

IMUNOLOGIA ENVOLVIDA EM AVES

1. SISTEMA IMUNOLÓGICO DE AVES

No corpo animal há um impressionante mecanismo de proteção, chamado sistema imunológico. O sistema imunológico é responsável por detectar a presença de um antígeno, sendo ele uma substância química ou um ser estranho ao organismo (bactérias, vírus, proteínas) e transmitir a informação ao resto do corpo para que esse possa responder com alterações metabólicas e comportamentais, que afetem o desempenho e a exigência em nutrientes. O sistema imunológico funciona 24 horas por dia e age de modos diferentes, porém trabalha quase sem ser notado. Só o notamos quando o sistema imunológico falha por alguma razão ou, quando ele faz alguma coisa que produz um efeito colateral que podemos observar (1). De fato, para proteger o corpo de infecções, a ação do sistema imunológico decorre de três maneiras diferentes:

- 1- O sistema imunológico cria uma barreira que impede que os micro-organismos entrem no corpo do animal.
- 2- Se algum micro-organismo penetrar no corpo da ave, o sistema imune tenta detectá-lo e eliminá-lo antes que se aloje e se reproduza.
- 3- Se algum micro-organismo se reproduzir e começar a causar problemas, o sistema imunológico é responsável por eliminá-lo.

O sistema imune mantém seu próprio sistema de circulação (os vasos linfáticos), o qual permeia todos os órgãos do corpo, excetuando-se o cérebro. Ao longo dos vasos linfáticos existem áreas especiais (nódulos linfáticos, medula óssea, baço, fígado, pulmões e intestinos) nas quais é possível recrutar, mobilizar e deslocar linfócitos até zonas específicas como parte da resposta imune (2). Esses órgãos e tecidos do sistema imune são classificados em órgãos linfoides primários e secundários. Os órgãos linfoides primários fornecem o microambiente apropriado para o desenvolvimento e a maturação dos linfócitos, enquanto que os órgãos linfoides secundários aprisionam o antígeno, geralmente das proximidades dos tecidos ou espaços vasculares, e são locais onde os linfócitos maduros podem interagir efetivamente com o antígeno. Somente após a maturação do linfócito, dentro de um órgão linfoide primário, as células se tornam imunocompetentes. As células do sistema imune não estão presentes somente nos tecidos e órgãos linfoides, encontram-se também distribuídas na maioria dos compartimentos anatômicos, transitando através da circulação sanguínea e linfática, tentando evitar a entrada e o estabelecimento de agentes infecciosos.

A estrutura e a diferenciação dos órgãos linfoides, nas aves, apresenta diferenças marcantes, embora o sistema imune funcione de maneira

semelhante ao dos mamíferos. Os tecidos linfoides primários são o timo, a medula óssea e a Bursa de Fabricius. Enquanto, os tecidos linfoides óculo-nasais (glândula de Harder e agregados linfoides das pálpebras inferiores), gastrointestinais (tonsilas esofágica, pilórica e cecais, a presença de Placas de Peyer e divertículo de Meckel) e o baço são classificados como órgãos linfoides secundários, bem como os tecidos linfóides distribuídos pelo organismo associados às mucosas (MALT), tais como o CALT (associado à conjuntiva), o BALT (associado aos brônquios) e o GALT (associado ao intestino) (1, 2). Destacando a ausência de linfonodos nas aves.

Outros componentes importantes do sistema imunológico são as células sanguíneas brancas, o sistema complemento, hormônios (timosinas, linfoquinas, interleucinas, esteróides e corticosteroides) e os anticorpos (imunoglobulinas). As células brancas (heterófilos nas aves, macrófagos, monócitos, linfócito T e linfócitos B) são produzidas na medula óssea e destinadas ao local de atuação (3, 4). Desta maneira entre os componentes celulares destacam-se as células fagocíticas (polimorfonucleares e mononucleares), células indutoras de respostas inflamatórias (mastócitos, basófilos, eosinófilos, células NK, células Th17 e células $\gamma\delta$), células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e as células imunocompetentes do sistema imune adaptativo (células B, plasmócitos, células T, células T-auxiliares, células T-citotóxicas, células T supressoras).

1.1 Imunidade Inata

O sistema imunológico das aves é subdividido em sistema imune inato e adaptativo, que estão sob o controle de vários mecanismos regulatórios.

