ARTÍCULO ORIGINAL

Avaliação da Vitamina E como imunomodulador e infecção intrauterina por Theileria equi em potro

CRISTIANA PORTZ*, F. Q. ALMEIDA**, CARLOS L. MASSARD** e PAULO de F. L. BOTTEON**

EVALUATION OF VITAMIN E AS IMMUNOMODULATION AND INTRAUTERINE INFECTION OF *Theileria equi* in FOALS

*Twelve pregnant mares of Mangalarga Marchador and Bretão Postier breeds were distributed in three groups where the first one was the control and the others were destined to the challenge. Four Mangalarga Marchador and four Bretão Postier mares were supplemented with 80mg vitamin E/100Kg body weight/day during thirty days until parturation. Total colostrum protein was analysed using Micro-Kjeldahl method and immunoglobulin G was estimated through protein concentration. Serum samples were analysed for specific immunoglobulin G to *Theileria equi* using enzyme-linked immunosorbent assay method (ELISA). Parturation were assisted and blood smears were done from twelve foals, before suckling. Supplementation with 80 mg vitamin E/100Kg body weight /day wasn't sufficient to stimulate IgG synthesis in pregnant mares. Six blood smears from Mangalarga Marchador foals were positive to *Theileria equi* suggesting intrauterine infeccious. These foals developed asymptomatic babesiosis without any clinical sings because the presence of passive antibodies.*

Key words: vitamin E, equines, babesiosis, imunomodulation. *Theileria equi*.

INTRODUÇÃO

A América do Sul e Central são consideradas altamente endêmicas para a babesiose equina mantendo um rígido controle sanitário de fronteira, impedindo a entrada de animais soropositivos. O plantel equino da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro apresenta-se endêmico para as duas espécies causadoras de babesiose devido a constante reinfecção através dos carrapatos vetores¹. Os animais infectados por *Theileria equi* tornam-se geralmente portadores crônicos e fontes de infecção por longos períodos².

A vitamina E (α -tocoferol) age como protetor

de membrana celular, antioxidante biológico, evita danos em fibras musculares cardíacas e esqueléticas, tendo atividade na coagulação sanguínea, transporte de elétrons, proteção do organismo contra metais pesados, possuindo ainda mecanismo modulador da resposta imune dos animais, protegendo os leucócitos e macrófagos durante a fagocitose³. O uso de imunomoduladores promove um fortalecimento do organismo, já que os medicamentos utilizados atualmente não negativam equinos portadores de *T. equi*, localizados em regiões onde há presença dos carrapatos vetores e susceptíveis a reinfecções. A suplementação de éguas gestantes com vitamina E, pode resultar em aumento da

* Mestre em Ciências Veterinárias-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Rua Hella Horn, 113. CEP: 95880-000-Cristo Rei-Estrela-RS-Brasil.

** Professor-Instituto de Veterinária-UFRRJ.

concentração de IgG sérico e transporte passivo aos potros⁴.

Devido aos novos conhecimentos em nutrição equina e a pouca informação sobre o uso de imunomoduladores, este trabalho objetivou o estudo da suplementação dietética com vitamina E, de éguas gestantes portadoras de babesiose avaliando anticorpos específicos para *T. equi* nos soros sanguíneos dos seus respectivos potros, assim como a preparação de esfregaços sanguíneos, antes da amamentação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento realizou-se na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ (UFRRJ), utilizando éguas gestantes das raças Mangalarga Marchador e Bretão Postier do Setor de Equinocultura do Instituto de Zootecnia, no período de agosto de 2001 a julho de 2002. Foram utilizadas oito éguas da raça Mangalarga Marchador e quatro éguas da raça Bretão Postier, identificadas em fichas individuais listando o nome, a idade, a raça e a data de cobrição dos animais. No terço final da gestação e durante a lactação, as éguas receberam ração concentrada sendo mantidas em pastos de capim Colômbio durante o dia e, à noite, foram recolhidas em piquetes para observação do parto.

As éguas foram distribuídas em três tratamentos descritos a seguir: Tratamento I (Grupo Controle): foram utilizadas quatro éguas da raça Mangalarga Marchador, mantidas em pastos de capim colômbio, e suplementadas com ração concentrada em quantidades equivalentes a 0,5% do peso vivo, durante 30 dias pré-parto; Tratamento II (Vit E-MM): foram utilizadas quatro éguas da raça Mangalarga Marchador, consumindo dieta semelhante a do grupo controle, com adição diária na dieta, de 80 mg de vitamina E/100Kg de peso vivo, durante 30 dias pré-parto. Tratamento III (Vit E-BP): foram utilizadas quatro éguas da raça Bretão Postier, consumindo dieta semelhante a do grupo controle, com adição diária na dieta, de 80 mg de vitamina E/100 kg de peso vivo, durante 30 dias pré-parto.

