

RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM POTROS VACINADOS CONTRA O TÉTANO.

MAYARA CAETANO ABREU¹; LINDA ROMERO GAMA²; LEONARDO BRASIL FIGUEREDO³; NEIDA CONRAD⁴; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – mayaraabreu@live.com

²Universidade Federal de Pelotas - Iromerogama@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - leonardo.brasil.08@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Diretrizes atuais recomendam a imunização contra o tétano para equinos a utilização de três vacinações de toxóide tetânico a partir dos 3 meses de idade. Entretanto, quando as progenitoras forem vacinadas, sugerem iniciar as vacinações os 6 meses, pois a imunidade colostrar pode comprometer a resposta do potro (AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 2023). Há relatos de respostas imunológicas totalmente maduras em potros neonatos (TALLMADGE, 2017). A imunização dos potros é importante, considerando a taxa de mortalidade por tétano em cavalos adultos e potros é próxima, 68,4 e 66,7% respectivamente, sendo o tempo médio de internação de 10 dias com custos ~ de 902€ em adultos e 835€ em potros (VAN GALEN et al., 2017). As vacinas recombinantes vêm se destacando no mercado por serem seguras, tanto na sua fabricação quanto no seu uso, além de um menor tempo de produção (MOREIRA et al., 2018).

Tétano é uma doença neurológica de distribuição mundial, caracterizada pela hipertonia dos músculos estriados com sobreposição de espasmos musculares paroxísticos clínicos causados pelas toxinas produzidas pelo *Clostridium tetani*, sendo a que a toxina tenoespasmína é neurotóxica (POPOFF, 2020). A doença afeta mamíferos em geral, mas os equinos são os mais sensíveis, o agente coloniza trato entérico de equinos (HÉLÈNE, AMORY, 2011).

Esse estudo objetiva avaliar a resposta humoral de potros de 2 meses de idade inoculados com vacina recombinante experimental contra o tétano e comparar com a resposta imune humoral de cavalos adultos.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 10 éguas gestantes adultas e 10 cavalos adultos hípidos, oriundos do Centro Agropecuário da Palma da Universidade Federal de Pelotas/RS geração 2024. Os potros foram vacinados a partir dos 2 meses de vida (dia 0), com reforço aos 21 e 35 dias com a proteína recombinante contra o tétano (rTENT, 200 µg) adsorvida em Hidróxido de Alumínio (10%), via intramuscular, em um volume de 1 ml. Os cavalos adultos foram inoculados com a mesma vacina, porém com 2 doses, nos dias 0 e 21. Para obtenção de soro e avaliação da resposta imune humoral foram coletadas amostras de sangue (5ml) em tubos estéreis (Vacunteiner®), por venopunção da jugular das éguas progenitoras, dos potros e dos cavalos adultos nos dias 0, 21, 35, 42 e 49 do experimento. A avaliação da resposta humoral dos níveis de IgG totais foi realizado através do ensaio

imunoenzimático (ELISA) indireto. Brevemente, placas de poliestireno com 96 cavidades foram sensibilizadas com 200ng/cavidade de rTENT diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) incubados *overnight*, à 37 °C. As amostras de soro foram diluídas 1:100 em solução leite em pó desnatado diluído em solução salina fosfatada (PBS, pH 7,6). Posteriormente, foi adicionado o anticorpo anti-equino conjugado com peroxidase, diluído 1:4000 em PBS. Entre cada uma das etapas as placas foram incubadas por 1h à 37 °C e submetidas a lavagem com PBS-Tween 20. Para visualizar as reações foi adicionado substrato cromógeno (0,004 mg de OrtoPhenilenoDiamina-OPD, 15µl de H₂O₂, 10 ml de tampão fosfato citrato pH 4,0). Após período de incubação (15 min) a temperatura ambiente e ausência de luz foi utilizado solução de ácido sulfúrico à 3% para parar a reação do cromógeno. Após, as absorbâncias foram aferidas em um leitor de microplacas TPReader8 a 492 nm. A isotipagem foi realizada utilizando o protocolo descrito por VIANNA et al., 2014. Brevemente, os anti-isotipos (BIO-RAD) para IgG1 e IgG4-7 foram diluídos em PBS 1:2000, enquanto que o IgG3-5 foi diluído 1:5000 em PBS. A avaliação estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism v7. Utilizando t-test e One-Way ANOVA seguido por Tukey para testes de comparação múltiplas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na resposta de IgG totais específicas anti-rTENT foram detectados anticorpos nos potros a partir da primo-vacinação. Os níveis de anticorpos aumentaram após a 2ª e 3ª doses vacinais (Figura 1). As progenitoras apresentaram níveis de anticorpos anti-rTENT abaixo do *cut-off* (~0,149), sugerindo que os anticorpos detectados nos potros foram produzidos por eles, pelo efeito vacinal, e não decorrentes da imunização passiva via colostro (Figura 1). Em estudo realizado pelo nosso grupo, com imunização iniciando aos dois meses de vida com uma vacina recombinante para theileriose, os potros demonstraram ter condições de resposta ao estímulo vacinal (SANTOS et al., 2021).

