

Metodologias para avaliação da imunidade em aves de produção

Micaela Guidotti Takeuchi
Marcos Barcellos Café



NAVEGANDO

METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DA
IMUNIDADE EM AVES DE PRODUÇÃO
Micaela Guidotti Takeuchi & Marcos Barcellos Café

Micaela Guidotti Takeuchi
&
Marcos Barcellos Café

**METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DA
IMUNIDADE EM AVES DE PRODUÇÃO**

1ª Edição Eletrônica

**Uberlândia / Minas Gerais
Navegando Publicações
2016**



NAVEGANDO

Navegando Publicações



NAVEGANDO

www.editoranavegando.com

editoranavegando@gmail.com

Uberlândia – MG,

Brasil

Copyright © by autor, 2019.

A235 – Takeuchi, Micaela Guidotti; Café, Marcos Barcellos. Metodologias para avaliação da imunidade em aves de produção. Uberlândia, Navegando Publicações, 2016.

ISBN: 978-85-92592-28-8



10.29388/978-85-92592-28-8

1. Medicina Veterinária. 2. Farmacocinética. 3. Farmacogenética I. Micaela Guidotti Takeuchi; Marcos Barcellos Café. II. Navegando Publicações. Título.

CDD – 610

CDU – 61

Revisão/ Diagramação – Lurdes Lucena

Índice para catálogo sistemático

Medicina	610
Farmacologia	615



Editores

Carlos Lucena – UFU, Brasil

José Claudinei Lombardi – Unicamp, Brasil

José Carlos de Souza Araújo – Uniube/UFU, Brasil

Conselho Editorial

Afrânio Mendes Catani – USP, Brasil

Alberto L. Bialakowsky – Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Ángela A. Fernández – Univ. Autónoma de Sto. Domingo, República Dominicana

Anselmo Alencar Colares – UFOPA, Brasil

Carlos Lucena – UFU, Brasil

Carlos Henrique de Carvalho – UFU, Brasil

Carolina Crisorio – Universidad de Buenos Aires, Argentina

Cilson César Fagiani – Uniube, Brasil

Christian Cwik – University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad & Tobago

Christian Hausser – Universidad de Talca, Chile

Daniel Schugurensky – Arizona State University, EUA

Dermeval Saviani – Unicamp, Brasil

Elizet Payne Iglesias – Universidad de Costa Rica, Costa Rica

Fabiane Santana Previtali – UFU, Brasil

Francisco Javier Maza Avila – Universidad de Cartagena, Colômbia

Gilberto Luiz Alves – UFMS, Brasil

Hernán Venegas Delgado – Universidad Autónoma de Coahuila, México

Iside Gjergji – Universidade de Coimbra - Portugal

Iván Sánchez – Universidad del Magdalena – Colômbia

João dos Reis Silva Júnior – UFSCar, Brasil

Jorge Enrique Elías-Caro – Universidad del Magdalena, Colômbia

José Carlos de Souza Araújo – Uniube/UFU, Brasil

José Claudinei Lombardi – Unicamp, Brasil

José Jesus Borjón Nieto – El Colégio de Vera Cruz, México

José Luis Sanfelice – Univás/Unicamp, Brasil

Lívia Diana Rocha Magalhães – UESB, Brasil

Mara Regina Martins Jacomeli – Unicamp, Brasil

Miguel Perez – Universidade Nova Lisboa – Portugal

Newton Antonio Paciulli Bryan – Unicamp, Brasil

Paulino José Orso – Unioeste – Brasil

Raul Roman Romero – Universidad Nacional de Colombia – Colômbia

Ricardo Antunes – Unicamp, Brasil

Robson Luiz de França – UFU, Brasil

Sérgio Guerra Vilaboy – Universidad de la Habana, Cuba

Silvia Mancini – Université de Lausanne, Suíça

Teresa Medina – Universidade do Minho – Portugal

Tristan MacCoaw – Universit of London – Inglaterra

Valdemar Sguissardi – UFSCar – (Aposentado), Brasil

Victor-Jacinto Flecha – Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción, Paraguai

Yoel Cordoví Núñez – Instituto de História de Cuba, Cuba

SUMÁRIO

Introdução	07
I – Revisão da Literatura	11
1. Características do sistema imunológico das aves	11
II – Avaliação da resposta imune	23
III – Avaliação da resposta imune adaptativa	27
3.1. Dosagem das Imunoglobulinas séricas	27
3.2. Inibição da Hemoaglutinação	30
3.3. Soroaglutinação rápida	32
3.4. Avaliação funcional das imunoglobulinas	33
3.5. Avaliação funcional utilizando vacina para a doença de Newcastle e eritrócitos de carneiro	35
3.6. Avaliação funcional utilizando separação das proteínas plasmáticas	37
3.7. Avaliação das subpopulações de linfócitos T	40
3.8 Resposta de hipersensibilidade interdigital a fitohemaglutinina – PHA	44
IV – Avaliação da imunidade inata	47
4.1. Avaliação de fagócitos	47
4.2. Peso dos órgãos linfóides	50
Considerações Finais	53
Referências	57

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de informações científicas novas está relacionado com os progressos na metodologia e o desenvolvimento de novos procedimentos, novas técnicas ou instrumentos.

Na literatura científica, a utilização de metodologias para avaliação da resposta imune inata e adquirida são caracterizadas por serem complexas e em alguns aspectos pouco conhecidas.

A necessidade de se conhecer as metodologias utilizadas faz-se necessário para a otimização e compreensão da ação imunológica nas aves de produção.

Apesar dos avanços no conhecimento global sobre imunologia, alguns desafios remanescem no âmbito da medicina veterinária, principalmente as particularidades inter e intra- espécies (mamíferos e aves).

Embora diretrizes precisas não possam ser traçadas, nos últimos anos, está ocorrendo um grande crescimento da imunologia na área animal e a relação existente com diferentes aspectos da fisiologia, nutrição e sanidade animal.

Esse impulso se deve, em parte, pelo aprofundamento do conhecimento dos mecanismos imunológicos e à maior disponibilidade de métodos de diagnóstico disponíveis para mensurar o sistema imune.

Deve-se, também, ao crescente interesse em estudar os impactos da imunocompetência sobre o organismo animal, o efeito do manejo na produção e os programas de vacinação preconizados, que afetam a saúde dos animais e a saúde da população em geral.

No entanto, o principal impulso para o crescimento dessa área é, sem dúvida, o reconhecimento do sistema imune como elemento-chave na regulação das funções dos processos biológicos.

Esta compreensão dos impactos do sistema imune na produção avícola significa muito mais que a elucidação de algumas vias metabólicas: significa a possibilidade de compreender um pouco melhor a relação do status sanitário com uma boa performance zootécnica das aves, relação complexa onde a competência imunológica desempenha papel primordial.

Com o intuito de avaliar as metodologias para mensurar a competência imunológica, a uti-

lização correta das ferramentas obtidas na avaliação da imunidade, os principais processos do sistema imune das aves e as particularidades dos ensaios laboratoriais, esta revisão de literatura enfatiza as principais metodologias utilizadas com o objetivo de discorrer acerca dos conceitos básicos da avaliação da imunidade em aves de produção.

I

Revisão da Literatura

1. Características do sistema imunológico das aves

Por definição, a palavra imunidade é latina (*immunitas*), conceito utilizado pelos senadores romanos que utilizavam de proteções legais durante o período de mandato (ABBAS, 2008). Como conceito biológico, imunidade significa a resposta desencadeada a agentes estranhos e proteção contra doenças, principalmente, doenças infecciosas (ABBAS, 2008).

O estado imunológico tem papel primordial na manutenção da homeostasia e no combate a desafios contra agentes patogênicos; fatores estes determinantes para a manutenção da sanidade animal. Quando essa homeostase é quebrada, a resposta imunológica consome grande parte dos

recursos orgânicos (energia e nutrientes) (KLASING & KOVER, 1997).

Devido ao curto período de criação e importância econômica, muitas pesquisas para avaliação das características imunológicas em aves, utilizam a espécie *Gallus gallus domestic* (DAVISON, 2008; TIZARD, 2010; BROWNLIE & ALLAN, 2011), embora patos também são amplamente utilizados (DAVISON, 2008; BROWNLIE & ALLAN, 2011).