A primeira linha de defesa contra patógenos invasores é feita por mecanismos imunes inatos, sendo composto por barreiras físicas e químicas, células fagocitárias, células dendríticas e células *natural killer*, proteínas do sangue, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; e as citocinas imunoregulatórias que servem como sinal de estímulo para o sistema imunológico agir contra o organismo invasor, todos esses componentes realizam o primeiro contato do sistema imune com o desafio, além de possuir a característica de inespecificidade em relação ao desafio das aves, ou uma especificidade relativa, por um grupo de patógenos. Como o próprio nome “inato” sugere, o sistema existe independente da presença de imunógenos (1, 2). Ademais, participam também vários outros fatores, entre eles a lisozima, uma enzima hidrolítica presente nas secreções da mucosa e nas lágrimas (4, 5, 6).

A população de células dendríticas é heterogênea e a única capaz de ativar linfócito T. Essas células apresentam na superfície celular alguns receptores que reconhecem um padrão de reconhecimento (PRRs), através

destes, ligam-se a micro-organismos ou seus produtos e esta interação estimula estas células a produzir citocinas. Receptores *toll-like* (TLR), receptor do tipo lectina C e proteínas NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*) também são PRR (7, 8). Como o número de receptores está limitado pelo número de genes de cada animal, o sistema inato não é de reconhecer cada novo imunógeno, mas sim de reconhecer padrões que se repetem em vários patógenos, padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Neste sentido, o reconhecimento de microrganismo ou de substâncias antigênicas pelos fagócitos depende de um número limitado de receptores, os PRRs, que reconhecem os PAMPs (8).

O sucesso do sistema imune na resposta a um desafio é associado a três mecanismos distintos; primeiramente responde em poucas horas à agressão pelo reconhecimento dos PAMPs (imunidade inata); posteriormente constrói uma resposta tardia que discrimina o agente agressor do que é próprio; e finalmente culmina com a memória imunológica (imunidade adaptativa) e mantém a tolerância às proteínas próprias.

1.2 Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa é capaz de reconhecer e eliminar seletivamente moléculas e micro-organismos estranhos específicos. Diferentemente das respostas imunes inatas, as respostas adaptativas não são as mesmas em todos os membros de uma espécie, mas são reações a desafios antigênicos específicos, apresentando especificidade antigênica, diversidade, memória imunológica e reconhecimento do próprio e não-próprio. Além disso, possui uma extraordinária capacidade de distinguir micro-organismos e moléculas diferentes e até mesmo micro-organismos e moléculas estreitamente relacionados, isto é, imunidade específica. Portanto, atua de maneira mais lenta e possui mecanismos de defesa específicos tanto humorais como celulares responsáveis pelo combate do organismo invasor através da ação dos linfócitos, preparando o hospedeiro para um futuro contato com o mesmo agente (2, 5). Existem dois tipos de resposta imune adaptativa, denominada imunidade humoral e imunidade celular, as quais são mediadas por diferentes componentes do sistema imunológico (1, 2).

A resposta adaptativa está relacionada com a função de dois órgãos importantes, a bursa de Fabricius e o timo. Sabe-se que os linfócitos são produzidos na medula óssea e carregados para o timo ou para a bursa de Fabricius onde sofrem maturação e se tornam funcionais. Os linfócitos que sofrem maturação na bursa de Fabricius são chamados de linfócitos B e são responsáveis pela produção de anticorpos. Já os linfócitos que são maturados no timo são chamados de linfócitos T os quais ativam células para destruição de antígenos e controlam a resposta imunológica (4, 9).

Na imunidade humoral, os anticorpos produzidos previamente pelos linfócitos B, chamados de imunoglobulinas possuem uma ação específica de combate. Algumas das imunoglobulinas presentes nas aves são: IgM, IgY e IgA. A IgM é o primeiro anticorpo a aparecer após uma infecção assim como a IgA, sendo que este último se encontra presente nas secreções e mucosas. A classe IgY é classificada nas aves como sendo IgG e IgE dos mamíferos e como tal, aparecem posteriormente e são mais específicas para reconhecimento pelo linfócito B e produção de anticorpos (10, 11).

As células que medeiam a imunidade específica retêm uma "memória" de seu encontro com os patógenos mesmo depois deste ter sido eliminado do corpo e que a resposta imune detectável diminuiu, assim ela reproduz memória imunológica para um contato secundário com o mesmo agente.

