utilizadas 18 éguas gestantes divididas em dois grupos, sendo um grupo vacinado com rEMA-2 a partir dos 300 dias de gestação em três doses, e outro grupo controle. Os 18 potros provenientes das mães de ambos grupos foram avaliados até o 6º mês de vida em relação aos anticorpos obtidos através da imunidade passiva. No 2º mês de vida um grupo de potros recebeu esquema vacinal com rEMA-2, buscando avaliar a dinâmica da resposta imune ativa. ELISA indireto foi o teste de eleição para todas as amostras avaliadas. A vacina rEMA-2 desenvolveu imunidade humoral nas éguas gestantes vacinadas, com aumento na produção de imunoglobulinas 2,3 vezes o valor basal. A concentração de imunoglobulinas vacinais no colostro, bem como no soro de potros provenientes de éguas vacinadas, demonstraram que houve passagem de imunoglobulinas vacinais aos neonatos através de imunidade passiva. Os potros que passaram por esquemas vacinais a partir do 2º mês de vida obtiveram incremento de 8,3 vezes o valor basal de anticorpos. O esquema vacinal com rEMA-2 estimulou a imunidade humoral em éguas gestantes, que concentraram imunoglobulinas vacinais no colostro. Potros provenientes destas obtiveram incremento nos níveis séricos de anticorpos após a primeira mamada.

Palavras-chave: Resposta imune humoral; éguas gestantes; potros; vacina; EMA-2 recombinante

Abstract

SANTOS, Alice Correa. **Vaccine response to EMA-2 recombinant protein of *Theileria equi* in pregnant mares and its reflex in the newborn.** 2017. 31p. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The aim of this study was to evaluate the dynamic of the humoral immune response to recombinant EMA-2 to *T. equi* in pregnant mares, as well the transfer of passive immunity to the foal. Equine piroplasmosis, caused by *T. equi*, has severe economic and sanitary international impact. Pregnant mares infected can lead to abortion and neonatal damage, which makes the neonatal period critical for this disease. The vaccine was produced through cloning the EMA-2 expression gene and expressed in *Pichia pastoris*, and aluminum hydroxide was used as adjuvant. Eighteen pregnant mares were used, which were divided in Control and Vaccinated that received three doses of rEMA-2 starting at 300 days of gestation. The 18 foals delivered both groups was evaluated until 6 months of life with respect the antibodies obtained through passive immunity. On 2nd month of life, a grouo of foals received vaccinal scheme with EMA-2, looking evaluate the dynamic of active immune response. Indirect ELISa was the chosen test for all samples. The rEMA-2 vaccine developed humoral immunity in vaccinated pregnant mares that showed an increment on antibody levels of 2.3 times when comparing to the baseline values. Concentration of vaccinal antibodies in colostrum and serum of foals delivered by vaccinated mares showed that antibodies were transfered to foals through passive immunity. Foals that received vaccinal scheme after 2nd month of life showed an increment on antibody levels of 8.3 times when comparing to the baseline values. The vaccine scheme with rEMA-2 was able to stimulate the humoral immunity in pregnant mares. Vaccinated mares concentrated vaccine immunoglobulins in colostrum. Foals delivered by these mares had an increment in serum levels of vaccine antibodies after the first nurse.

Keywords: Humoral immune response; pregnant mares; foals; vaccine; recombinant EMA-2

Lista de Figuras

Figura 1 ELISA indireto. Média e desvio padrão da absorbância em leitura óptica (492 nm) entre os Grupos Vacinado (n=9) e Controle (n=9). As coletas 1, 3 e 5 coincidem com a administração das doses de vacina rEMA-2 no Grupo Vacinado. Os * demonstram diferença estatística entre os grupos (p<0,05)..... 21

Figura 2 ELISA indireto. Média e desvio padrão da absorbância em leitura óptica (492 nm) entre os grupos de potros Provenientes de Éguas Vacinadas (n=9) e Provenientes de Éguas Controle (n=9), desde as 12 horas até o 6º mês de vida. Os * demonstram diferença estatística entre os grupos (p<0,05)..... 22

Figura 3 ELISA indireto. Média e desvio padrão da absorbância em leitura óptica (492 nm) entre os grupos de Potros Vacinados (n=4) e Potros Controle (n=14). Os esquemas vacinais com rEMA-2 foram realizados no 2º e 5º mês no grupo vacinado. Os * demonstram diferença estatística entre os grupos (p<0,05)..... 22

Lista de Abreviaturas e Siglas

CEEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CEEEP	Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay)*
EMA	Antígeno de Superfície de Merozoíto (*Equine merozoite antigen)*
IFAT	Teste de Imunofluorescência Indireta *(Indirect Fluorescent Antibody* Test)
mL	Mililitros
OIE	Organização Mundial de Sanidade Animal *(World Organisation for Animal Health)*
PBMC	Célula mononuclear de sangue periférico *(Peripheral blood mononuclear cell)*
PBS-T	*Phosphate buffered saline with Tween-20*
PCR	Reação em cadeia da polimerase *(Polymerase Chain Reaction)*
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
rEMA-2	Antígeno de Superfície de Merozoíto tipo 2 recombinante
RFC	Reação de fixação do complemento *(Complement Fixation Test)*
µl	Microlitros

Lista de Símbolos

<	Menor
%	Porcentagem
®	Marca Registrada
=	Igual
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos

Sumário

1 Introdução..... 10
2 Revisão da Literatura..... 13
2.1 Etiologia..... 13
2.2 Aspectos epidemiológicos..... 14
2.3 Patogenia..... 14
2.4 Antígenos de superfície de merozoítos (EMAs)..... 15
2.5 Diagnóstico..... 16
2.5.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) no diagnóstico de *Theileria equi*..... 16
3 Artigo..... 18
4 Considerações Finais..... 25
Referências..... 26
Anexo..... 30

1 Introdução

Theileria equi é um hemoprotozoário, que juntamente com *Babesia caballi* causam a piroplasmose equina (NUTTALL & STRICKLAND, 1910), doença endêmica em regiões tropicais e subtropicais. Apesar da enfermidade apresentar a mesma manifestação clínica, *B. caballi* e *T. equi* são organismos distintos, especialmente na severidade da doença provocada, ciclo de vida, persistência no equino infectado e susceptibilidade ao tratamento. Ambos são parasitos intraeritrocitários, entretanto, *T. equi* apresenta uma fase extraeritrocitária em células polimorfonucleares, especialmente do sangue periférico (WISE et al., 2014).

Uma vez infectado por *T. equi,* o equino torna-se portador, podendo transmitir a doença a outros animais mesmo estando assintomático (WISE et al., 2014). O Brasil é considerado área endêmica para piroplasmose, o que dificulta o comércio equestre com países considerados livres da doença. No Rio Grande do Sul são registradas perdas financeiras importantes relacionadas ao acometimento de animais em treinamento e abortos causados por piroplasmose (NIZOLI et al., 2008). Diante deste cenário, o controle da doença se faz necessário, e embora não haja monitoramento efetivo, a profilaxia é fundamental tanto para o controle sanitário como para a manutenção do Estado e do Brasil no mercado equestre internacional.