O sistema imune das aves possui diversas semelhanças com o de mamíferos, porém apresentam características únicas (DAVISON, 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário, as células hematopoiéticas embrionárias imaturas migram do saco embrionário para a corrente sanguínea do embrião e deste para o baço, onde formarão os glóbulos vermelhos e brancos.

A partir disto, colonizam os órgãos primários (bursa e timo) por meio de fatores quimiotáticos que atraem as células e permitem a colonização destes órgãos por volta do sexto dia de incubação para o timo e na bursa, por volta do décimo dia de incubação (OLÁH & VERVELDE, 2008) até a terceira semana após a eclosão quando ocor-

re a maturação dos órgãos primários e secundários (JUUL-MADSEN, 2008)

Dessa maneira, pode-se definir a estrutura do sistema imune das aves em dois:

- sistema linfóide primário (bursa de Fabrício e Timo) e,

- sistema linfóide secundário (baço e tecidos linfóides associados a mucosas: glândula de Harder, intestino, brônquios, placas de Peyer, divertículo de Meckel, tonsilas cecais e pineal) (OLÁH & VERVELDE, 2008)

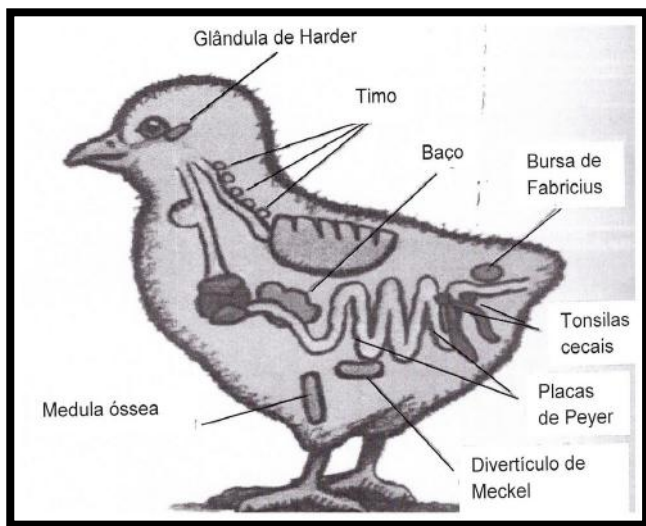
As células são então, conduzidas para a bursa de Fabrício e para o timo e nestes órgãos ocorre o desenvolvimento da sua eficácia imunológica. Devido a isto, as células B e T possuem origem extrínseca a estes dois órgãos (JUUL-MADSEN, 2008; OLÁH & VERVELDE, 2008) e que apresentam componentes de morfologia e função distintas (AKETER et al, 2006).

O timo possui pequenos linfócitos, responsáveis pela imunidade adaptativa mediada por células e por outro lado, a bursa de Fabrício possui grandes linfócitos que, ativados, diferenciam-se em plasmócitos, que são responsáveis pela produção dos diferentes isotipos de imunoglobulinas e

que desempenham um papel primordial na imunidade humoral (AKTER et al, 2006).

Após a maturação sexual, ocorre uma involução da bursa de Fabrício e os linfócitos B, desenvolvidos na bursa são encontrados nos órgãos linfóides secundários (JUUL-MADSEN, 2008). Os linfócitos T também são transferidos para órgãos linfóides secundários (baço, medula óssea e tecidos linfóides do sistema digestório e respiratório (MORGULIS, 2002).

FIGURA 1 – Órgãos linfóides primários e secundários de aves jovens.



Fonte: Guia Gessulli, 2003.

Didaticamente a resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa (JEURISSEN et al., 2002).

A principal diferença entre elas são os componentes celulares que as compõem: macrófagos, células polimorfonucleares como os heterófilos, trombócitos e células NK e as citocinas derivadas dos macrófagos representam a imunidade inata (JEURISSEN et al., 2002; ABBAS 2008; JUULMADSEN, et al. 2008), enquanto a imunidade adaptativa envolve principalmente linfócitos T e B e as citocinas produzidas por estas células (ABBAS, 2008).

A imunidade inata é a primeira resposta a invasão e quebra da homeostasia por patógenos e este é crucial na limitação da multiplicação destes microorganismos e na ativação da imunidade adaptativa em caso de persistência destes agentes (KAISER, 2010).

Durante muitos anos a resposta imune inata foi considerada como não-específica, ou seja, que haviam receptores únicos incapazes de reconhecer os patógenos de maneira específica e que era incapaz de discriminar as moléculas próprias, das não próprias (KAISER, 2010).

Em um conceito atual, sabe-se que o reconhecimento dos patógenos específicos pelas células (fagócitos) do sistema imune inato é realizada por meio de receptores, denominados receptores de reconhecimento padrão - PRRs, que permite o reconhecimento de diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) dos microorganismos: LPS (bactérias gram-negativas), ácido lipoteicóico, flagelina, peptidoglicano (bactérias gram-positivas), ácido nucléico microbiano (fita simples e fita dupla), receptor de manose e receptor de debris celulares (KAISER, 2010; BROWN-LIE & ALLAN, 2011)

Estes receptores estão presentes nas membranas de heterófilos, células NK e células dendríticas (KAISER, 2010).

As aves possuem repertórios diferentes de Toll-like receptores (um tipo de PRR), diferenças estruturais de anticorpos e citocinas, comparadas a mamíferos (KAISER, 2010).

Através disso, é possível diferenciar as moléculas próprias das não próprias do organismo. O reconhecimento das células próprias é realizado por meio do complexo de histocompatibilidade (MHC).

Essas moléculas de MHC são herdadas por uma herança co-dominante, ou seja, expressam alelos dos pais, avós e bisavós. Estas moléculas caracterizam o indivíduo e por meio delas, pode-se, por exemplo, determinar o quanto evoluído é a espécie em estudos com fósseis.

Após a ligação dos PAMPs aos PRRs ocorre a estimulação da produção de citocinas, proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana (Lisozi-mas, por exemplo) que regulam a resposta da imunidade inata: opsonização pelas proteínas do sistema complemento e o processo de fagocitose pelos heterófilos e macrófagos (KAISER, 2010).

As aves possuem uma distinção quanto as células polimorfonucleares com relação a mamíferos: possuem heterófilos, mas não possuem neutrófilos e eosinófilos (BROWNLIE & ALLAN, 2011).

Os heterófilos, equivalentes aos neutrófilos em mamíferos, são considerados importantes na resposta imune inata, desencadeando a explosão respiratória com consequente produção de reativos de oxigênio que eliminam os patógenos após a fagocitose (KAISER, 2010).

Embora, por diversas vezes, a resposta imune inata é suficiente para debelar a invasão

das barreiras naturais, em outras ocasiões a resposta imune adaptativa é requerida quando há persistência dos patógenos, resultando em células que promoverão a memória imunológica (JEURISSEN et al., 2002).

A resposta imune adaptativa pode ser humoral (com produção de anticorpos) e resposta imune celular (realizada pelos linfócitos T) e ambas atuam conjuntamente nas respostas a invasão microbiana (JEURISSEN et al., 2002; HOLT et al., 2005).

A resposta imune adaptativa inicia-se com a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) que capturam antígenos e/ou microorganismos e apresentam-nos aos linfócitos T, que reconhecem este por meio do MHC presente nas APCs (ABBAS, 2008; KAISER, 2010).

Na resposta imune humoral, as imunoglobulinas são secretadas por plasmócitos, derivados de linfócitos B, que são estimulados a produzirem após o contato com os antígenos (VOGT, 2005).

Os antígenos que induzem à produção de anticorpos pelas células B podem ser divididos em dois tipos: T-independentes e T-dependentes de células T-helper (ThCD4⁺) (SILVA, 2009). A

produção de anticorpos é dependente da natureza dos antígenos (SILVA, 2009).

Como resposta deste reconhecimento do antígeno, estimula-se a proliferação e a ativação das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ (ABBAS, 2008; SILVA, 2009; KAISER, 2010).

Dependendo do microambiente em que estão (produção de citocinas diferentes), os linfócitos T irão se diferenciar em subpopulações denominadas Thelper 1 (Th1) e Thelper 2 (Th2).