Em geral, quatro tipos de imunidade são importantes na proteção de uma ave contra desafios ou por um agente infeccioso. Elas são: anticorpos circulantes ou humorais, imunidade produzida localmente no trato respiratório ou intestinal, imunidade mediada por células – T e a imunidade de origem materna. Altos níveis de anticorpos humorais são produzidos em resposta à infecção ou pela vacinação (12).

1.3 Imunização de Mucosa

Superfícies da mucosa do trato respiratório, trato intestinal e urogenital são a porta de entrada para a maioria dos patógenos. O estabelecimento de uma primeira linha de defesa local dentro do epitélio da mucosa para prevenir a infecção tem benefícios substanciais na luta contra uma infecção sistêmica estabelecida. A escolha da via de administração da vacina requer conhecimento quanto à patogenicidade do agente, já que todos os métodos possuem vantagens e desvantagens. Tanto a vacina viva atenuada como a vacina inativada de mucosa é desenvolvida para atender a necessidade de uma melhor proteção contra patógenos que ganham acesso ao corpo através da superfície das mucosas (13, 14). Enfermidades que cursam com problemas respiratórios como a bronquite infecciosa das aves apresenta melhor resposta quando a vacina é administrada óculo-nasal, estimulando proteção local, tendo a glândula de Harder importância fundamental sobre a resposta vacinal feita por essa via.

A administração de vacinas nas superfícies das mucosas demonstrou provocar uma resposta imune humoral e celular adequada no local da administração e em locais distantes das mucosas, como também uma resposta imune sistêmica. Após a imunização da mucosa, células T e B antígeno-específico deixam os linfonodos de drenagem, circulam através da linfa, entram na circulação sanguínea e, em seguida, "residem" nos tecidos da mucosa. A proteção contra patógenos também podem ser efetivamente alcançada pela

memória direcionada e células imunes efetoras para as membranas das mucosas através de receptores específicos de tecidos. Na verdade, a imunização via mucosa induz a resposta de memória das células B e T. Todavia, a vacinação por meio parenteral (intramuscular ou subcutânea) mal promove a proteção imunológica nas mucosas (13). Na vacinação das mucosas, a resposta imune é induzida fortemente, no local da vacinação e em locais anatomicamente adjacentes. De fato, a imunização intranasal estimula eficientemente uma resposta imune nos pulmões e no trato respiratório superior e em locais distantes do sítio de administração, tais como a mucosa do trato genital e gástrico, mas é bastante pobre em estimular resposta imune intestinal (15).

O sistema imune da mucosa é dividido em sítios indutivos (áreas onde o antígeno leva a ativação inicial das células do sistema imune) e efetores (anticorpos e células do sistema imune desempenham a sua função específica, após ativação). O objetivo da imunização da mucosa é o desenvolvimento da resposta imune adaptativa na própria mucosa, assim prevenindo a invasão de agentes patogênicos por esta via. Isto é conseguido através da apresentação de antígenos para a mucosa, estimulando a sua captação e processamento pelas células apresentadoras de antígeno (APC), como macrófagos e células dendríticas, presentes nos tecidos das mucosas. Os principais locais indutivos para respostas imunes nas mucosas consistem na região de tecido linfóide associado à mucosa (MALT), bem como os seus nódulos linfáticos regionais adjacentes.

Células APC migram para o MALT e/ou nódulo linfático mais próximo localizado no tecido subepitelial, onde apresentam os antígenos processados para ativar as células T, após apresentarem em sua superfície moléculas do complexo de histocompatibilidade principal I (MHC-I) ou MHC-II ligadas a peptídeos. A presença de um elevado número de APCs e células imunes para os locais indutores nas mucosas é a base para uma resposta imune eficiente na mucosa contra invasões externas potencialmente nocivas (16, 17, 18).

Ativação das células T conduz à geração de células T antígeno-específicas, que também contribuem para a maturação e diferenciação de células B em plasmócitos e células de memória. As principais células efetoras nas superfícies das mucosas são os linfócitos T $CD4^+$ (Th: $CD4^+CD8^-$ TCR/ $CD3^{alto}$) e $CD8^+$ (Tc: $CD4^-CD8^+$ TCR/ $CD3^{alto}$). Vários tipos celulares induzem/ativam as células Tc a se tornar linfócitos T citotóxicos (CTLs). Os plasmócitos são os responsáveis pela produção de anticorpos como IgG, IgA, a qual será liberada na superfície da mucosa (19, 20).