A infecção pode se manifestar nas formas superaguda, aguda, subaguda e crônica (WISE et al., 2014). A forma superaguda se caracteriza pela rápida replicação da *T.equi* nos eritrócitos, sendo descrita com maior frequência em potros logo após o nascimento e animais imunossuprimidos que sejam introduzidos em áreas endêmicas, cursando com sintomatologia de icterícia, anemia, febre e em alguns casos, hemoglobinúria. A manifestação aguda caracteriza-se por pirexia, desidratação, decúbito, hiperemia de mucosas e em alguns casos envolvimento digestivo e falência hepática renal. Casos subagudos cursam com perda de peso, pirexia intermitente, anemia normocítica normocrômica, edema periférico e também com episódios intermitentes de cólica. A manifestação crônica apresenta

sintomatologia inespecífica, como perda de peso e desempenho, sendo mínima ocorrência de anemia, demonstrando danos eritrocitários mínimos (ROTHSCHILD, 2013; WISE et al., 2014).

Os carrapatos ixodídeos são os transmissores conhecidos de *T. equi*, sendo o equídeo o único reservatório do hemoparasita conhecido até o momento. Outra importante forma de transmissão é a iatrogênica, através de agulhas contaminadas, instrumental cirúrgico e principalmente transfusões sanguíneas (ROTHSCHILD, 2013). A transmissão transplacentária de *T. equi* vem sendo descrita nos últimos anos (ALLSOPP et al., 2007; CHHABRA et al., 2012; SANT et al., 2016), porém o mecanismo específico ainda não foi comprovado (WISE et al., 2014).

A transmissão de *T. equi* para o feto durante a gestação pode cursar com aborto, nascimento de um natimorto, ou nascimento de um potro que manifeste os sinais clínicos da doença já nos primeiros dias de vida (WISE et al., 2014). Medidas efetivas para prevenir a infecção do potro pela via intrauterina ainda não foram descritas, até porque não se tem conhecimento sobre a fase gestacional em que a *T. equi* infecta o feto (ROTHSCHILD, 2013). Os abortos são geralmente descritos no terço final, mas existem relatos da presença do parasita já aos 120 dias de gestação (LEWIS et al., 1999).

Inicialmente a hipótese para a transmissão transplacentária de *T. equi* era de que os animais entravam em contato com o agente através de danos placentários, os quais permitiam a mescla do sangue materno e fetal e, consequentemente, a infecção do feto (ERBSLOH, 1975). Porém, como nem todos os neonatos positivos para *T. equi* eram provenientes de gestações com danos placentários, acreditou-se que a infecção poderia se dar através da nutrição fetal por histotrofo, que é composto de secreção uterina e eritrócitos maternos, e ocorre por volta dos 40 a 150 dias de gestação, momento no qual o potro ainda não tem o sistema imune desenvolvido (ALLSOPP et al., 2007).

Tendo em vista a importância da piroplasmose equina no rebanho brasileiro, e as consequências sanitárias e financeiras que pode causar, a profilaxia da doença se torna fundamental. O combate aos carrapatos e cuidados que evitem a transmissão iatrogênica são de suma importância para evitar a transmissão horizontal. Entretanto, com a evidência do nascimento de potros portadores através da transmissão transplacentária, é importante que os mesmos sejam

imunologicamente capazes de responder contra *T. equi* nos primeiros momentos de vida ou até mesmo durante a gestação.

O objetivo desse estudo foi avaliar a dinâmica da resposta imune humoral à vacina elaborada com proteína rEMA-2 de *T. equi* em éguas gestantes, bem como a transmissão de imunidade passiva ao neonato.

2 Revisão da Literatura

2.1 Etiologia

A *T. equi* é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, parasita intracelular obrigatório. Juntamente com *B. caballi*, são causadores da doença conhecida como Piroplasmose Equina. A doença recebeu este nome em razão do formato piriforme que ambos parasitas apresentam quando infectando hemácias (ROTHSCHILD, 2013). Diferente da *B. caballi*, que apresenta apenas a forma intraeritrocitária, *T. equi* desenvolve-se inicialmente em linfócitos, infectando num segundo momento as hemácias – característica que é comum da espécie *Theileria sp*. (REHBEIN et al., 1982). Outra particularidade da *T. equi* em relação a *B. caballi*, é a divisão em quatro merozoítos nos eritrócitos, formando o corpúsculo patognomônico de "Cruz de Malta". Uma das características mais importantes que diferencia *T. equi* de *B. caballi,* é que uma vez infectado, passada a fase aguda, o animal torna-se um reservatório da doença, e na maioria dos casos, portador assintomático (WISE et al, 2014).

Os vetores conhecidos de *T. equi* são os carrapatos ixodídeos, principalmente do gênero *Amblyomma, Haemaphysalis, Hyalomma e Rhipicephalus* (MANS et al., 2015). Os equídeos são o único reservatório conhecido até o momento de *T. equi*, e mesmo em animais com parasitemia baixa, é possível que, no repasto, o carrapato seja infectado (FRIEDHOF & SOULE, 1996).

A parasitemia de *T. equi* varia em torno de 1 a 7% de hemácias infectadas. Uma vez infectado, o equino torna-se portador, e os tratamentos empregados provocam a remissão dos sinais clínicos, e não a morte do parasita. Equinos portadores são os responsáveis pela manutenção da doença nos rebanhos, e como atualmente o controle de vetores não é satisfatório, a melhor maneira de evitar a disseminação é não introduzir animais infectados em áreas livres de *T. equi* (ROTHSCHILD, 2013).

2.2 Aspectos Epidemiológicos

Na epidemiologia de *T. equi* devem ser consideradas: a distribuição geográfica do parasita e do vetor, mortalidade e morbidade da doença, riscos e controle de surtos, fatores climáticos das regiões envolvidas, resistência e susceptibilidade do hospedeiro (MANS et al., 2015).

A enfermidade está distribuída globalmente em regiões tropicais e subtropicais, com prevalência variando entre 15% e 100%, diretamente relacionada à distribuição de carrapatos aptos a transmitir o agente (TORRES et al., 2012; WISE et al., 2014). O Brasil, em razão das condições climáticas, é considerado área endêmica para *T. equi* (TORRES et al., 2012). Em um estudo epidemiológico no Rio Grande do Sul utilizando imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*T. equi,* foi observada prevalência da doença em torno de 57,9% (TORRES et al., 2012).