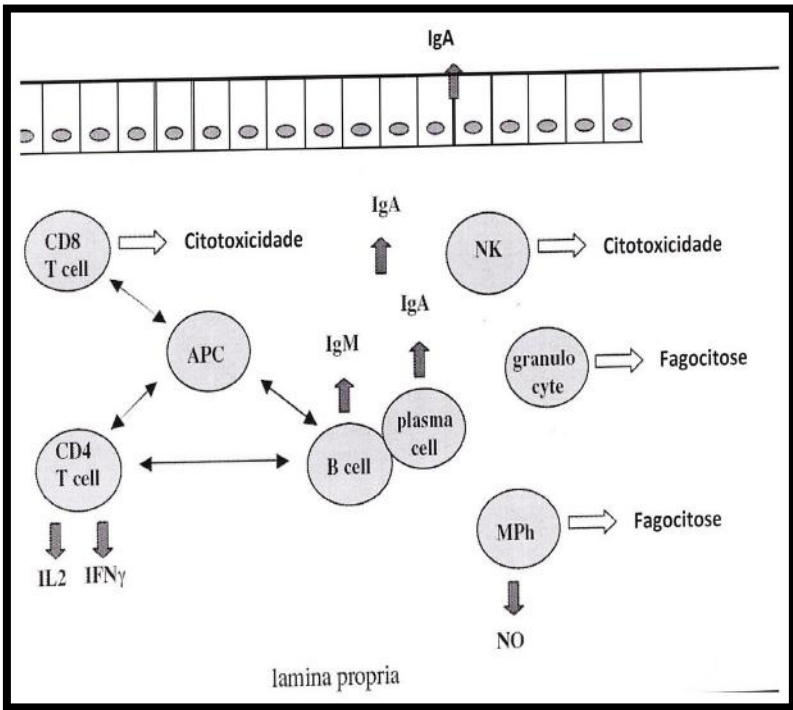
Linfócitos Th1 estimulam as células T $CD8^+$, células NK e macrófagos, enquanto os linfócitos Th2 estimulam os heterófilos e linfócitos B a agirem sobre os patógenos (KAISER, 2010).

Desta maneira, existe uma interrelação entre a imunidade inata e a imunidade específica: os macrófagos liberam citocinas que ativam os linfócitos T em resposta a um estímulo inflamatório e da mesma maneira, os linfócitos T são capazes de liberar citocinas que ativam os macrófagos (MORGULIS, 2002).

A estimulação dos linfócitos B pelos linfócitos Th2 somado a um microambiente específico (formado por citocinas diversas) promovem a diferenciação dos plasmócitos e a produção de imunoglobulinas específicas.

O local de proliferação dos plasmócitos e o armazenamento das células B de memória é o baço (TIZARD, 2010).

FIGURA 2. Representação esquemática da imunidade inata e adquirida no intestino. APC: célula apresentadora de antígeno; CD4: linfócito TCD4; CD8: linfócito citotóxico; IFN γ : interferon gama; IgA/ IgM: imunoglobulina A e imunoglobulina M; IL2: interleucina 2; Mph: macrófago; Nk: células naturais killer; NO: óxido nítrico



Fonte: Jeurissen et al., 2002.

Em humanos e mamíferos, são relatadas cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgG, IgM, IgD, IgE (ABBAS, 2008).

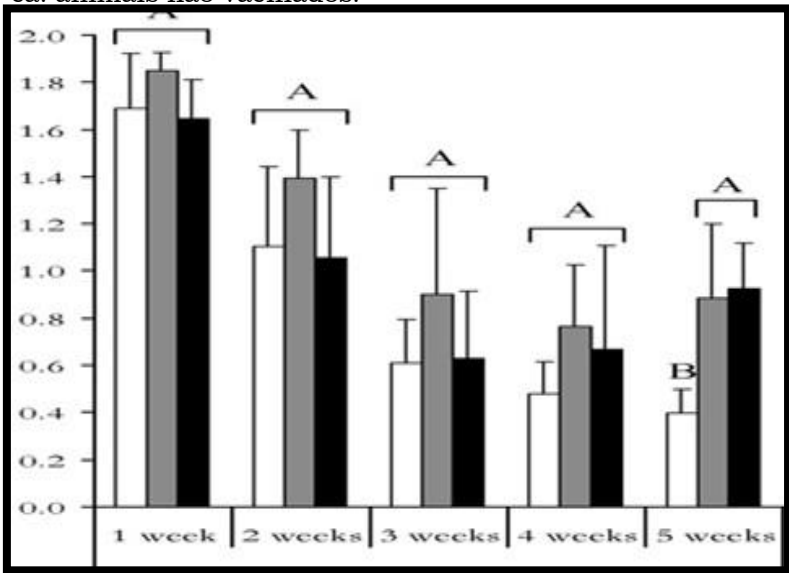
Em aves, existem três diferentes tipos de anticorpos ou imunoglobulinas: IgA, IgM e IgY. A imunoglobulina IgA é o principal anticorpo presente nas mucosas e IgY corresponde a 75% do total de imunoglobulinas no soro. A imunoglobulina Y (referente a “yolk”) corresponde a IgG de aves. São estruturalmente diferentes da IgG de mamíferos e evolucionariamente possuem características de IgG e IgE. A imunoglobulina IgM é funcionalmente e estruturalmente similar à de mamíferos (TIZARD, 2010).

Os anticorpos maternos podem ser transferidos da ave reprodutora através da gema para a corrente circulatória do embrião e possuem um papel importante na imunocompetência dos pintinhos a patógenos (CHALGHOUMI, et al, 2009). Esta transferência, ocorre por meio de receptores específicos presentes na superfície da membrana do saco embrionário e que permite um transporte seletivo das IgY presentes no sangue materno (CHALGHOUMI, et al, 2009).

Estes anticorpos em sua maioria IgY podem interferir com a imunidade de vacina vivas para a mesma cepa (LOPEZ, 2006).

RAUW e colaboradores (2009), verificaram a interferência da imunidade materna em poedeiras convencionais, previamente vacinadas para a doença de Newcastle na produção de IgG até a quarta semana de idade (Figura 3).

Figura 3 – Resposta de IgG – Imunidade humoral no duodeno, após vacinação em galinhas poedeiras White Leghorn, com duas cepas de vacinas vivas para newcaslte. As aves foram vacinadas com um dia de idade com CEVAC UNI (coluna cinza) e CEVAC VITAPEST (coluna preta). Coluna branca: animais não vacinados.



Tempo após a vacinação e título de IgG

Fonte: adaptado de Rauw et al., 2009.

II

Avaliação da resposta imune

A imunocompetência é a capacidade que o organismo possui em produzir uma resposta imune eficiente contra substâncias estranhas. A pesquisa laboratorial para avaliação da resposta imune pode ser utilizada para verificar a resposta inata e adquirida (humoral e celular).

Não há ensaios simples para avaliação da imunocompetência. As medidas para mensurar a imunidade que são comumente utilizadas são a resposta de anticorpos a antígenos estranhos, relação heterófilo: linfócito (H:L) e ensaios de blastogênese de linfócitos.

A imunidade humoral, pode ser mensurada pela detecção, quantificação e caracterização das variáveis (de anticorpos, antígenos ou citocinas) específicos no soro sanguíneo.

A utilização do soro para mensurar a interação antígeno-anticorpo é denominada sorologia (TIZARD, 2008). Como resultado, a evidenciação de anticorpos específicos nestes testes sorológicos

cos, caracteriza exposição atual ou anterior a antígenos específicos e que pode ser identificada pela diversidade funcional das classes de imunoglobulinas (IgA, IgM e IgY ou IgG) e a ordem que se apresentam nos fluidos biológicos.

A imunidade celular pode ser avaliada por meio de testes de cutâneos (como a utilização de fitohemaglutinina) *in vivo* ou pela capacidade do patógeno de estimular a proliferação dos linfócitos T *in vitro*.

A imunidade inata pode ser avaliada para verificar os fagócitos, seguido de análise de citometria de fluxo, utilizada para quantificar e detectar as características individuais de cada célula.

Observação importante deve ser feita em relação a utilização das linhagens genéticas utilizadas na pesquisa da resposta imune, pois as diferenças nas relações genéticas implicam em características de produção e resposta imunológica distintas (KOENEN, et al. 2002; CHUAMMITRI et al., 2011)

KOENEN et al, (2002) concluíram que em frangos de corte a resposta imune humoral apresenta maiores títulos de IgM, enquanto que em poedeiras, os títulos de IgG foram maiores. Além

disso, observaram que a resposta imune celular em poedeiras apresenta índices maiores e correlacionam que frangos mais pesados possuem títulos mais baixos quando comparados com frangos mais leves que apresentam títulos mais altos e mais duradouros de anticorpos contra os antígenos pesquisados.