Após a vacinação da mucosa, as barreiras à infecção nas mucosas são reforçadas, principalmente através da indução da produção de anticorpos específicos como imunoglobulina A secretora (IgAs), que impede patógenos e toxinas de aderirem ou infectar as células epiteliais da mucosa, alterando as

condições de crescimento para microrganismos patogênicos e assim, reduzindo a susceptibilidade à infecção. Por exemplo, alterando a secreção de fatores do hospedeiro envolvidos na resistência à infecção da mucosa (tais como peptídeos antimicrobianos, quimiocinas e citocinas), a membrana mucosa pode resistir melhor aos ataques dos agentes patogênicos intrusos (21).

No processo de resposta imune da mucosa, a interação do antígeno com as células dendríticas estimula a produção e liberação de citocinas IL-4, IL-10 e IL-12, NO (óxido nítrico). Tais citocinas provocam a maturação dos linfócitos Th, CD4+ em Th1 (devido ao IL-10 e IL-4) e Th2 (devido ao IL-12). As células Th1 produzem as citocinas IL-2, TNF β e INF γ e as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 sendo que o INF γ inibe a proliferação das células Th2 e B, porém a produção dessas citocinas é inibida pela presença de IL-10 (17). As citocinas produzidas por Th2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 afetam os linfócitos B, promovendo a troca recombinante de classe nas imunoglobulinas de sua superfície de SIgM em SIgA, induzindo sua proliferação e diferenciação desses linfócitos B em plasmócitos secretores de IgA (17, 18).

A indução de anticorpos das mucosas requer a exposição de antígenos na mucosa em combinação com sinais co-estimuladores, que resultam no deslocamento dos plasmócitos para a mucosa, levando a recombinação e ativação de IgA. A maior parte dos IgA é destinada a secreção local para promover a captura de antígeno e para prevenir o contato direto na mucosa por bactérias comensais ou patógenos. Os anticorpos IgA secretório proporcionam uma barreira imunológica eficaz da resposta imune adaptativa contra infecções subsequentes pelo mesmo agente patogênico (22, 23). Portanto, a IgA secretada tem como função proteger os animais dos antígenos na mucosa, proteção conferida por mecanismos de exclusão, compreendendo a incapacidade de adesão dos antígenos ou patógenos ao epitélio pela reação antígeno-anticorpo específico; e também por secreção, no qual os antígenos que por acaso ultrapassam o epitélio, são capturados pelas IgAs e conduzidas para o lúmen através dos receptores de Ig (22, 23). A magnitude da resposta imune celular e humoral observada na imunização de mucosa, a torna interessante e uma opção atrativa, como uma via de administração potencial de vacinas.

De fato, as vacinas mais eficientes são as que induzem resposta imune humoral e celular, a maioria das vacinas convencionais induzem somente respostas de anticorpos com uma imunidade celular limitada (24), sendo que a maioria é administrada via parenteral contra patógenos ou toxinas sistêmicas. Essas vacinas provocam uma resposta imune sistêmica forte (produção de anticorpos), mas uma resposta imune fraca na mucosa (13). As vacinas sistêmicas são mais caras, requerem administração por pessoal treinado, apresentam riscos de segurança relacionados com infecção no local da

injeção, reutilização de agulhas e sua eliminação. Em contraste, a vacinação de mucosa é mais facilmente distribuída, permite a administração de múltiplos antígenos, induz o desenvolvimento de anticorpos na mucosa e resposta imune celular sistêmica e local transformando-a em um local alvo ideal para a vacinação (13, 25). Há um consenso geral de que a eficácia das vacinas de mucosas contribui drasticamente para a melhoria da saúde animal, estimulando respostas imunes não só contra infecções das mucosas, mas também contra outras possíveis infecções.