Altas prevalências de *T. equi* são associadas com a criação concomitante de equinos e bovinos. Esta relação sugere que, pelo menos no Brasil, o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, principal carrapato de bovinos e em muitas áreas o único encontrado também em equinos, desempenha um papel importante na transmissão do parasita (TORRES et al., 2012). Segundo TORRES et al. (2012), os equinos que são criados separadamente de bovinos apresentam soropositividade para *T. equi* em torno de 12%, já os criados no mesmo ambiente apresentam sorologia positiva de 81%. Foram encontrados apenas carrapatos *Rhipicephalus microplus* nos equinos que são criados em conjunto com bovinos, sugerindo a importância dos mesmos na transmissão da enfermidade.

2.3 Patogenia

O ciclo de vida de *T. equi* é composto por três fases distintas: esporozoíto, merozoíto e gameta. Os esporozoítos estão presentes nas glândulas salivares do carrapato, que durante o repasto sanguíneo acabam por infectar o equino. As primeiras células a serem invadidas são as PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) (WISE et al., 2014). Além de linfócitos T e B, *T. equi* tem capacidade de invadir também monócitos e macrófagos (RAMSAY et al., 2013). No interior das PBMCs, os esporozoítos desenvolvem-se em esquizontes e

posteriormente em merozoítos, que ganham a circulação parasitando eritrócitos. Os merozoítos multiplicam-se através de reprodução assexuada nos eritrócitos, e alguns diferenciam-se em gametas na circulação periférica. Quando no repasto por carrapatos, estes podem ser ingeridos, e no vetor formam novos esporozoítos através de reprodução sexuada, podendo infectar, então, outros equinos (WISE et al., 2014).

A penetração e aderência de *T. equi* nos eritrócitos do hospedeiro é facilitada pela expressão de antígenos de superfície dos merozoítos (EMAs - *equi merozoite antigen*) (KUMAR, et al., 2004). Na infecção pela via iatrogênica, os merozoítos estão presentes no sangue do animal infectado, que através de fômites podem infectar um animal sadio. A infecção pela via transplacentária já foi reportada, entretanto, o mecanismo de transmissão e o motivo pelo qual nem todos os potros provenientes de éguas positivas para *T. equi* desenvolvam a doença e nem todas as éguas positivas tenham gestações cursando com aborto ainda não foi elucidado (WISE et al., 2014).

2.4 Antígenos de superfície dos merozoítos (EMAs)

As EMAs são proteínas expressas em diferentes estágios do ciclo do parasita extra e intraeritrocitário, e tem papel imunológico no reconhecimento pelo sistema imune (KUMAR et al., 2013). EMA-1, EMA-2, EMA-3, EMA-6 e outros antígenos de baixa imunogenicidade são expressos na superfície de merozoítos (SILVA et al., 2013). Entretanto, EMA-1 e EMA-2 são os antígenos imunodominantes na interação com o citoesqueleto de eritrócitos (KUMAR et al., 2015).

EMA-2 é expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita, e no citoplasma e membrana de *T. equi*, sugerindo ser um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imune (KUMAR et al., 2013). Pesquisas com a utilização destes antígenos de superfície têm demonstrado que os mesmos podem ser empregados tanto para diagnóstico como no desenvolvimento de ferramentas seguras de profilaxia, como vacinas (KUMAR et al., 2013; KUMAR et al., 2015; VIANNA et al., 2014).

2.5 Diagnóstico

Para o eficiente controle da doença, é essencial que se desenvolvam e viabilizem testes diagnósticos sensíveis e específicos para *T. equi*, que possibilitem a detecção de animais portadores e que sejam de fácil execução, confiáveis e econômicos. O diagnóstico pode ser realizado de forma direta, com a caracterização do agente, e indireta, com a detecção de anticorpos anti-*T. equi*. Dentre os meios diretos estão a visualização microscópica do parasita em esfregaço sanguíneo, o xenodiagnóstico, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o cultivo in vitro de *T. equi*. Os meios indiretos de diagnóstico são representados pela reação de fixação do complemento (RFC), teste de imunofluorescência indireta (IFAT) e ELISA (do inglês *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) (SANTOS et al., 2009; ROTHSCHILD, 2013; MANS et al., 2015).

Dentre os testes diagnósticos aprovados pela OIE para o comércio internacional de equinos, estão IFAT e ELISA, sendo que IFAT necessita de confirmação por RFC ou ELISA. O ELISA de competição é utilizado pela OIE, sendo considerado o teste mais sensível, especialmente para portadores crônicos e assintomáticos (WISE et al., 2014)

2.5.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) no diagnóstico de *Theileria equi*

As maiores vantagens da técnica de ELISA consistem no seu elevado rendimento, baixo custo, e diagnóstico rápido para triagem de um grande número de amostras (MANS et al., 2015). ELISA indireto têm sido utilizado no diagnóstico de *T. equi* com a utilização dos antígenos de superfície recombinantes EMA-1 (KNOWLES et al., 1992; BALDANI et al., 2011) e EMA-2 (TANAKA et al., 1999; KUMAR et al., 2013, VIANNA et al. 2014).

Na comparação entre EMA-1 e EMA-2 como antígeno para imunodiagnóstico, KUMAR et al. (2013), relataram que EMA-1, por apresentar diversidade genética, poderia alterar a especificidade e sensibilidade do teste diagnóstico. Já a utilização de EMA-2 parece ser mais segura por não haver tanta diversidade genética e o ELISA utilizando-a como antígeno ter correlação com o ELISA padrão (KUMAR et

al., 2013), e níveis superiores de especificidade e sensibilidade quando comparados a Imunofluorescência (VIANNA et al., 2014).

3 Artigo

Dinâmica da resposta imune humoral em éguas gestantes e potros vacinados com EMA-2 recombinante de *Theileria equi*

Alice C. Santos, Fábio P. L. Leite, Ana M. Vianna, Guilherme B. Weege, Ilusca S. Finger, Vitória Muller, Bruna R. Curcio e Carlos E. W.Nogueira

Submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Dinâmica da resposta imune humoral em éguas gestantes e potros vacinados com EMA-2 recombinante de *Theileria equi*

Alice C. Santos[1*], Fábio P. L. Leite[2], Ana M. Vianna[2,3], Guilherme B. Weege[3], Ilusca S. Finger[2], Vitória Muller[1], Bruna R. Curcio[1] e Carlos E. W. Nogueira[1]