Estes estudos corroboram com CUAMMITRI et al (2011), que avaliaram o efeito da suplementação da dieta sobre a resposta imune inata de três linhagens diferentes e encontrou diferenças na resposta dos heterófilos entre estas três linhagens. Neste estudo, foi utilizada a linhagem Fayoumi (nativa do Egito), que possui um conjunto de alelos que são ausentes na linhagem Leghorn e Lamont, pois não sofreu seleção genética comercial e que pode indicar melhor entendimento sobre a relação genética com a resposta imune.

III

Avaliação da resposta imune adaptativa

3.1. Dosagem das Imunoglobulinas séricas

Os anticorpos constituem-se em elementos essenciais para a proteção específica a patógenos. Como mencionado anteriormente, nas aves, três classes de imunoglobulinas podem ser avaliadas (IgA, IgM e IgG ou IgY).

Para esta avaliação, o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é o teste mais frequentemente utilizado para determinar anticorpos específicos no soro.

Os kits utilizados para a titulação de anticorpos são disponíveis comercialmente para inúmeras doenças virais e bacterianas das aves: vírus da encefalomielite aviária, influenza, leucose, reovírus, rinotraqueíte, vírus da anemia infecciosa das galinhas, bronquite, doença da bursa, laringotraqueíte, micoplasmoses, reticuloendoteliose (THAYER & BEARD, 2009) e também para sal-

moneloses (*S. enteritidis* and *Salmonella typhimurium*) (JEURISSEN et al., 2002)

O teste de ensaio imunoenzimático ou ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é uma técnica sorológica quantitativa que foi utilizada pela primeira vez em 1971, por Engvall & Perlmann e por Van Weeman & Schurs e desde então, tem sido considerada uma das mais importantes ferramentas para avaliar a resposta imune após programas de vacinação e como método diagnóstico para animais de produção (SANTOS e SILVA, 2000).

O princípio fundamental desta técnica é baseada na quantificação da reação antígeno-anticorpo por meio da avaliação da atividade enzimática da enzima peroxidase que catalisa a reação com o peróxido de hidrogênio e que utilizando um espectrofotômetro é possível detectar nas amostras de soro, os títulos de anticorpos com automação, rapidez e uniformidade de resultados (DI FÁBIO, 2001).

Neste método ocorre a imobilização de um dos agentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a esta enzima, resultando em um complexo com preservação da atividade imunológica do anticorpo e com atividade enzimática (SANCHEZ, 2001; PULICI, 2008).

HOLT e colaboradores (2005), utilizaram a técnica imunoenzimática para avaliação da imunidade humoral de mucosa e a pesquisa de anticorpos específicos IgA contra *Salmonella* Enteritidis no pulmão, por meio da técnica do lavado pulmonar.

RAUW e colaboradores (2009) avaliaram a imunidade humoral de mucosa, utilizando a técnica do lavado pulmonar, em aves livres de patógenos específicos (SPF) e encontraram títulos de anticorpos para IgA e IgM por meio da técnica de ELISA.

A resposta imune humoral também pode ser mensurada por um teste de ELISA específico para TNP-KLH (trinitrophenyl-conjugated keyhole limpet hemocyanin) como verificado por KOENEN e colaboradores (2002), comparando as diferenças imunológicas entre galinhas de postura e frangos de corte de mesma idade.

O TNP-KLH é um antígeno T-independente que, utilizado sem adjuvante, não tem interação com os anticorpos maternos, o que permite a comparação da resposta imune entre diferentes linhagens.

NORUP et al (2009), utilizaram a técnica de ELISA para avaliar a influência dos níveis de lec-

tina ligadora de manose na avaliação da resposta imune de frangos desafiados com *Escherichia coli*. Neste estudo, foram avaliados níveis de proteína ligadora de manose pelo método de ELISA sanduíche e um anticorpo anti-MBL de camundongo foi utilizado para a sua realização.

3.2. Inibição da Hemoaglutinação

A inibição da hemaglutinação (HI) é baseada na capacidade que certos antígenos virais e bacterianos têm de, espontaneamente, aglutinarem hemácias (SANCHEZ, 2001). Entre os microorganismos de aves que produzem o fenômeno de aglutinar eritrócitos pode-se citar o vírus da doença de Newcastle, Influenza, vírus da bronquite infecciosa e o adenovírus (THAYER e BEARD, 2009).

O teste de HI é uma ferramenta importante e que é amplamente utilizada para avaliar e mensurar a resposta dos anticorpos às vacinas ou às infecções que os animais possam ter sofrido (THAYER e BEARD, 2009).

Este é um dos testes mais utilizados no mundo, além de ser considerado teste “ouro” pelos órgãos internacionais.

Os soros utilizados para a realização desta técnica devem sofrer tratamento térmico para inativação das proteínas do sistema complemento (TIZARD, 2010).

Para que o teste de HI seja realizado, é necessário a preparação de uma etapa anterior para que se padronize a atividade hemaglutinante do agente para o número de unidades hemaglutinantes (UHA).

Para a realização desta metodologia o antígeno hemaglutinante e o soro diluído em séries decrescentes são componentes essenciais (THAYER e BEARD, 2009). O título final é expresso por meio da multiplicação do número de unidades hemaglutinantes utilizadas e a maior diluição do soro que inibe completamente a hemaglutinação seguido da transformação em log de base 2.

ZAKERI & KASHEFI (2011), utilizaram a metodologia de HI para mensurar os títulos de anticorpos para a doença de Newcastle em um estudo comparativo de cinco promotores de crescimento sobre a resposta humoral de frangos de corte.

A técnica é utilizada para a doença de Newcastle devido este vírus aglutinar eritrócitos de aves, incluindo as aves comerciais, permitindo a detecção destes títulos por meio desta técnica (CHARLTON et al, 2009).

TOGHYANI et al (2010), utilizaram o teste HI para mensurar os títulos contra a doença de Newcastle para avaliar diferentes níveis de semente preta (*Nigella sativa*) e menta (*Mentha piperita*) e concluíram que estes aditivos não induziram resposta significativa.

3.3. Soroaglutinação rápida

A reação de aglutinação faz parte de um processo qualitativo, baseado na ligação das moléculas de anticorpos a antígenos de superfície, estabelecendo interações que formam agregados insolúveis que são visíveis a olho nu e que se precipitam (Sanchez, 2001).

É um teste de triagem utilizado para verificar doenças em plantéis avícolas com elevada sensibilidade para detectar principalmente anticorpos IgM, que aparecem três a cinco dias após

a infecção e que podem persistir até 70 a 80 dias (CARDOSO, 2006).

O princípio fundamental desta técnica é baseada na concentração do antígeno e do anticorpo. A precipitação ocorre com o processo de equivalência, ou seja, quando a quantidade de antígenos e de anticorpos são equivalentes.

Os soros são testados em placas de vidro conjuntamente com antígenos comerciais. Nos soros reagentes, ocorre a formação de grumos azulados após 2 minutos de agitação da placa de vidro e estes são retestados na diluição 1:10. Se forem reagentes nesta diluição, são considerados positivos (CARDOSO, 2006).

3.4. Avaliação funcional das imunoglobulinas

Uma resposta adequada a antígenos vacinais nos leva a crer que a apresentação do antígeno a células imune-específicas, a interação entre os linfócitos T e B e a produção de anticorpos estejam funcionando sem anormalidades.

Esta avaliação consiste na pesquisa *in vivo*, da pesquisa da resposta humoral por meio do es-

tímulo da produção de anticorpos contra diferentes antígenos.

Alguns fatores precisam ser levados em consideração para verificação da resposta imune em galinhas imunizadas: a própria galinha (linha-gem, manejo, condições de estresse, nutrição), dose do antígeno (interfere diretamente na titulação de anticorpos), adjuvante utilizado (ROCHA, 2010) e a via de aplicação (intravenosa, ocular, intramuscular e subcutânea) (KOENEN et al., 2002; ROCHA, 2010)

A Organização Mundial da Saúde fornece alguns parâmetros para o processo de imunização das galinhas (ROCHA, 2010):

Tabela 1 – Recomendações para a imunização de galinhas.