Os potros não foram suplementados com vitamina E na dieta, entretanto há passagem passiva de α -tocopherol, via colostro. A vitamina E, em pó foi cedida pela ROCHE®, e pesada individualmente para cada égua e oferecida

juntamente com a ração, pela manhã, uma vez ao dia.

Foram colhidas três amostras de colostro de cada égua após o parto: a primeira foi colhida imediatamente após o parto e antes do potro mamar, a segunda 24 horas e a terceira 48 horas após o parto, respectivamente. As amostras de colostro foram acondicionadas em tubos FALCON®, devidamente identificados, e armazenados a -20°C. Nessas amostras, foram determinados os teores de proteína total (PT) pelo método Micro-Kedjhal, estimando-se a concentração de IgG⁵.

As colheitas de sangue dos potros foram realizadas logo após o parto, antes da amamentação, e nas semanas subsequentes totalizando doze semanas, obtidas por colheita de 5 ml de sangue da veia jugular em tubos siliconizados com gel retrator de coágulo. Após a coagulação do sangue, os soros foram separados, e mantidos a -20 °C, até serem submetidos à técnica de ELISA indireto para a detecção de anticorpos específicos para *T. equi*.

Para a realização do ELISA indireto foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos para *T. equi*, segundo metodologia descrita em 2003⁶. A concentração ótima do antígeno de *T. equi*, cedido gentilmente pela Universidade Estadual de São Paulo (UNESP-Jaboticabal), foi de 10g/ml de tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6, a diluição do soro foi estabelecida em 1:100 e a do conjugado 1:1000. Como branco, empregou-se a leitura dos orifícios contendo todos os elementos da reação com exceção do soro equino. Considerou-se como positivo as reações que apresentaram densidade óptica maior que as médias dos controles negativos acrescidas de dois desvios-padrão. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro para ELISA (Labsystems® IEMS Reader MF), com filtro de 405 nm. Utilizou-se a microplaca (Nunc™ Surface®) para a técnica de ELISA, devido a sua confiabilidade.

Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados a partir de amostras de sangue da veia jugular⁷, e avaliados para verificação da presença ou ausência de formas evolutivas e de Cruz de Malta, característicos de *T. equi*.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos em arranjo de parcelas sub-divididas, onde os tratamentos foram

analisados nas parcelas e o tempo, em semanas, nas sub-parcelas. Na análise dos parâmetros sorológicos dos potros, a primeira semana refere-se a colheita das amostras antes da amamentação do potro e, as semanas subsequentes correspondem a 3^a, 5^a, 7^a, 9^a e 11^a semana de idade. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade utilizando o programa Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG (UFV, 2000)⁸.

RESULTADOS

A estação de parição das éguas ocorreu no período de agosto de 2001 a junho de 2002, coincidindo com a época de altas infestações nas pastagens de larvas, ninfas e adultos de ixodídeos, propiciando a infestação dos potros nos primeiros dias de vida. Durante o período experimental, foram colhidos carrapatos dos animais para identificação, observando-se a presença de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, e, ausência de *Boophilus microplus*. Estes equínos não foram criados juntamente com bovinos. Com o aumento da população de larvas e ninfas no inverno, a transmissão ocorre na primavera e verão, na fase adulta, portanto a alta infestação de carrapatos nos equínos justifica a denominação de área endêmica para a babesiose equína, no plantel da UFRRJ¹.

O parto das éguas foi assistido, e as amostras de colostro, de aproximadamente 50 ml, foram colhidas antes do potro mamar e, com 24 e 48

horas pós-parto. As amostras foram analisadas quanto à concentração de proteína total (PT), pelo método de Micro-Kjedhal, considerando o fator de conversão de 6,38. Na (Tabela 1) podem ser observados os valores médios da proteína total e IgG no colostro das éguas das raças Mangalarga Marchador e Bretão Postier cujas dietas foram suplementadas com vitamina E.