ABSTRACT. *Theileria equi* is one of the hemoprotozoan agents of the equine piroplasmosis, a disease that has severe economic and sanitary international impact. Besides the clinical presentation, it can cause abortion and neonatal damage, which makes the neonatal period susceptible to this disease. The aim of this study was to evaluate the dynamic of the humoral immune response to recombinant EMA-2 to *T. equi* in pregnant mares and foals, as well the transfer of vaccine antibodies through the colostrum. Thirty-six horses were used, which 18 were pregnant mares and 18 were foals. The mares were divided into Control and Vaccinated groups, which received three doses of rEMA-2 every 21 days starting at 300 days of gestation. For vaccine production, EMA-2 expression gene was cloned and expressed in *Pichia pastoris*. Foals from Vaccinated and Control groups were evaluated until the sixth month of life. The production of antibodies in foals submitted to the rEMA-2 vaccination scheme starting at the 2nd month of life was also evaluated. On the end of the vaccine scheme, vaccinated mares showed an increment on antibody levels of 2.3 times when comparing to the baseline values. The colostrum of vaccinated mares presented antibody titre of 1.0432±0.33. Foals delivered by vaccinated mares presented an average greater than those from control mares after the first nurse (12 hours). Vaccinated foals received three doses of the vaccine every 21 days starting at the 2nd month of life. These foals showed an increment on antibody levels of 8.3 times when comparing to the baseline values. The vaccine scheme with rEMA-2 was able to stimulate the humoral immunity in pregnant mares. Vaccinated mares concentrated vaccine immunoglobulins in colostrum. Foals delivered by these mares had an increment in serum levels of vaccine antibodies after the first nurse.
INDEX TERMS: *Theileria equi*, pregnant mares, foals, humoral immunity, rEMA-2.

RESUMO. *Theileria equi* é um hemoprotozoário, agente da piroplasmose equina, doença de impacto sanitário e econômico internacional. Em éguas gestantes além da doença clínica, podem ocorrer abortos e danos ao neonato, caracterizando grande susceptibilidade à doença no período neonatal. O objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica da resposta imune humoral à EMA-2 recombinante de *T. equi* em éguas gestantes e potros, bem como a transferência de anticorpos vacinais no colostro. Foram utilizados 36 equinos, sendo 18 éguas gestantes e 18 potros. As éguas foram divididas em grupo Controle e Vacinado, que receberam rEMA-2 a partir dos 300 dias de gestação em três doses com intervalos de 21 dias. Para produção da vacina, o gene de expressão de EMA-2 foi clonado e a proteína expressa em *Pichia pastoris*. Os potros provenientes de éguas Vacinadas e Controle grupos foram avaliados até o 6º mês de vida. Avaliou-se também a produção de anticorpos em potros submetidos ao esquema vacinal com rEMA-2 a partir do 2º mês de vida. Nas éguas gestantes vacinadas com rEMA-2 ocorreu o incremento de 2,3 vezes o valor basal ao final do esquema vacinal. O colostro de éguas vacinadas apresentou título médio de anticorpos de 1,0432±0,33, e potros Provenientes de éguas vacinadas apresentaram média maior que os Provenientes de éguas controle após a primeira mamada (12 horas). Os potros que passaram por esquema vacinal a partir do 2º mês de vida obtiveram incremento de 8,3 vezes o valor basal de anticorpos. O esquema vacinal com rEMA-2 foi capaz de estimular a imunidade humoral em éguas gestantes. Éguas gestantes vacinadas concentraram imunoglobulinas vacinais no colostro, e os potros provenientes destas obtiveram incremento nos níveis séricos de anticorpos vacinais após a primeira mamada.
TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Theileria equi*, éguas gestantes, potros, imunidade humoral, rEMA-2.

INTRODUÇÃO

Theileria equi é um protozoário hemoparasita, que juntamente com *Babesia caballi* são causadores da piroplasmose equina. A doença apresenta impacto epidemiológico internacional, especialmente nas áreas com presença de vetores, sendo endêmica em regiões tropicais, subtropicais e algumas áreas temperadas (Friedhoff & Soule, 1996). Diferente da *B. caballi*, que parasita somente eritrócitos, *T. equi* apresenta uma fase intraeritrocitária e uma fase extraeritrocitária em células mononucleares, tornando frequentemente o equino um portador crônico (Wise et al. 2014).

A theileriose é associada com perda de desempenho e consequentes perdas econômicas com tratamento. Além da importância sanitária, há um impacto econômico no mercado equestre internacional, pois animais portadores têm restrições no transporte e participação em eventos equestres em países considerados livres (Hussain et al. 2014). No Rio Grande do Sul (RS), *T. equi* é endêmica na população

equina, por esse motivo seu controle e profilaxia são de extrema importância, embora este monitoramento não seja efetivo (Nizoli et al. 2008).

As formas clássicas de transmissão são por carrapatos ixodídeos e via iatrogênica. A transmissão transplacentária de *T. equi* tem sido descrita nos últimos anos (Allsopp et al. 2007, Santos et al. 2009, Chhabra et al. 2012, Sudan et al. 2015), porém o mecanismo específico ainda não foi comprovado (WISE et al., 2014). Esta pode cursar com aborto no terço final de gestação, nascimento de um natimorto, ou de um potro que manifeste os sinais clínicos da doença nos primeiros dias de vida. Medidas efetivas para prevenir a infecção transplacentária ainda não foram descritas (Rothschild, 2013).

O reconhecimento de *T. equi* pelo sistema imunológico do equino se dá principalmente através dos antígenos de superfície de merozoítos (EMAs - *equi merozoite antigen*) (Kumar et al. 2015), que são expressos em diferentes estágios do ciclo do protozoário. EMA-1 e EMA-2 são expressas em diversos estágios do ciclo de vida, entretanto, EMA-2 é um dos primeiros antígenos a ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro (Kumar et al. 2013), tendo potencial para o desenvolvimento de ferramentas profiláticas, como vacinas (Kumar et al. 2013, Vianna et al. 2014).

Por ser prejudicial à saúde da égua gestante, capaz de provocar abortos e danos ao neonato, *T. equi* tem grande importância durante a gestação e período perinatal. Neste contexto, a imunização de éguas prenhes é uma alternativa para o fortalecimento da imunidade materna e transmissão de anticorpos via imunidade passiva ao potro. O objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica da resposta imune humoral à EMA-2 recombinante de *T. equi* em éguas gestantes e potros, bem como a transferência de anticorpos vacinais no colostro.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. O experimento foi conduzido com 36 equinos no Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEEP), Universidade Federal de Pelotas, RS. Destes, 18 éguas gestantes e 18 potros provenientes das mesmas. Após o diagnóstico de gestação positivo, as éguas foram alojadas em piquetes com pastagem cultivada de azevém (*Lolium multiflorum*), com água *ad libitum*, onde foram mantidas até o momento do parto. Todos os partos foram assistidos em baias previamente higienizadas, e após 24 horas de nascimento do potro, retornavam aos piquetes, onde foram mantidos até o término do experimento.

Esquema vacinal e coleta de amostras. Para a obtenção de EMA-2, utilizou-se o protocolo descrito por Vianna et al. (2014). Para a produção da vacina, foram utilizados 200µg da proteína recombinante, acrescido do adjuvante Hidróxido de Alumínio a 10%, na dosagem de 2ml. O esquema vacinal experimental foi realizado em três aplicações com intervalo de 21 dias. Foram administrados 2ml da vacina rEMA-2 via intramuscular, na musculatura peitoral, mediante antissepsia.