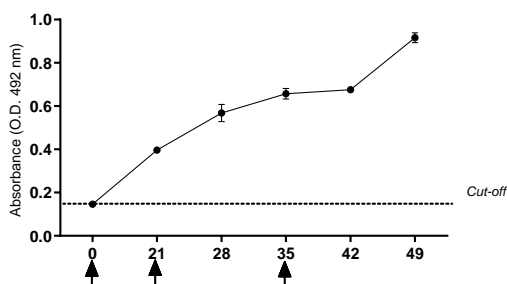


FIGURA 1. Níveis de anticorpos específicos para rTENT. Os dados representam as médias (+/- DP) dos valores obtidos na análise dos soros individuais em absorbância de IgG específica anti-rTENT. As flexas representam os dias das vacinações.

Na caracterização das imunoglobulinas G, podemos observar que os potros responderam as doses vacinais, sendo o isotipo IgG4/7 o que atingiu níveis mais altos, seguido por IgG1 (Figura 2). IgG3/5 foi o isotipo de menor resposta. Os isotipos de IgG podem estimar padrão de respostas de linfócitos T e indicar resposta imune direcionada para células T auxiliares tipo 1 ou células T auxiliares tipo 2 (ESTES et al., 2002). Dados que diferem do estudo realizado em potros com vacina recombinante de theileriose, onde até os 3 meses os potros só tiveram

aumento de IgG1 e ausência dos isotipos IgG3/5 e IgG4/7 (SANTOS, et al, 2021). Estudos sugerem que a existência e padrão de resposta imunológica de potros pode variar de acordo com o antígeno utilizado (TALLMADGE, 2017). Foi reportado potros com 3 dias de vida e três meses, com 2 doses vacinais de vacina inativada contra vírus respiratório bovino, produziram de IgG1 e IgG3/5 específicas ao antígeno vacinal, sendo que potros com três meses de vida responderam com níveis mais elevados que os de três dias de vida (RYAN & GIGUERE, 2010).

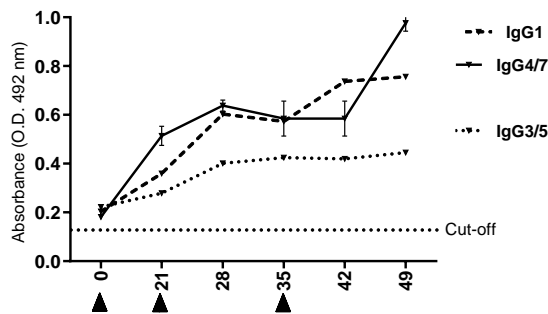


FIGURA 2. Avaliação os isotipos IgG1, IgG4/7 e IgG3/5 específicos anti-rTENT. Os dados representam as médias (+/- DP) dos valores em absorbância dos isotipos de IgG específica anti-rTENT em pool de soros dos animais. Triângulos representando as doses vacinais.

Os cavalos adultos receberam 2 doses vacinais, e foram capazes de montar resposta humoral específica à vacina experimental (Figura 3b). Os cavalos adultos inoculados com 2 doses vacinais demonstraram uma resposta de IgG total, e dos isotipos IgG1, IgG3/4 e IgG4/7 semelhantes aos potros. Os isotipos apresentaram padrão semelhante em potros e adultos, IgG4/7 e IgG1 foram predominantes em ambos, enquanto e IgG3/5 apresentou níveis inferiores, sugerindo ser uma característica de estimulação do antígeno recombinante utilizado (Figura 3 a e b).