		Dose, Volume e Intervalo de Imunização	Comentários
Antígeno		0,10-1,00mg	certas vezes apenas 10µg
Adjuvante		AIF	0,10-0,25ml
		Especol	0,5ml
		PCSL	250µg
		ACF	0,10-0,25ml
Injeção	Volume	0,5-1,0ml	
	Intervalo	4-8 semanas	
	Número	2 (mais se necessário)	
	Rota	i.m., s.c. ou i.v.	

AIF e ACF – Adjuvante Incompleto e Completo de Freund; PCSL – Pam3Cys-Ser-(Lys)4; i.m. – intramuscular; i.v. – intravenoso; s.c. – subcutâneo.

Fonte: Rocha, 2010.

3.5. Avaliação funcional utilizando vacina para a doença de Newcaslte e eritrócitos de carneiro

A avaliação funcional dos anticorpos das classes IgG pode ser realizada pela pesquisa de imunoglobulina do isotipo G específica a antígenos vacinais como vírus de Newcastle e que são amplamente utilizados em pesquisas científicas.

As respostas em nível imune humoral são normalmente avaliadas através de produção de anticorpos contra antígenos, que geralmente são eritrócitos de mamíferos (muitas vezes sheep red blood cells) ou vacinas inativadas, como vacinas inativadas para doença de Newcastle.

Desta maneira, os títulos de anticorpos para a doença de Newcastle pode ser utilizado como um indicador da imunidade humoral (MOLNÁR, 2011).

Após a vacinação, os resultados podem ser avaliados pelo teste de ELISA ou inibição da hemaglutinação.

MOLNÁR et al (2011), avaliando diferentes concentrações de *Bacillus subtilis* na resposta imune humoral de frangos de corte, observou au-

mento nos títulos de anticorpos por meio do teste HI, utilizando a vacina de Newcastle como indicador.

JAFARI et al (2008), mensuraram os títulos contra o vírus da doença de Newcaslte pelo método de ELISA e HI. Neste estudo foi avaliado o efeito da adição de alho na resposta imune de frangos de corte e concluiu-se que o título de anticorpos não foi influenciado pela inclusão de alho na dieta.

A utilização da vacina para a doença de Newcastle também foi utilizada por RICHEY & SCHMITTLE (1962) para avaliar o efeito da imunidade materna na resposta imune de pintinhos. Estes estudos demonstraram que os animais com imunidade materna alta são refratários a vacinação.

Outras vacinas podem ser utilizadas, como no caso do estudo realizado por NORUP et al. (2009), onde o teste de ELISA foi utilizado para verificar os títulos de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

Outro teste utilizado é a pesquisa de títulos de anticorpos contra eritrócitos de carneiro, que é denominado anti-SRBC (sheep red blood cells) (NUNES, 2007).

RAHIMI et al (2011), comparando a utilização de 3 extratos vegetais sob a resposta imune em frangos de corte, concluíram que o extrato de *Echinacea purpurea* apresentou níveis de anticorpos maiores na resposta contra eritrócitos de carneiros e títulos maiores para a doença de Newcastle (cepa LaSota).

3.6. Avaliação funcional utilizando separação das proteínas plasmáticas

As proteínas plasmáticas podem ser separadas pela técnica de eletroforese em duas frações principais: albumina e globulina (α , β e γ) presentes no soro e que se diferenciam por apresentarem maior tamanho e peso molecular (Fig. 5) (TIZARD, 2009; TRAESEL et al, 2011).

Estas proteínas plasmáticas são importantes nas funções fisiológicas (no transporte de minerais, hormônios e na manutenção da pressão coloidosmótica do sangue) além de desempenharem papel importante no sistema imunológico do organismo (LASSEN, 2007).

A relação entre as frações de proteínas plasmáticas indicam o estado de saúde das aves,

pois a fração γ das globulinas, produzidas por linfócitos, é formada pelos diversos tipos de imunoglobulinas, principalmente IgG que representa 80% das gamaglobulinas.

O perfil eletroforético não indica informações específicas, como demonstrado para o teste de ELISA, mas fornece alterações referentes aos valores normais, o que se torna útil para utilização no diagnóstico (KANEKO, 1997).

A concentração da proteína sérica total (ou plasmática) nas aves varia entre 3,0 e 6,0g/dL (CAMPBELL & DEIN, 1984).

Geralmente, índices abaixo de 3,0g/dL significam hipoalbuminemia, porque a albumina é a maior fração protéica individual do plasma (CAMPBELL & COLES, 1986).

Os valores acima de 6,0g/dL ocorrem devido ao aumento das globulinas totais ou nos quadros de desidratação e a hiperglobulinemia pode estar associada a doenças, tais como: tuberculose, aspergilose, clamidiose, septicemias bacterianas ou infecção bacteriana crônica (CAMPBELL & COLES, 1986).

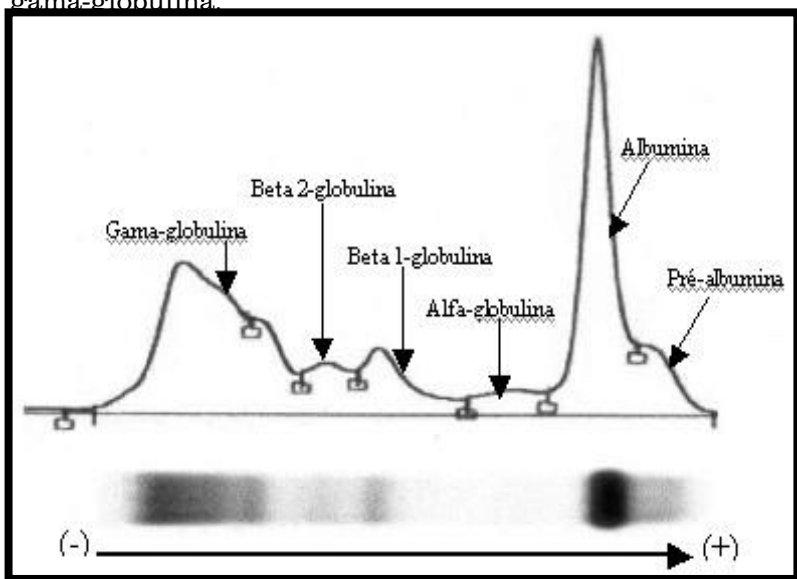
TRAESEL et al (2011), utilizaram a técnica do perfil eletroforético de soroproteínas para estimar a suplementação dietética com três doses de

uma mistura de óleos essenciais (orégano, sálvia, alecrim e extrato de pimenta) e promotor de crescimento antibiótico sobre a função imunológica em frangos de corte.

Estes autores concluíram que houve uma diminuição da fração β -globulina no estudo nos grupos tratados com promotor de crescimento antibiótico e no grupo que recebeu a maior dose de óleos (150 mg/ kg), que pode estar ligada a diminuição na concentração de Ig no soro dos frangos, sugerindo um menor estímulo no sistema imune humoral de frangos de corte.

Concentrações menores de betaglobulinas ou gamaglobulinas na ausência de hipoalbuminemia podem indicar menor concentração de imunoglobulinas e isso pode ser devido as moléculas de Ig de aves (IgA e IgM) migrarem da fração γ -globulina para a β -globulina durante o processo de eletroforese (LASSEN, 2007).

FIGURA 4 – Perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas da linhagem Avian farm: pré-albumina, albumina, alfa-globulina, bet1-globulina, beta2-globulina e gama-globulina.



Fonte: Hosegawa et al., 2002.

3.7. Avaliação das subpopulações de linfócitos T

A investigação da função de linfócitos T, é importante, pois estas células têm influência em ambas as imunidades adaptativas: celular e humoral.

Estas técnicas compreendem ensaios *in vivo* (como a reação de hipersensibilidade cutânea) e ensaios *in vitro* (proliferação de linfócitos, avaliação do complexo de histocompatibilidade e produção de citocinas) (JEURISSEN, et al., 2002).

Após a ativação com antígenos (vírus, bactérias, parasitas, antígenos de proteínas), os linfócitos secretam citocinas (IL1, IL2 IF γ) que podem ser mensuradas avaliando-se o sobrenadante (JEURISSEN et al., 2002) ou podem ser verificadas as proporções de linfócitos T CD4 e T CD8 (BEIRAO, 2011).

A citometria de fluxo é uma técnica que permite avaliar o fenótipo celular individualmente sobre uma determinada população. Além disso, é possível diferenciar a granulocidade e o tamanho dos diferentes tipos celulares (Fig. 6) (MACEY, 2007). Essa técnica utiliza a marcação de moléculas com anticorpos fluorescentes que podem ser ativados por meio da ativação pelo laser (MACEY, 2007).