Em relação ao tempo de colheita do colostro, observou-se que as concentrações de PT foram maiores ($P < 0,05$) antes do início da amamentação, comparando com as amostras coletadas as 24 e 48 horas, concordando com outros trabalhos^{9,10}, que relataram diminuição de PT e IgG no colostro com o passar do tempo após o parto. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos na concentração de PT e IgG colostrais, indicando que não houve resposta imunoestimuladora da vitamina E no colostro das éguas. Estes resultados discordam de Hoffman et al⁴, que relatam aumento do IgG no colostro, após suplementação com vitamina E, de éguas no pré-parto, entretanto estes animais não eram portadores de *Babesia* sp. A cor amarelada e a viscosidade do colostro estiveram associadas à concentração de PT e, conseqüentemente, a de IgG.

A determinação do índice de ELISA (IE) foi elaborada segundo descrição de Botteon⁶. Os índices de ELISA (IE), que variam de 0 a 9 de acordo com a intensidade da resposta, foram classificados nos três grupos descritos a seguir: grupo 1 -IE de zero, significando ausência de anticorpos; grupo 2 - IE de 1 a 3, significando soros fracamente positivos; grupo 3- IE de 4 a 6, significando soros de média positividade e

Tabela 1. Valores médios das concentrações de IgG e proteína total (PT) no colostro das éguas das raças Mangalarga Marchador e Bretão Postier alimentados com dietas suplementadas com vitamina E

Tempo IgG (mg/ml)	Controle MM	Tratamentos		Média	CV %
		Vit E MM	Vit E BP		
Parto	10,2	9,6	10,2	10,0a	70,0
24 h	0,5	0,4	0,3	0,4b	
48 h	0,3	0,4	0,4	0,3b	
PT (%)					
Parto	25,5	23,9	25,5	25,0a	60,1
24 h	5,4	4,0	3,1	4,2b	
48 h	3,5	4,1	4,0	3,8b	

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

grupo 4- IE de 7 a 9, significando soros fortemente positivos. Os valores não diferiram significativamente em função da suplementação com vitamina E nas dietas das éguas das raças Mangalarga Marchador e Bretão Postier, porém apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) em função da idade do potro, expressas em semanas, conforme está demonstrado na (Tabela 2).

Segundo Jeffcott¹¹, a transferência passiva de anticorpos só ocorre através da ingestão do colostro nos eqüinos. Considerando que a primeira semana de idade representa a colheita de sangue no dia do parto, antes da primeira amamentação, explica-se o resultado sorológico negativo pela ausência de anticorpos. Após a primeira semana de idade, o ELISA classificado eleva-se pela absorção de anticorpos de forma passiva e, ao mesmo tempo, os potros infestaram-se com os carrapatos *A. cajennense* e *A. nitens* ocorrendo, com o passar das semanas, a primo-infecção. Nas Figuras 1, 2 e 3 podem ser observados os índices de ELISA (IE) individuais dos potros

para cada tratamento.

Observa-se um aumento de anticorpos após a primeira semana de idade, devido aos anticorpos passivos, e posteriormente, há uma tendência de redução com nova elevação a partir da sétima semana nos potros nascidos de éguas das raças Mangalarga Marchador e Bretão Postier cujas dietas foram suplementadas com vitamina E. Esta elevação pode estar relacionada à resposta ativa dos potros após infecção natural por *T. equi*. Em alguns potros, pode-se observar carrapatos fixados na conjuntiva e ao redor do ânus, no primeiro dia de idade. Os resultados obtidos são concordantes com os observados por Shein¹², que relata a primo-infecção moderada em potros de áreas endêmicas. Considerando que, no presente experimento, os potros foram avaliados até 12 semanas de idade, os resultados estão de acordo com as observações por outros^{13,14} que relataram infecções por *T. equi* em potros após o nascimento, com hemoparasitemia antes de 42 dias de idade, em áreas endêmicas. Embora a resposta ativa tenha

Tabela 2. Índices médios do ELISA classificado dos potros das raças Mangalarga Marchador e Bretão Postier

Tratamentos	Tempo (semanas)					
	1	3	5	7	9	11
Controle	1	1	1	1	2	2
Vit E –MM	1	1	1	1	2	2
Vit E –BP	1	1	2	2	2	3

Tabela 3. Avaliação do hematócrito (HT), hemoglobina (HB), monócitos (MON), índice de ELISA (IE) e esfregaço sanguíneo de uma égua Bretão Postier.

Semanas	HT (%)	HB (g/dl)	MON (mm ³)	Índice de ELISA	Esfregaço
1	27	9,0	2172	6	Negativo
2	27	9,0	2184	6	Negativo
3	27	9,0	769	6	Negativo
4	26	8,6	2743	5	Negativo
5	26	7,0	2100	5	Positivo
6	27	8,7	597	5	Negativo
7	28	8,3	1281	6	Negativo
8	26	8,9	2863	5	Positivo
9	27	9,0	3349	4	Positivo
10	30	8,6	1762	5	Positivo
11*	28	9,6	1824	5	Positivo
12	26	8,6	3486	4	Positivo

* Semana da ocorrência do parto.