As 18 éguas gestantes avaliadas foram divididas em dois grupos: Grupo Vacinado (n=9) e Grupo Controle (n=9). O Grupo Vacinado foi acompanhado semanalmente a partir dos 300 dias de gestação até o término do esquema vacinal, com aferição dos parâmetros clínicos e coletas de sangue. Foram aplicadas doses da vacina aos 300, 321 e 342 dias. O Grupo Controle foi acompanhado no mesmo período, com aferição dos parâmetros clínicos e coletas de sangue.

Durante os partos, imediatamente após a exposição da bolsa amniótica, foram coletados 2ml de líquido amniótico em seringas estéreis. Após o nascimento e primeiros cuidados, os neonatos foram divididos em dois grupos: Provenientes de Éguas Vacinadas (n=9) e Provenientes de Éguas Controle (n=9). Previamente à primeira mamada, foram coletados 2ml de colostro. Foram realizadas coletas de sangue às 12 horas de vida, 07 dias, e do 1º ao 6º mês de vida, mensalmente.

Posteriormente, no 2º mês de vida, os 18 potros foram novamente divididos em grupos distintos para que houvesse comparação entre: Grupo de Potros Vacinados (n=4) e Grupo de Potros Controle (n=14). O primeiro esquema vacinal foi realizado no 2º mês de vida e o segundo a partir do 5º mês de vida. Ambos os grupos – Potros Vacinados e Potros Controle – tiveram acompanhamento clínico semanal, com coletas de sangue mensal até o 6º mês de vida.

Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA-UFPel), número de registro 8247.

Para as coletas de sangue, foi realizada venopunção da jugular esquerda com tubos sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 400G e separado o soro em frascos do tipo eppendorf para congelamento a -20°C, e posterior análise laboratorial. As amostras de líquido amniótico e colostro foram acondicionadas em frascos do tipo eppendorf, congeladas a -20°C e posteriormente analisadas.

Análise laboratorial. Todas as amostras colhidas (soro, líquido amniótico e colostro) foram analisadas pela técnica de ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay), conforme protocolo descrito por Vianna

et al. (2014). A leitura das placas foi realizada no leitor de micro placas (TP-READER – Thermo Plate), utilizando comprimento de onda de 492nm.

Análise estatística. A análise de dados foi realizada através do software Statistix 8.0®. Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados, e distribuição de frequências. Após Análise de Variância (ANOVA), os dados paramétricos passaram por Teste de Tukey e os dados não paramétricos pelo teste Kruskal-Wallis, para comparações de médias. Foi atribuída significância de $p<0,05$. Os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

O acompanhamento clínico das éguas gestantes vacinadas e, posteriormente, dos potros vacinados, não demonstraram nenhuma reação vacinal ou efeito colateral causado pela vacina rEMA-2. A Figura 1 descreve as médias de absorbância em leitura óptica (492nm) pelo método ELISA, comparando éguas gestantes do Grupo Vacinado (n=9) e Grupo Controle (n=9). A vacina rEMA-2 desenvolveu imunidade humoral nas éguas gestantes vacinadas, com incremento de 2,3 vezes o valor basal de imunoglobulinas ao final do esquema vacinal.

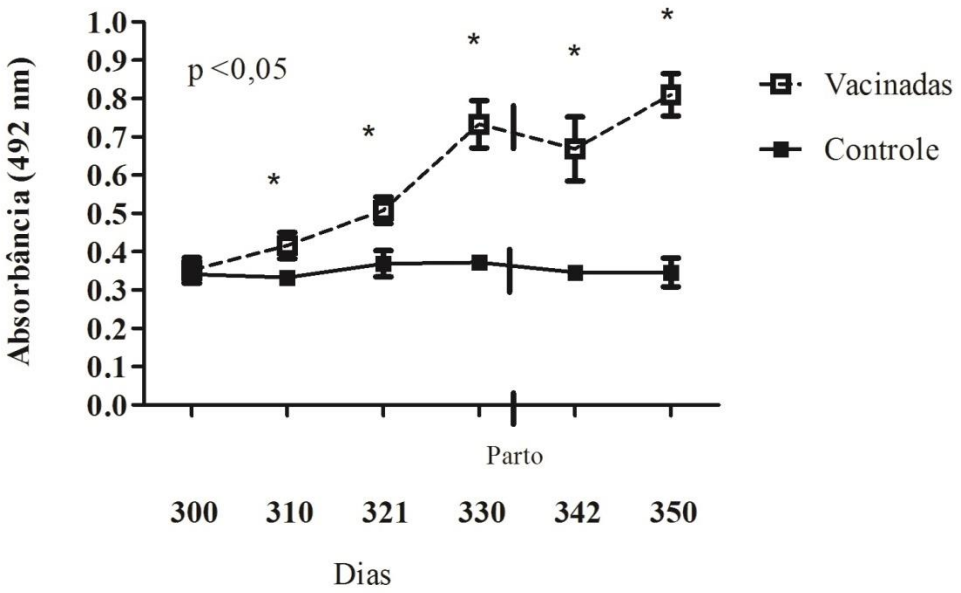

Figura 1 – ELISA indireto. Média e erro padrão da absorbância em leitura óptica (492 nm) entre os Grupos Vacinado (n=9) e Controle (n=9). Nos dias 300, 321 e 342 foram realizadas as aplicações da vacina rEMA-2 no Grupo Vacinado. Os * demonstram diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

As amostras de líquido amniótico das éguas gestantes do Grupo Vacinado não apresentaram valores significativos na média de absorbância no ELISA (0,029±0,02). O colostro obtido antes da primeira mamada dos neonatos apresentou valor médio de absorbância no ELISA de 1,0432±0,33 no Grupo Vacinado e 0,4678±0,345 no Grupo Controle, demonstrando diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

Na Figura 2 estão apresentadas as médias de absorbância (492nm) na comparação entre os grupos de potros Provenientes de Éguas Vacinadas (n=9) e Provenientes de Éguas Controle (n=9). O grupo de potros Provenientes de éguas vacinadas apresentou no soro às 12h de vida absorbância média de 0,7197±0,220, que representa 69% do valor observado no colostro de éguas vacinadas no momento do parto (1,0432±0,33). No grupo de potros Provenientes de éguas controle, a absorbância média de imunoglobulinas séricas foi 0,2429±0,104, o que representa 51% do valor do colostro (0,4678±0,345) no mesmo momento.