A estrutura do citômetro compreende: um sistema que capta a imagem ótica (gerada pelo laser sobre a célula); um sistema fluido, que permite a passagem das células individualmente e um

sistema eletrônico (coletor de dados) (MACEY, 2007).

Quando a célula atravessa o laser, a fluorescência pode ser captada pelo sistema óptico e ser armazenada no coletor de dados. Dessa forma, cada célula pode ser caracterizada e uma população homogênea que pode ser identificada dentro de uma população heterogênea maior (BEIRAO, 2011).

A avaliação da imunocompetência em aves utilizando a citometria de fluxo é considerada um método superior a outras metodologias utilizadas (BRIDLE et al., 2006).

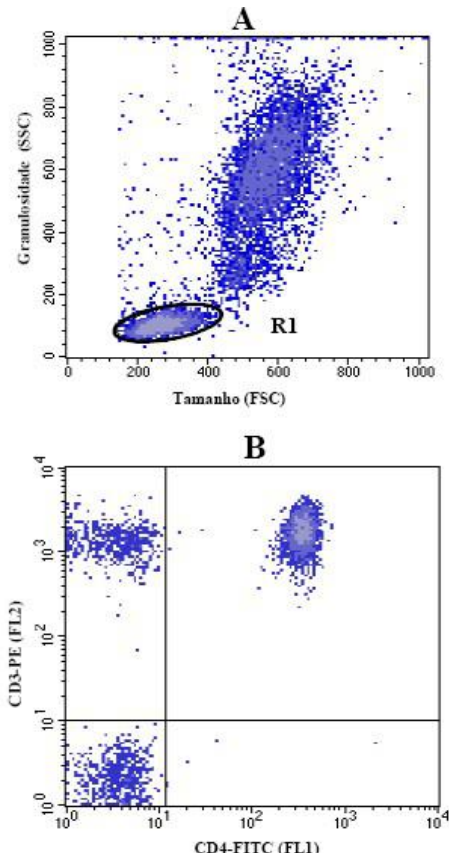
Sabe-se, que a proporção CD4:CD8 é reduzida em aves comerciais, o que indica menor imunocompetência, como aumento na suscetibilidade a doenças (BRIDLE et al., 2006).

A citometria de fluxo é utilizada para avaliar a situação do sistema imune, o efeito de patógenos sobre a imunidade, além da capacidade de resposta dos animais aos estímulos antigênicos (BEIRAO, 2011).

Como exemplo, esta técnica pode ser empregada na investigação das subpopulações de linfócitos de aves alimentadas com micotoxinas, pesquisa destas subpopulações nas diferentes li-

nhagens de aves e resposta contra patógenos específicos (BEIRAO, 2011).

Figura 5 – Gráficos de citometria de fluxo – (A) Seleção da população linfocitária – R1; (B) Avaliação de parâmetros de interesse em populações ou subpopulações celulares específicas.



Fonte: adaptado de Soares et al, 2006.

3.8 Resposta de hipersensibilidade interdigital a fitohemaglutinina – PHA

Os linfócitos, são as principais células responsáveis pela resposta imunológica celular da imunidade adaptativa e para sua ativação é necessário a interação de receptores presentes na superfície celular (TCRs) com um agente estimulante (MACHADO JUNIOR, et al 2006).

Esta metodologia caracteriza um teste de hipersensibilidade cutânea, no qual a imunidade mediada por células pode ser avaliada *in vivo*.

Nesta avaliação, é utilizado um ativador policlonal que ativam as células T para promover uma resposta detectável de populações de células T (ABBAS, 2008).

A técnica envolve a demonstração de receptores celulares dos linfócitos T serem capazes de se ligarem a proteínas estranhas, como a fitohemaglutinina (PHA), da família das lectinas, derivada da planta *Phaseolus vulgaris* (feijão-vermelho) com atividade mitogênica para os linfócitos, predominantemente os linfócitos T (GONZALEZ, 1989).

A PHA estimula a ativação policlonal de linfócitos T (proliferação celular) quando ligam-se as glicoproteínas de membrana destas células. Outro exemplo de mitógeno é a concavalina A (ABBAS, 2008).

Na avaliação *in vivo*, inocula-se no espaço interdigital entre o terceiro e o quarto dedo, uma solução de fitohemaglutinina – PHA- M®.

Os resultados são interpretados com um paquímetro e medição da reação-resposta da espessura da pele após a inoculação menos a espessura da pele no tempo zero.

FERREIRA e colaboradores (2009), utilizando progênie de matrizes com duas idades diferentes (28 e 57 semanas), avaliaram a adição de níveis crescentes de parede de levedura à dieta: uma a base de milho e outra a base de sorgo e concluíram que a resposta celular interdigital cutânea não foi influenciada pelos níveis adicionados à dieta, mas foi influenciada pela idade da matriz de 57 semanas.

RAHIMI et al (2011), encontraram resultados significativos para este teste avaliando extrato de *Echinacea purpurea*.

IV

Avaliação da imunidade inata

4.1. Avaliação de fagócitos

A fagocitose induz a um metabolismo oxidativo conhecido como explosão respiratória e que resulta na produção de uma série de substâncias como peróxido de hidrogênio e radicais de hidrogênio que resultam na morte do microrganismo.

A principal função dos heterófilos é a fagocitose e o estudo do aumento da relação heterófilo: linfócito tem sido correlacionado com o estresse crônico em frangos sendo um parâmetro mais seguro do que a avaliação do cortisol no plasma.

Dentre as técnicas utilizadas para avaliação dos fagócitos destaca-se a relação heterófilo: linfócito. Heterófilos são células homólogas aos neutrófilos de mamíferos. Estas células possuem um ciclo de vida curto e agem como células efetoras contra muitos tipos de bactérias e fungos. Após a opsonização do antígeno, pelos anticorpos ou

proteínas do sistema complemento, uma quantidade considerável de fagócitos é recrutada ao local da inflamação para que ocorra a fagocitose.

Animais sob condições estressantes, como quando submetidos a temperaturas elevadas intermitentes, apresentam modificações metabólicas que podem alterar a resposta imune aos padrões hematológicos, como o aumento da quantidade de heterófilos na circulação (LAGANÁ, 2007).

Em condições normais, a relação percentual entre a fração normal de leucócitos no sangue de frangos variam de 2.000 a 3.000 células/ μ L; dentro dos quais 60 a 65 % do total de leucócitos, são linfócitos, 25 a 30% são heterófilos, 2% são eosinófilos e 1,7% são basófilos e 10% são basófilos. Porém isso pode ser variável em função do sexo, idade, condições de doenças e estresse (LAGANÁ, 2007).

O parâmetro para avaliação da relação H: L no sangue periférico foi utilizado inicialmente para verificar a utilização de hormônios do estresse na pesquisa científica (BEIRAO, 2011).

Esta relação baseia-se nas alterações ocorridas no sistema sanguíneo a agentes estressores como mudança de temperatura e consequente au-

mento do número de heterófilos e queda dos linfócitos (BORGES, 2003)

A razão entre heterófilos e linfócitos indica estresse crônico, embora este não seja um parâmetro de alta sensibilidade (BEIRAO, 2011).

A atividade dos macrófagos pode ser avaliada por testes funcionais que mensuram a atividade fagocítica *in vitro* e a produção de água oxigenada pelos macrófagos durante o processo de explosão respiratória (NUNES, et al, 2008).

NUNES e colaboradores (2008), avaliando a imunidade inata em frangos de corte suplementados com prebiótico e probiótico utilizaram injeção intraperitoneal de Sephadex® 3% para ativação dos macrófagos intraperitoneais e o método de oxidação do vermelho de fenol pela água oxigenada (H_2O_2) produzida pelos macrófagos, na presença e ausência de phorbol myristate acetate (PMA- que é um potencializador da produção de H_2O_2).

Estes pesquisadores não encontraram resposta significativa para a produção de H_2O_2 pelos macrófagos ativados com Sephadex, para este prebiótico e probiótico.

4.2. Peso dos órgãos linfóides

O peso de órgãos linfóides reflete a capacidade do organismo de produzir células linfóides durante uma resposta imune.

Dos órgãos que são avaliados nesta análise, a bursa de Fabrício e o timo são de fundamental importância para as aves, pois em seus compartimentos ocorre o processo de maturação dos linfócitos B e T, respectivamente.