Figura 1. Índices de ELISA individuais dos potros da raça Mangalarga Marchador do grupo controle cujas éguas foram alimentadas com dietas não suplementadas com vitamina E.

Figura 2. Índices de ELISA individuais dos potros da raça Mangalarga Marchador cujas éguas foram alimentadas com dietas suplementadas com vitamina E.

Figura 3. Índices de ELISA individuais dos potros da raça Bretão Postier cujas éguas foram alimentadas com dietas suplementadas com vitamina E.

ocorrido aproximadamente aos 42 dias de idade, sétima semana, os potros deste presente experimento não apresentaram qualquer sintoma da infecção por *T. equi*. Pode-se observar também, que um potro da raça Mangalarga Marchador e outro da raça Bretão Postier cujas éguas foram alimentadas com dietas

suplementadas com vitamina E, apresentaram índices de ELISA mais elevados do que os do grupo controle, conforme Figuras 2 e 3. Este fato pode ser explicado pela presença de títulos de anticorpos altos, em ambas as éguas mostrando uma resposta passiva mais eficiente. As éguas do experimento foram acompanhadas diariamente,

sendo que apenas uma égua da raça Bretão Postier apresentou prostração, febre e mucosas pálidas anteriormente à semana do parto, explicando a resposta passiva mais eficiente. As observações hematológicas e sorológicas, desta égua Bretão em particular, estão descritas na (Tabela 3). Esta égua apresentou o maior índice de ELISA, dentre as éguas de ambas as raças, ocorrendo redução do hematócrito e da hemoglobina e, monocitose, quando iniciaram-se os sinais clínicos característicos da babesiose com esfregaços sanguíneos positivos para *T. equi*. Posteriormente, o título de anticorpos decresceu com estabilização dos índices de ELISA entre 4 e 5. Os esfregaços sanguíneos realizados nas semanas 9 a 12 apresentaram Cruz de Malta, sugerindo a multiplicação do protozoário.

Os potros apresentaram índices de ELISA mais elevados do que suas mães, concordando com os resultados de Tenter & Friedhoff. (1986)¹⁵, e Cunha et al (1996)¹⁶, relatando redução gradual dos títulos de anticorpos para *T. equi*, com o aumento da idade dos animais. Em áreas endêmicas, os animais adultos tendem a possuir baixo título de anticorpos devido as constantes reinfecções pela infestação por carrapatos, já os potros sofrem a primo-infecção com altos títulos de anticorpos e, com posterior declínio.

A comparação dos esfregaços sanguíneos individuais dos animais, no dia do nascimento, revelou que três potros nascidos das éguas do Grupo controle estavam positivos, três potros nascidos das éguas da raça Mangalarga Marchador cujas dietas foram suplementadas com vitamina E também estavam positivos e, que nenhum potro nascido de éguas da raça Bretão Postier estava positivo. Este fato poderia ser explicado pela infecção intrauterina de *T. equi*, onde ocorre a passagem de eritrócitos parasitados pela barreira placentária, e que parece ser relativamente comum em áreas endêmicas¹⁷⁻¹⁹.

DISCUSSÃO

A suplementação dietética de vitamina E na dose de 80 mg para cada 100 kg de peso vivo não foi suficiente para modular a resposta imune nas éguas e respectivos potros.

Não houve resposta imunomoduladora da vitamina E no IgG do colostro das éguas.

O ELISA indireto demonstrou ser um ótimo instrumento de verificação do grau de imunidade estabelecida por infecção natural, concordando com Botteon⁶.

Os resultados confirmam a presença de infecção intrauterina em áreas endêmicas e reforçam a necessidade de mais estudos para possibilitar medidas preventivas, assim como o uso de imunomoduladores nos casos de infecção crônica por *T. equi*.

Há necessidade de mais estudos sobre a utilização e quantificação da vitamina E como imunomodulador em eqüinos portadores de babesiose.