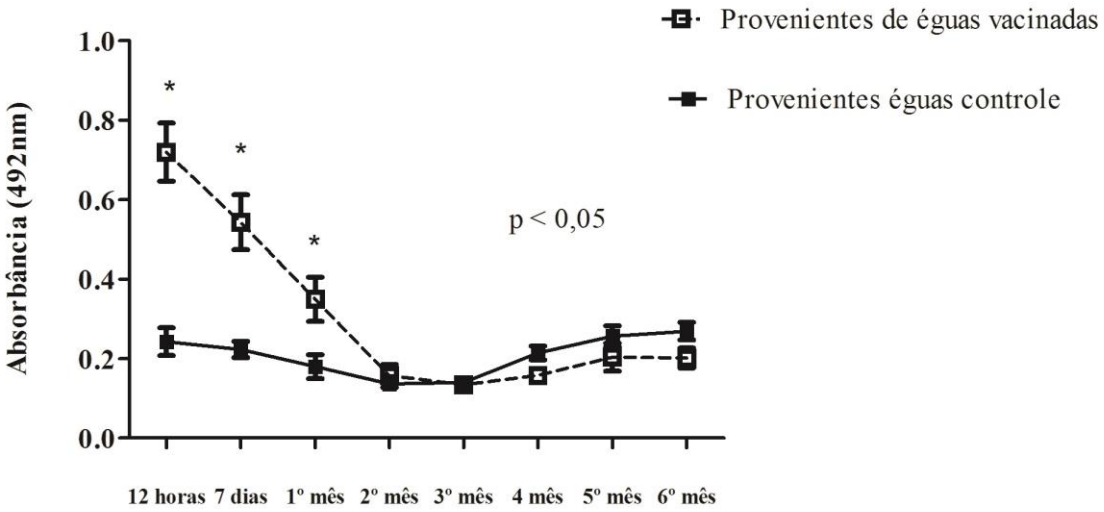

Figura 2 – ELISA indireto. Média e erro padrão da absorbância em leitura óptica (492 nm) entre os grupos de potros Provenientes de Éguas Vacinadas (n=9) e Provenientes de Éguas Controle (n=9), desde as 12 horas até o 6º mês de vida. Os * demonstram diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

O grupo de Potros Vacinados (n=4) a partir do 2º mês de vida, está descrito na Figura 3 em comparação com o Grupo Controle (n=14), caracterizando as médias de absorbância de ambos grupos. Os potros que passaram por esquemas vacinais a partir do 2º mês de vida obtiveram incremento de 8,3 vezes o valor basal (2º mês) ao final do esquema vacinal (6º mês).

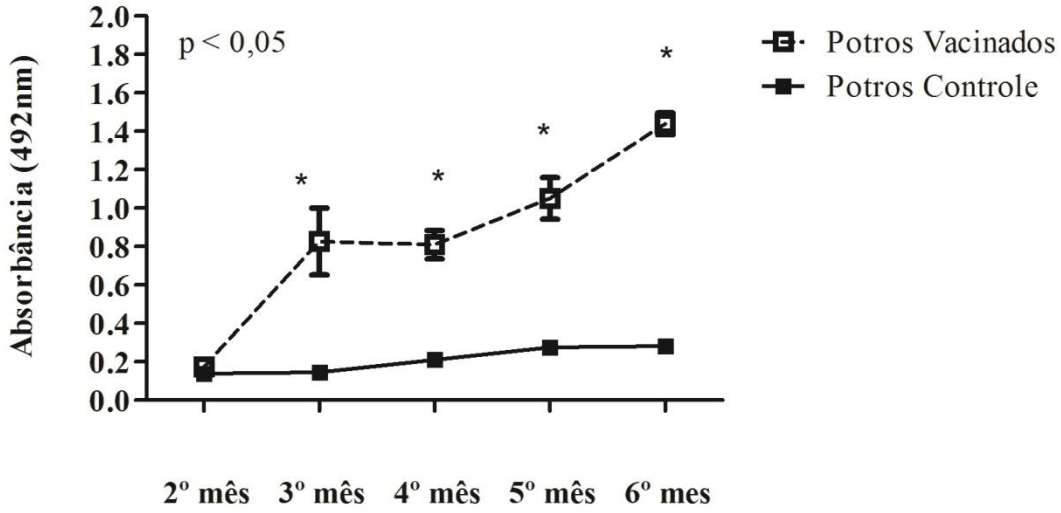

Figura 3 – ELISA indireto. Média e erro padrão da absorbância em leitura óptica (492 nm) entre os grupos de Potros Vacinados (n=4) e Potros Controle (n=14). Os esquemas vacinais com rEMA-2 foram realizados no 2º e 5º mês no grupo vacinado. Os * demonstram diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

DISCUSSÃO

Conforme os resultados observados, houve a indução de anticorpos específicos nas éguas gestantes do Grupo Vacinado, quando comparado ao Grupo Controle. A média da concentração de imunoglobulinas anti-*T. equi* no colostro, bem como a comparação entre os grupos de potros Provenientes de Éguas Vacinadas e Provenientes de Éguas Controle, demonstram que ocorreu a transferência passiva de anticorpos vacinais maternos. Ainda, os potros que passaram por esquemas vacinais a partir do 2º mês de vida obtiveram níveis elevados de imunoglobulinas no soro, quando comparados a potros controle.

O método de eleição para acompanhamento sorológico dos animais estudados foi ELISA indireto, através de protocolo que, em estudos anteriores de nosso grupo, demonstrou especificidade de 83,3% e sensibilidade de 90,9% (Vianna et al. 2014). ELISA nas suas diversas variações e com diferentes antígenos têm sido empregados com sucesso no diagnóstico e pesquisas com *T. equi* (Kumar et al. 2013, El-Sayed et al. 2015, Kumar et al. 2015). A utilização da proteína rEMA-2 em nosso trabalho, tanto para a produção da vacina como para antígeno no ELISA, se justifica por se manifestar nas diversas fases do ciclo de vida e ser primariamente reconhecida pelo sistema imune, através da expressão no citoplasma e membrana dos eritrócitos (Vianna et al. 2014).

A placentação nas éguas é epiteliocorial difusa, o que impede a passagem de imunoglobulinas de forma passiva para o feto no período intrauterino. Entretanto, se desafiado, o feto equino tem capacidade de produzir anticorpos neutralizantes por volta dos 200 dias de gestação. (Perkins & Wagner, 2015). Kumar et al. (2008) não observaram anticorpos anti-*T. equi* no soro de neonatos provenientes de mães positivas para theileriose. Os resultados da análise do líquido amniótico em éguas vacinadas com rEMA-2 em nosso estudo, reafirmam que não houve passagem de anticorpos através da placenta.