O aumento no peso destes órgãos, indica resposta ao estímulo antigênico (VOGT, 2005).

O baço, considerado um órgão linfóide secundário (ABBAS, 2008) é importante, mas alterações no peso deste órgão podem não ser muito indicativas do sistema imune quanto a bursa (VOGT, 2005).

Nesta metodologia, o peso do órgão é dividido pelo peso corporal da ave (peso relativo). Assim como a relação heterófilo: linfócito, essa avaliação é utilizada para casos de estresse nas aves, sendo considerada como indicador sensível.

A liberação de corticosterona pode ocasionar a involução do tecido linfóide e consequentemente, suprimir a resposta imune humoral e celular (ROSALES, et al.; 1989).

RAHIMI et al (2011), avaliaram a ação de três extratos sobre a resposta imune em frangos de corte encontram um peso relativo da bursa superior para o extrato de alho, enquanto não obteve o mesmo resultado para o peso do baço.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da imunidade é uma ferramenta importante na produção avícola que permite a compreensão do sistema imune das aves e o norteamento sobre o controle de suas aplicações na abordagem da pesquisa científica, avaliação terapêutica, avaliação do estresse, nutrição e monitoramento sorológico em granjas avícolas e programas de vacinação.

A escolha da metodologia depende dos elementos analisados e dos recursos disponíveis para tal finalidade.

Para uma interpretação cuidadosa dos resultados devem ser considerados alguns fatores como as particularidades do sistema imune intraespécies, que são explicadas por diversas razões: diferenças anatômicas (bolsa de Fabrício, timo), fisiológicas e pelas variações genéticas quando comparadas aos mamíferos.

A determinação de imunoglobulinas séricas (IgY, IgM, IgA) constituem o primeiro passo na avaliação da imunidade humoral e permite o diagnóstico de deficiências quantitativas de anticorpos, que fornecem informações úteis para verificar a resposta imunológica a antígenos.

As técnicas de imunoenensaio, podem ser utilizadas com uma variedade de compostos naturais ou artificiais, além de fungos, bactérias, vírus e biomoléculas (como as citocinas). Desta maneira, a avaliação da imunidade humoral pela técnica de ELISA, é amplamente utilizada em pesquisas, uma vez que praticamente todos os componentes usados nestes métodos podem ser interligados.

O método mais barato, e ao mesmo tempo eficiente, para se avaliar a resposta imune celular, é a realização de testes cutâneos de hipersensibilidade tardia com o maior número possível de antígenos.

Os distúrbios de fagócitos podem ser inicialmente avaliados através da ativação de macrófagos, da relação heterófilo: linfócito e peso dos órgãos linfóides que normalmente são utilizadas para analisar o estresse e bem-estar em aves de produção, mas também podem ser utilizadas para avaliar micotoxinas ou seus adsorventes na dieta das aves.

Estes índices hematológicos acima citados, somados a informações de peso das aves, possibilitam a identificação precoce de alterações fisiológicas, causadas por diversos fatores de estresse, possibilitando a execução de medidas preventivas

de impactos que seriam posteriormente ainda mais prejudiciais.

Desta forma, a avaliação da competência imunológica por estas metodologias contribui para a orientação da melhoria da sanidade do plantel e evitam prejuízos decorrentes da resposta imune deficiente.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.

AKTER, S. H.; KHAN, M. Z. I.; JAHAN, M. R.; KARIM, M. R. ISLAM, M. R. Histomorphological study of the lymphoid tissues of broiler chickens. **Bang. Journal Veterinary Medicine**. [online], v. 4, n. 2, p. 87-92, 2006. Disponível em: <<http://www.google.com.br/url?sa=t&source=web&cd=10&sqi=2&ved=0CHOQF-jAJ&url=http%3A%2F%2Fwww.banglajol.info%2Findex.php%2FBJVM%2Farticle%2Fdownload%2F1289%2F1283&rct=j&q=structure%20limphoid%20system%20chicken%20pdf&ei=9id5TsOCO8X-UgQf6g72sAQ&usg=AFQjCNHnQXYQgU93n-q5zgTVPnXF7m6Ui9g>> Acesso em: 20 set. 2011.

BEIRAO, B. C. B. **Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo**. 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BORGES, S. A.; MAIORKA, A.; SILVA, A. V. F. da. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de

eletrólitos em frangos de corte, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 975 – 981, 2003.

BRIDLE, B. W.; JULIAN, R.; SHEWEN, P. E.; VAILLANCOURT, J. P.; KAUSHIK, A. K. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, n.3, p.183-190, 2006.

BROWNLIE, R.; ALLAN, B. Avian toll-like receptors review. **Cell tissue research**, Cidade, v. 343, n. 7, p. 121-130, 2011.

CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J., **Avian hematology**. The basics, Veterinary clinics of north american: small animal practice, Pennsylvania, v. 14, n. 2, p. 223-48, 1984.

CAMPBELL, T. W.; COLES, E. H., **Avian clinical pathology**. In: COLES, E. H., Veterinary clinical pathology. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.279-301.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z. Monitoria sorológica da micoplasmose em plantéis de aves reprodutoras no Brasil através do teste de soroaglutinação rápida. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 23-26, 2006.

CHARLTON, B. R.; BERMUDEZ, A. J.; BOULIANNE, M.; HALVORSON, D. A.; SCRADER, J.

S.; NEWMAN, L.J.; SANDER, J. E.; WAKENELL, P.S. **Avian disease manual**. 6 ed. Georgia: American association of avian pathologists, 2009. 235 p.

CHAULGHOUMI, R.; BECKERS, Y.; PORTETELLE, D.; THÉWIS, D. P. A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, Bélgica, v. 13, n. 2, p. 295-308, 2009.

CHUAMMITRI, P.; REDMOND, S. B.; KIMURA, K.; ANDREASEN, C. B., LAMONT, S.; PALIC, D. J. Heterophil functional responses to dietary immunomodulators vary in genetically distinct chicken lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Bélgica, v. 142, n. 2, p. 219-227, 2011.

DAVISON, F. The importance of the avian immune system and its unique features. In: _____ **Avian Immunology**. 1. Ed. San Diego: Elsevier, 2008. cap.1, p. 1-11.

DI FABIO, J. Gumboro: Vacinação no incubatório. In: _____ CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS. Campi-

nas, SP, 2001. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001.v. 2, p. 195-205.

FERREIRA, S. R.; MURAKAMI, A. E.; SIQUEIRA, T. G. V.; SANTOS, J. M. G.; POTENÇA, A.; SANTOS, T. C. Níveis crescentes de parede de levedura sobre a resposta imune celular e perfil hematológico de frangos de corte. **Pesquisa veterinária brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 9, p. 725-730, 2009.

HOLT, P. S.; STONE, H. D.; MOORE, R. W.; GAST, R. K.; Development of a lavage procedure to collect lung secretions from chickens for evaluating respiratory humoral immunity. **Avian Pathology**, Athens, v. 34, n. 5, p. 396-398, 2005.

HOSEGAWA, M. Y.; FONTEQUE, J. H.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L.P. Avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Avian Farm. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.4, n.3, p.203-207, 2002.

JAFARI, R. A.; JALALI, M. R.; GHORBANPOOR, M.; SARAIEI, S. M. R. M. Effect of dietary garlic immune response of broiler chicks to live newcastle disease vaccine. In **Pakistan Journal of biological sciences**, v. 14, n.11, p.1848-1851, 2008.

JEURISSEN, S. H. M.; LEWIS, F.; VAN DER KLIS, J. D.; MROZ, Z.; REBEL, J. M. J.; HUURNE, A. A. H. M. Parameters and techniques health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Curr. Issues Intestinal Microbiology**, Netherlands, v. 3, n. X, p.1-14, 2002.

JUUL-MADSEN, H. R.; VIERTLBOECK, B.; SMITH, A. L.; GÖBEL, T. W. F. Avian innate immune responses. In: _____ **Avian Immunology**. 1. Ed. San Diego: Elsevier, 2008. cap.7, p. 129-158.

KAISER, P. Advances in avian immunology - prospects for disease control: a review. **Avian pathology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 309-324, 2010.

KANEKO J. J.; HARVEY J. W.; BRUSS M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, San Diego: Academic Press, p.117-138, 1997.