Referência Bibliográficas

- 1- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia. W.B. Saunders Company, 2012.
- 2- KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. *Kuby Imunologia*. 6^a ed. São Paulo, Revinter, 2008.
- 3- SHARMA, J.M., Section ed. Avian Immunology. In: P.P. Pastoret, P. Griebel, H. Bazin, A. Govaats, eds. 1998. In: Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press, 1998. p73-136. TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo, Roca, 1998.
- 4- RITCHIE, B. W. Viral attack and avian response. In: _____ *Avian Viruses: Function and Control*. 1995.
- 5- ERF, G. F. Cell-Mediated Immunity in Poultry. *Poultry Science*, v.83, p. 580-590, 2004.
- 6- QURESHI, M. A. Avian macrophage and immune response: An overview, *Poultry Science*, v. 82, p. 691-698, 2003.
- 7- ROBINSON, M. J.; SANCHO, D.; SLACK, E. C.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; SOUSA, C. R. E. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nature Immunology*, v.7, p.1258-1265, 2006.
- 8- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, v.449, p.819-826, 2007.
- 9- TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo, Roca, 1998.
- 10-DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.283-300.
- 11-MORGULIS, M. S. Imunologia Aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLEZ, E. *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 231-245. 2002.
- 12-MONTGOMERY, R.D., MASLIN, W.R., BOYLE, C.R. Effects of Newcastle Disease Vaccines and Newcastle Diseases/Infectious Bronchitis Combination Vaccines on the Head-Associated Lymphoid Tissues of the Chicken. *Avian Diseases*, v.41, p. 399-406, 1997.
- 13-NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, p.148-58, 2006.
- 14-GIUDICE, E. L.; CAMPBELL, J. D. Needle-free vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.58, p.68-89, 2006.

- 15-MONDEL, M.; SCHROEDER, B. O.; ZIMMERMANN, K.; HUBER, H.; NUDING, S.; BEISNER, J.; FELLERMANN, K.; STANGE, E. F.; WEHKAMP, J. Probiotic, *E. coli* treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunology*, v.2, p.166–72, 2009.
- 16-BRANDTZAEG, P.; KIYONO, H.; PABST, R.; RUSSELL, M. W. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunology*, v. 1, p. 31-37, 2008.
- 17-HAGLUND, K.; LEINER, I.; KERKSIEK, K.; BUONOCORE, L.; PAMER, E.; ROSE, J. K. High-level primary CD8(+) T-cell response to human immunodeficiency virus type 1 gag and env generated by vaccination with recombinant vesicular stomatitis viruses. *Journal of Virology*, v. 76, p. 2730-2738, 2002.
- 18-BOYER, J. D.; COHEN, A. D.; VOGT, S.; SCHUMANN, K.; NATH, B.; AHN, L.; LACY, K.; BAGARAZZI, M. L.; HIGGINS, T. J.; BAINE, Y.; CICCARELLI, R. B.; GINSBERG, R. S.; MACGREGOR, R. R.; WEINER, D.B. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 181, p. 476-483, 2000.
- 19-SAJIC, D.; PATRICK, A. J.; ROSENTHAL, K. L. Mucosal delivery of CpG oligodeoxynucleotides expands functional dendritic cells and macrophages in the vagina. *Immunology*, v.114, p. 213–24, 2005.
- 20-COFFIN, S. E.; CLARK, S. L.; BOS, N. A.; BRUBAKER, J. O.; OFFIT, P. A. Migration of antigen-presenting B cells from peripheral to mucosal lymphoid tissues may induce intestinal antigen-specific IgA following parenteral immunization. *Journal of Immunology*, v.163, p.3064–70, 1999.
- 21-LAMM, M. E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annual Review of Microbiology*, v.51, p.311–40, 1997.
- 22-MACPHERSON, A. J.; MCCOY, K. D.; JOHANSEN, F. E.; BRANDTZAEG, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*, v.1, p.11–22, 2008.
- 23-MORA, J. R.; IWATA, M.; EKSTEEN, B.; SONG, S. Y.; JUN, T.; SENMAN, B.; OTIPOBY, K. L.; YOKOTA, A.; TAKEUCHI, H.; RICCIARDICASTAGNOLI, P.; RAJEWSKY, K.; ADAMS, D. H.; VON ANDRIAN, U. H. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*, v.314, p.1157–60, 2006.
- 24-VAJDY, M.; SRIVASTAVA, I.; POLO, J.; DONNELLY, J.; O'HAGAN, D.; SINGH, M. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunology and Cell Biology*, v. 82, p. 617-27, 2004.
- 25-LAMBKIN, I.; PINILLA, C.; HAMASHIN, C.; SPINDLER, L.; RUSSELL, S.; SCHINK, A.; MOYA-CASTRO, R.; ALLICOTTI, G.; HIGGINS, L.; SMITH, M.; DEE, J.; WILSON, C.; HOUGHTEN, R.; O'MAHONY, D. Toward targeted oral vaccine delivery systems: selection of lectin mimetics from combinatorial libraries. *Pharmaceutical Research*, v. 20, p. 1258-1266, 2003.