A formação de um colostro de qualidade é fundamental para que o potro receba anticorpos de forma passiva e seja capaz de responder a uma grande demanda de patógenos presentes no ambiente neonatal, por isso a maioria das vacinas desenvolvidas para éguas gestantes contemplam o terço final de gestação. A absorção do colostro pelo potro se dá de maneira ideal imediatamente após o nascimento, adotando-se um limite máximo para ingestão de até 12 horas de vida (Curcio & Nogueira, 2012). Após este período a capacidade de absorção intestinal das imunoglobulinas é reduzida e a égua começa a produzir leite (Jeffcott, 1971). Em nosso estudo, a concentração de imunoglobulinas vacinais no colostro de Éguas Vacinadas foi superior ao de Éguas Controle. Observamos também que os potros do grupo Provenientes de Éguas Vacinadas apresentaram níveis superiores de imunoglobulinas no soro quando comparados aos Provenientes de Éguas Controle após a primeira mamada, o que demonstra que houve absorção efetiva dos anticorpos vacinais transmitidos via imunidade passiva.

Embora os potros do grupo Provenientes de éguas vacinadas tenham demonstrado absorção dos anticorpos adequada através do colostro (0,7197±0,220), observamos que os níveis de anticorpos séricos nos potros foram decrescentes, chegando aos valores mínimos no 2º mês de vida (0,1566±0,086). Kumar et al. (2008) observaram resultados semelhantes, avaliando a imunidade passiva de neonatos provenientes de mães infectadas por *T. equi*, onde houve o decréscimo total do nível de anticorpos de 63-77 dias após o nascimento. A IgG3 é a classe de imunoglobulinas mais associada a imunidade à *T. equi,* e corroborando com nossos resultados, Perkins & Wagner (2015) apontam que a imunidade passiva decorrente de IgG3 decresce a níveis muito baixos por volta de 10 semanas de vida.

Nos potros, existe uma janela de susceptibilidade imunológica entre os dois meses (decorrente da perda de imunidade passiva) e os quatro meses de vida, quando se estabelecem níveis adequados de imunoglobulinas decorrentes da imunidade ativa (Perkins & Wagner, 2015). O período ideal para a primeira vacinação em neonatos das mais diversas espécies ainda é discutível, pois compreende uma interação entre antígenos, anticorpos, sistema complemento e citocinas de um organismo ainda em amadurecimento (Hodgins & Shewen, 2012). Observamos em nosso estudo que o esquema vacinal com início no 2º mês de vida induziu a produção de anticorpos vacinais, demonstrando capacidade de estimular a imunidade humoral em um período onde há maior vulnerabilidade dos potros.

CONCLUSÕES

O esquema vacinal com rEMA-2 foi capaz de estimular a imunidade humoral em éguas gestantes e potros a partir do 2º mês de vida. Éguas gestantes vacinadas concentraram imunoglobulinas vacinais no colostro, e os potros provenientes destas obtiveram incremento nos níveis séricos de anticorpos vacinais após a primeira mamada.

Agradecimentos. Ao Programa de Pós Graduação em Veterinária (PPGV) da UFPel, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). Agradecimento especial, pelo suporte na execução do experimento, ao Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEEP) e ao Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia da UFPel.

REFERÊNCIAS

Allsopp M.T.E.P., Lewis B.D., Penzhorn B.L. 2007. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. Veterinary Parasitology**.** 148: 130-136.

Chhabra S., Ranjan R., Uppal S.K., Singla L.D. 2012. Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. Journal of Parasitic Diseases. 36(1):31-33.

Curcio B.R. & Nogueira C.E.W. 2012. Newborn adaptations and healthcare throughout the first age of the foal. Animal Reproduction. 9(3): 182 – 187.

El-Sayed S.A.E., Rizk M.A., Terkawi M.A., Mousa A., El Said E.S.E.S., El-Sayed G, et al. Cocktail of *Theileria equi* antigens for detecting infection in equines. 2015. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 5(12): 977–981.

Friedhoff K.T. & Soule C. 1996. An account on equine babesioses. Revue Scientifique Et Technique. 15:1191-1201.

Hodgins D.C. & Shewen P.E. 2012. Vaccination of neonates: Problem and issues. Vaccine. 30: 1541-1559.

Hussain M.H., Saqib M., Raza F., Muhammad G., Asi M.N., Mansoor M.K., et al. 2014. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in five draught equine populated metropolises of Punjab, Pakistan. Veterinary Parasitology. 202(3–4): 248-256.

Jeffcott L.B. 1971. Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly-born foal. Veterinary Record. 88: 340-341.

Kumar S., Kumar R., Gupta A.K., Dwivedi S.K. 2008. Passive transfer of *Theileria equi* antibodies to neonate foals of immune tolerant mares. Veterinary Parasitology. 151: 80 – 85.

Kumar S., Kumar R., Gupta A.K., Yadav S.C., Goyal S.K., Khurana S.K., et al. 2013. Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. Veterinary Parasitology. 198: 10-17.

Kumar S., Rakha N.K., Goyal L., Goel P., Kumar R., Kumar A., et al. 2015. Diagnostic application of recombinant equine merozoite surface antigen-1 in ELISA for detection of *Theileria equi* specific antibodies. Japanese Journal of Veterinary Research. 63(3): 129-137.

Nizoli L.Q., Götze M.M., Félix S.R., Silva S.S., Nogueira C.E.W. 2008. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. Parasitologia Latinoamericana. 63: 46-50.

Perkins G.A. & Wagner B. 2015. The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. Equine Veterinary Journal. 47: 267 – 274.

Rothschild C.M. Equine piroplasmosis. 2013. Journal of Equine Veterinary Science. 33:497-508.

Santos T.M., Ferraz P.N., Almeida F.Q., Massard C.L., Baldani C.D., Botteon P.T.L., et al. 2009. Estudo comparativo de três métodos de diagnóstico para detecção de anticorpos anti-*Theileria* em equinos de áreas endêmicas do Rio de Janeiro. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 46 (6): 484-490.

Sudan V., Jaiswal A.K., Srivastava A., Saxena A., Shanker D. 2015. A rare clinical presentation of transplacental transmission and subsequent abortion by *Babesia* (*Theileria*) *equi* in a mare. Journal of Parasitic Diseases. 39(2): 336-338.

Vianna A.M., Gonçales R.A., Lara A.P.S.S., Pinto L.S., Nizoli L.Q., Leite F.P.L. 2014. Expressão heteróloga da EMA-2 (equi merozoite antigen) de Theileria equi em Pichia pastoris com potencial utilização em imunobiológicos. Ciência Rural. 44(10): 1830 – 1836.

Wise L.N., Pelzel-McCluskey A.M., Mealey R.H., Knowles D.P. 2014. Equine piroplasmosis. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. 30: 677.

4 Considerações Finais

A ocorrência de infecções por *T. equi* no período periparto e nos neonatos causa danos por abortos, nascimento de natimortos ou de animais portadores que geralmente não conseguem debelar a doença. A vacina rEMA-2 demonstrou capacidade de estimular a imunidade humoral de éguas gestantes e concentrar anticorpos no colostro, para que de forma passiva fossem disponibilizados aos neonatos. No 2º mês de vida dos potros, período que coincide com uma janela de susceptibilidade imunológica, obtivemos através da vacinação com rEMA-2, o aumento da produção de anticorpos específicos.