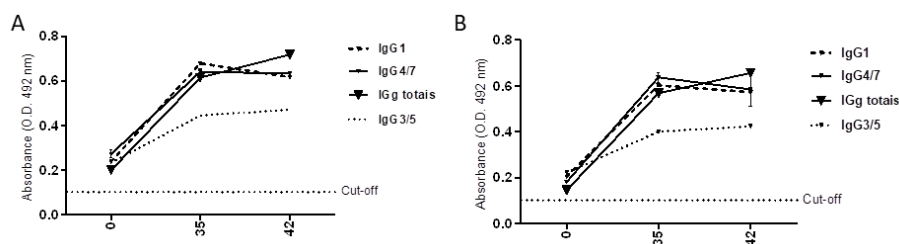


FIGURA 3. Avaliação os isotipos IgG1, IgG4/7 e IgG3/5 e IgGs totais específicos anti-rTENT. Os dados representam as médias (+/- DP) dos valores em absorbância dos isotipos de IgG específica anti-rTENT em pool de soros dos animais. No gráfico A em potros, e no gráfico B em cavalos adultos.

Os isotipos IgG1 e IgG4/7 foram os predominantes com a vacina experimental recombinante utilizada. Estes possuem a função de fixação do complemento e mediação de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, sendo eficiente na neutralização de toxinas como as de *Clostridium* sp. (Lewis et al., 2008). Uma vacina eficiente para equinos deve induzir IgGs dos subtipos IgG1, IgG3, IgG4 e IgG7, que foram induzidas de maneira similar em cavalos adultos e potros, com a vacina experimental utilizada.

4. CONCLUSÕES

Equinos com 2 meses responderam a vacina recombinante contra o tétano, com níveis de anticorpos semelhantes aos adultos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

POPOFF, M. R. Tétano em animais. *Journal Veterinary Diagnostic* 2020; 32: 184 – 191

DI FILIPPO, P.A., GRAÇA, F.A.S., COSTA, A.P.D., COUTINHO, I.S. & VIANA, I.S. [Clinical and epidemiological findings and response to treatment of 25 cases of tetanus in horses occurred in Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil.] Achados clínico-epidemiológicos e resposta ao tratamento de 25 casos de tétano em equinos ocorridos na região Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(1):33-38, 2016

GALEN, GABY VAN; SAEGERMAN, CLAUDE; RIJCKAERT, JOKE; AMORY, HELENE; ARMENGOU, LARA; BEZDEKOVA, BARBORA; DURIE, INGE; FINDSHOJ, RIKKE; DELANY, NATHALIE FOUICHE; HALEY, LAURA; HEWETSON, MICHAEL; VAN DEN HOVEN, RENE; KENDALL, ANNA; MALALANA, FERNANDO; CAVALLERI, JESSIKA MULLER; PICAVET, TRESEMIK; ROSCHER, KATJA; VERWILGHEN, DENIS; ESER, MERET WEHRLI; WESTERMANN, CORNELIE; MAIR, TIM. Retrospective evaluation of 155 adult equids and 21 foals with tetanus in Western, Northern, and Central Europe (2000–2014). Part 1: Description of history and clinical evolution. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* () 2017, pp 1–12 doi: 10.1111/vec.12668

ESTES, D. M.; BROWN, W., L. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 90, n.10, 2002.

LEWIS, MELANIE J.; WAGNER, BETTINA B; WOOF, JENNY M. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies *Molecular Immunology* 45, 818–827, 2008.

SANTOS, A. C.; NOGUEIRA, C. E. W.; MORAES, B. S. S.; MÜLLER, V.; MOUSQUER, M. A.; LEITE, F. P. L. L. Immune response of adults horses, pregnant mares and foals to an experimental vaccine with recombinant EMA-2 protein of *Theileria equi*. *Research in Veterinary Science*. v. 139, n. 186, 2021.

TALLMADGE, REBECCA; MILLER, STEVEN C.; PARRY, STEPHEN A.; FELIPPE, MARIA JULIA B. Antigen-specific immunoglobulin variable region sequencing measures humoral immune response to vaccination in the equine neonate. *Plos One*. Pag 1-24. Maio, 2017

RYAN, C., GIGUERE, S. Os neonatos equinos atenuaram as respostas imunes humorais e mediadas por células a uma vacina com adjuvante morta em comparação com cavalos adultos. *Clinical Vaccine Immunol CVI*. 17(12):1896–902. Dezembro de 2010;