KLASING, K.; KOVER, D. Leukocytic Cytokines Regulate Growth Rate and Composition Following Activation of the Immune System. **Journal Animal Science** [online], v. 75, n. 2, p. 58-67, 1997. Disponível em: <http://jas.fass.org/content/75/Supplement_2/58.short.> Acesso em: 12 set. 2011.

KOENEN, M. E.; BOONSTRA-BLOM, A. G.; JEURISSEN, S. H. M. Immunological differences between layer and broiler type chickens. **Veteri-**

nary immunology and immunopathology, Amsterdam, v. 89, n. 5, p. 47-56, 2002.

LAGANÁ, C.; RIBEIRO, A. M. L.; GONZÁLEZ, F. H. D.; LACERDA, L. A.; KRATZ, L. R. BARBOSA, P. R. Níveis dietéticos de proteína e gordura e parâmetros bioquímicos, hematológicos e empenamento em frangos de corte estressados pelo calor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 1783-1790, 2007.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: _____ **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 376-390.

LOPEZ, R. C. **The effect of environmental stressors on the immune response to avian infectious bronchitis virus**. 2006. 161 f. Tese (Doutorado em Doctor of Philosophy) – Universidade de Lincoln, Nova Zelândia.

MACEY, M. G. Principles of flow cytometry. In: _____ **Flow cytometry: Principles and applications**. 1. Ed. New Jersey: Humana Press Inc, 2007. cap.1, p. 1-16.

MACHADO JUNIOR, J. C.; FLORAO, A.; MATTANA, F. V. R.; ROCHA, F. H.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imu-

nomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Revista brasileira de farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 645-655, 2006.

MOLNÁR, A. K.; PODMANICZKY, B.; KÜRTI, P.; GLÁVITS, R.; VIRÁG, G.; SZABÓ, Z.; FARKAS, Z. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on immune response of broiler chickens. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, v. 3, n. 1, p. 8-14, 2011.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: _____ **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. Ed. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. p. 231-245.

NORUP, L. R.; DALGAARD, T. S.; FRIGGENS, N. C.; SORENSEN, P.; JUUL-MADSEN, H. R. Influence of chicken serum mannose-binding lectin levels on the immune response towards *Escherichia coli*. **Poultry science**, v. 88, n.11, p.543-553. 2009

NUNES, A.D.; ALBUQUERQUE, R. de; HUEZA, I.M.; RASPANTINI, L. E. R.; PACHECO, B.H.C. Imunidade inata e humoral de frangos de corte suplementados com prebiótico e probiótico. In: _____ **Revista Brasileira de Ciência Avícola- Brazilian Journal of Poultry Science**. 1. Santos, São Paulo, 2007, p. 115.

OLÁH, I. VERVELDE, L. Structure of the avian lymphoid system. . In: _____ **Avian Immunology**. 1. Ed. San Diego: Elsevier, 2008. cap.2, p. 13-50.

PULICI, R. P. **Avaliação da resposta do uso da exclusão competitiva (CE) em desempenho e imunidade em frangos de corte**. [online]. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal)- Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-08092008-151726/pt-br.php>> Acesso em: 20 set. 2011.

RAHIMI, S.; ZADEH, Z. T.; TORSHIZI, M. A. K.; OMIDBAIGI, R.; ROKNI, H. Effect of the Three Herbal Extracts on Growth Performance, Immune System, Blood Factors and Intestinal Selected Bacterial Population in Broiler Chickens. **Journal of agricultural science and technology**, v.13, n. 4, p.527-539. 2011.

RAUW, F.; GARDIN, Y.; PALYA, V.; VAM BORM, S.; GONZE, M.; LEMAIRE, VAM DEN BERG, T.; LAMBRECHT, B. Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. **Vaccine**, Estados Unidos, v. 27, n. 27, p. 3631-3642, 2009.

RICHEY, D. J.; SCHMITTLE, S. C. The effect of congenital passive immunity levels on the response of chicks to Newcastle disease vaccination. **The Journal of immunology**, v.89, n.3, p. 344-347, 1962.

ROCHA, D. G. **Isolamento Transcriptômico das sequências variáveis de IgY de galinhas poedeiras (*Gallus gallus*) antivenenos de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus***. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.

ROSALES, A. G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P. D.; MOHAMED, A. M.; BROWN, J. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious Bursal Virus. **Avian Dis., Athens**, v.33, n.1, p.35-41, 1989.

SANCHES, M. C. Testes sorológicos. In: _____ **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2001. p. 9-18.

SANTOS, C. H. C.; SILVA, E. N. Métodos de diagnósticos laboratoriais, microbiológicos e sorológicos. In: _____ **Doenças das aves**. 1. Ed. Campinas: Facta, 2000. p. 173-182.

SCHUTZ, K.; KERJE, S.; CARLBORG, O.; JACOBSSON, L.; ANDERSSON, L.; JENSEN, P. QTL analysis of a red junglefowl x White Leghorn intercross reveals trade-off in resource allocation between behavior and production traits. **Behaviour Genetics**, v.32, n.6, p.423-433, 2002.

SILVA, I. C. M. **Resposta imune e desempenho de frangos de corte submetidos a variações dietéticas de vitamina E e selênio**. 2009. 176 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SINER, J. M. **Sepsis: definitions, epidemiology, etiology and pathogenesis**. Yale University School of Medicine. [online], 2009. Disponível em:

<[http://www.chestnet.org/accp/pccsu/sepsis-definitions-epidemiology-etiology-and-pathogenesis?page=0.3http://www.google.com.br/url?sa=t&source=web&cd=10&sqi=2&ved=0CHOQF-jAJ&url=http%3A%2F%2Fwww.banglajol.info%2Findex.php%2FBJVM%2Farticle%2Fdownload%2F1289%2F1283&rct=j&q=structure lymphoid system chicken pdf&ei=9id5TsOCO8XUgQf6g72sAQ&usq=AFQjC-NHnQXYQgU93nq5zgTVPnXF7m6Ui9g](http://www.chestnet.org/accp/pccsu/sepsis-definitions-epidemiology-etiology-and-pathogenesis?page=0.3http://www.google.com.br/url?sa=t&source=web&cd=10&sqi=2&ved=0CHOQF-jAJ&url=http%3A%2F%2Fwww.banglajol.info%2Findex.php%2FBJVM%2Farticle%2Fdownload%2F1289%2F1283&rct=j&q=structure+lymphoid+system+chicken+pdf&ei=9id5TsOCO8XUgQf6g72sAQ&usq=AFQjC-NHnQXYQgU93nq5zgTVPnXF7m6Ui9g)> Acesso em: 21 set. 2011.

SOARES, E. B. **Aspectos fenóticos celulares da imunidade inata e adaptativa em portadores de hepatite C crônica com e sem insuficiência renal crônica.** 2006. 199 f. Tese (Doutorado em Gastroenterologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

THAYER, S. G.; BEARD, C. W. Serologic Procedures. In: _____ **A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens.** 5. Ed. Georgia: American Association of Avian Pathology, 2009. p. 222-229.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária,** New York, v. 199, n. 1, p. 19-48, 2010.

TRAESEL, C. K.; LOPES, S. T. A.; WOLKMER, P.; SCHIMIDT, C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos e promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência rural,** v. 41, n.2, p.278-284. 2011

TOGHYANI, M.; TOGHYANI, M.; GHEISARI, A.; GHALAMKARI, G.; MOHAMMADREZAEI, M. Growth performance, serum biochemistry and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (*Nigella sativa*) and peppermint (*Mentha piperita*). **Livestock science.** v.129, n.1, p. 173-178, 2010.

VOGT, L. K. **Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte**. 2005. 160 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ZAKERI, A.; KASHEFI, P. The comparative effects of five growth promoters on broiler chickens humoral immunity and performance. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 10, n. 9, p.1097-1101. 2011

Esperamos que esse livro contribua para o debate político e filosófico sobre a educação. Afirmamos que caso seja infringido qualquer direito autoral, imediatamente, retiraremos a obra da internet. Reafirmamos que é vedada a comercialização deste produto.

Título	Metodologias para avaliação da imunidade em aves de produção
Autores	Micaela G. Takeuchi & Marcos B. Café
Revisão	Lurdes Lucena
Páginas	66
1ª Edição	Outubro de 2016

Navegando Publicações



NAVEGANDO

www.editoranavegando.com

editoranavegando@gmail.com

Uberlândia – MG

Brasil