RESUMO

Doze éguas gestantes das raças Mangalarga Marchador e Bretão Postier foram distribuídas em 3 grupos onde, o primeiro destinou-se ao controle e os demais ao desafio. Quatro éguas Mangalarga Marchador e quatro Bretão Postier foram suplementadas com 80 mg/100 kg de peso vivo/ dia durante trinta dias pré-parto. A proteína total do colostro foi analisada pelo método de Micro-Kjeldahl e a IgG foi estimada através da concentração proteica. Amostras de soro dos potros foram analisadas pelo método de ELISA indireto para *Theileria equi*. A suplementação com essa quantidade de vitamina E não foi suficiente para estimular a síntese de IgG em éguas gestantes. O parto foi assistido e esfregaços de sangue dos potros foram confeccionados, antes da amamentação. Seis esfregaços sanguíneos de potros Mangalarga Marchador foram positivos para *Theileria equi*, antes da amamentação sugerindo infecção intrauterina. Esses potros desenvolveram babesiose assintomática sem sinais clínicos evidentes devido a presença de anticorpos passivos.

REFERÊNCIAS

- 1.- PFEIFER BARBOSA I, BÖSE R, PEYMANN B, FRIEDHOFF K T. Epidemiological aspects of equine babesiosis in a herd of horses in Brazil. Vet Parasitol 1995; 2: 1-8.
- 2.- CUNHA C W, SILVA S S, OSÓRIO B L, DUTRA C L. Alterações hematológicas em eqüinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. Ciência

- Rural 1998; 28: 283-6.
- 3.- McDOWELL L R. Vitamins in Animal and Human Nutrition. Ed. Academic Press, Inc., p. 157-216, 1989.
- 4.- HOFFMAN R M, MORGAN K L, LYNCH M P. Dietary vitamin and supplemented in the periparturient period influences immunoglobulins in equine colostrum and passive transfer in foals. In: Equine Nutrition and Physiology Symposium, 16th. 1999, Raleigh, North Caroline. *Proceedings* ENPS: Raleigh, p.127-128, 1999.
- 5.- MEO-SCOTONI C M, MACHADO NETO R. Transferência de imunidade passiva em eqüinos: características imunológicas do processo de formação do colostro. *Rev Soc Brasil Zoot* 1992; 21: 200-4.
- 6.- BOTTEON P T L. Aspectos clínicos e epidemiológicos da babesiose: desenvolvimento de um ELISA indireto para diagnóstico de *Babesia equi* (Laveran, 1901). Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias. Seropédica: UFRRJ, 2003. 57p.
- 7.- PORTZ C, LARANJEIRA P V E H, BOTTEON P T L, et al. Influência dos locais de coleta de sangue e do exercício no diagnóstico da babesiose eqüina. Congresso Brasileiro de Parasitologia, 12, Rio de Janeiro. Anais CBPA: Rio de Janeiro. CD-ROM, 2002.
- 8.- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. 2000. SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genética. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Manual do Usuário, 138 p. (versão 8.0).
- 9.- LE BLANC M M, MC LAURIN B I, BOSWELL R. Relationships among serum immunoglobulin concentration in foals, colostrum specific gravity, and colostrum immunoglobulin concentration. *J Amer Vet Medl Ass* 1986; 189: 57-60.
- 10.- ROUSE B T, INGRAM D G. The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk. *Immunology* 1970; 19: 901-7.
- 11.- JEFFCOTT L B. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. *Biol Rev* 1972; 47: 439-64.
- 12.- SCHEIN E. Equine babesiosis. In: RISTIC, M. Babesiosis of domestic animals and man. CRC. Boca Raton, Flórida, p. 197-208, 1988.
- 13.- RIBEIRO M F B, SAITO J F, PIMENTEL P V. Babesiose equina I -Primo Infecção de potros em áreas endêmicas. *Arq Brasil Med Vet Zoot* 1995; 47: 641-7.
- 14.- PASSOS L M F, RIBEIRO M F B, ABDEREGG R I, BÖSE R. Serological diagnosis of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in pregnant mares. *Arq Brasil Med Vet Zoot* 1999; 51: 527-30.
- 15.- TENTER A M, FRIEDHOFF K T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia caballi* infections. *Vet Parasitol* 1986; 20: 49-61.
- 16.- CUNHA C W, SILVA S S, PIMENTEL C A, DAPPER E. Avaliação da frequência de eqüinos soropositivos a *Babesia equi* no Jockey Clube de Pelotas e em dois haras da zona sul do Rio Grande do Sul, RS. *Rev Brasil Parasitol Vet* 1996; 5: 119-22.
- 17.- NEITZ W O. Classification, transmission and biology of piroplasms of domestic animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1956; 64: 56-111.
- 18.- ERBSLÖH J K E. Babesiosis in the newborn foal. *J Reprod Fert* 1975; 23: 725-6.
- 19.- DE WAAL D T. Equine Piroplasmosis: a review. *Br Vet J* 1992; 148: 6-13.