Os resultados obtidos neste estudo através da vacinação com rEMA-2 são animadores, demonstrando que é possível utilizar medidas profiláticas para o controle de *T. equi* em um momento de maior susceptibilidade pelo equino, entretanto mais testes com a vacina são necessários até a sua viabilização.

Referências

ALLSOPP, M.T.E.P.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. **Veterinary Parasitology.** v.148, p. 130-136, 2007.

BALDANI, C.D., HILARIO, E., NAKAGHI, A.C., BERTOLINI, M.C., MACHADO, R.Z. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v. 20, p. 54–60, 2011.

CHHABRA, S.; RANJAN, R.; UPPAL, S.K.; SINGLA, L.D. Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. **Journal of Parasitic Diseases.** v.36, n.1, p. 31-33, 2012.

CURCIO, B.R. & NOGUEIRA, C.E.W. Newborn adaptations and healthcare throughout the first age of the foal. **Animal Reproduction.** v. 9, n.3, p.182 – 187, 2012.

EL-SAYED, S.A.E.; RIZK, M.A.; TERKAWI, M.A.; MOUSA, A.; EL SAID, E.S.E.S.; ELSAYED, G.; et al. Cocktail of *Theileria equi* antigens for detecting infection in equines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** v.5, n.12, p.977–981, 2015.

ERBSLOH, J.K.E. Babesiosis in the newborn foal. **Journal of Reproduction & Infertility**. Suppl. v. 23, 725–726, 1975.

FRIEDHOFF, K.T.; SOULE, C. An account on equine babesioses**. Revue Scientifique Et Technique**. v.15, p. 191-201, 1996.

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

HUSSAIN, M.H.; SAQIB, M.; RAZA, F.; MUHAMMAD, G.; ASI, M.N.; MANSOOR, M.K.; et al. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in five draught

equine populated metropolises of Punjab, Pakistan. **Veterinary Parasitology**. v. 202, n. 3–4, p. 248-256, 2014.

JEFFCOTT, L.B. Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly-born foal. **Veterinary Record.** v. 88, p. 340-341, 1971.

KNOWLES Jr, D. P.; KAPPMEYER, L. S.; STILLER, D. HENNAGER, S. G.; PERRYMAN, L. E. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi.* **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, n. 12, p. 3122 – 3126, 1992.

KUMAR, S.; YOKOYAMA, N.; KIM, J.Y. ; HUANG, X. ; INOUE, N. ; XUAN, X. ; IGARASHI, I. ; SUGIMOTO, C. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 221-227, 2004.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; GUPTA, A.K.; DWIVEDI, S.K. Passive transfer of Theileria equi antibodies to neonate foals of immune tolerant mares. **Veterinary Parasitology.** v. 151, p. 80 – 85, 2008.

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.

LEWIS B. D. et al. Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmosis? **Journal of the South African Veterinary Association.** v.70, p.90-91, 1999.

MANS, B. J; PIENAAR, R; LATIF, A. A. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.** v.4, p. 104-118, 2015.

NIZOLI, L. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; DUMMER, L. A.; SANTOS, 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, n.2, p.1-4, 2009.

NIZOLI, L. Q.; GÖTZE, M. M.; FÉLIX, S. R.; SILVA, S. S.; NOGUEIRA, C. E. W. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**. v. 63, p. 46-50, 2008.

NUTTALL, G.H.F. & STRICKLAND, C. The parasites of the horse piroplasmosis response of biliary fever. **Zentralblatt für Bakteriologie.** v.1, p. 524-525, 1910.

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.

RAMSAY, J.D.; UETI, M.W.; JOHNSON, W.C.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D.P.; MEALEY, R. H. Lymphocytes and macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection in vivo. **PLoS One.** v.8, n.10, e76996, 2013.

REHBEIN, G.; ZWEYGARTH, E.; VOIGT, W.P.; SCHEIN, E. Establishment of *Babesia equi*-Infected Lymphoblastoid Cell Lines. **Z Parasitenkd**. v. 67, p. 125-127, 1982.

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

SANT, C.; d'ABADIE, R.; PARGASS, I.; BASU, S. K.; ASGARALI, Z.; CHARLES, R. A.; GEORGES, K. C. Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. **Veterinary Parasitology.** v. 226, p.132 – 137, 2016.

SANTOS, T. M; FERRAZ, P. N; ALMEIDA, F. Q; MASSARD, C. L; BALDANI, C. D; BOTTEON, P. T. L; SANTOS, H. A; MACHADO, R. Z; ANDRADE, C. M. Estudo comparativo de três métodos de diagnóstico para detecção de anticorpos anti-Theileria em equinos de áreas endêmicas do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** São Paulo, v. 46, n. 6, p. 484-490, 2009.

SILVA, M. G.; GRAÇA, T.; SUAREZ, C. E.; KNOWLES, D. P. Repertoire of Theileria equi immunodominant antigens bound by equine antibody. **Molecular & Biochemical Parasitology.** v. 188, p. 109-115, 2013.

SUDAN, V.; JAISWAL, A.K.; SRIVASTAVA, A.; SAXENA, A.; SHANKER, D. A rare clinical presentation of transplacental transmission and subsequent abortion by *Babesia (Theileria) equi* in a mare. **Journal of Parasitic Diseases.** v.39, n.2, p. 336-338, 2015.

TANAKA, T., XUAN, X., IKADAI, H., IGARASHI, I., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., MIKAMI, T., SUZUKI, N. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. **International Journal for Parasitology** . v.29, p. 1803–1808, 1999.

TORRES, A. J. et al. Aspectos epidemiológicos da Theileriose eqüina e sua relação com o carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus em duas propriedades na região da campanha do Rio Grande do Sul - Brasil. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitologia**. v. 71, n. 1, p. 70-77, 2012.

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.

Anexo

UFPel
CEEA
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Pelotas, 14 de janeiro de 2016.

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Departamento de Clínicas Veterinárias – Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A *CEEA* analisou as correções feitas o projeto intitulado: **"Resposta imunológica a *Theileria equi* em éguas prenhes vacinadas com proteína EMA-2 recombinante e seu reflexo no neonato"** processo nº23110.008247/2015-17, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEEA*.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 8247-2015**).

Vigência do Projeto: 10/02/2016 a 31/12/2017

Espécie/Linhagem: Equina/Mestiços Crioulos

Nº de animais: 24

Idade: 12 entre 0-6 meses e 12 entre 10-15 anos

Sexo: Fêmeas

Origem: Hospital de Clínicas Veterinárias - UFPel

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: 15 / 01 /2016

Assinatura do Professor Responsável: _____