

La inmunidad celular en aves domésticas durante la infección con Eimeria spp.

Fuente www.cuencarural.com

La coccidiosis aviar es causada por un protozooario intracelular que incluye diferentes especies del género Eimeria. La coccidiosis llega a afectar seriamente los parámetros productivos de una parvada, ya que causa retraso en el crecimiento, baja conversión alimenticia y un pobre rendimiento a la finalización, con pérdidas económicas graves. La coccidiosis aviar es causada por un protozooario intracelular que incluye diferentes especies del género Eimeria.

La coccidiosis llega a afectar seriamente los parámetros productivos de una parvada, ya que causa retraso en el crecimiento, baja conversión alimenticia y un pobre rendimiento a la finalización, con pérdidas económicas graves.

Actualmente debido al límite de utilización de las drogas anticoccidiales, se ha propuesto la aplicación de vacunas con coccidias de periodo de prepatencia precoz, sensibles a todas las drogas anticoccidianas, vacunas atenuadas y vacunas seleccionadas por ser benignas e inmunogénicas. Se ha estudiado también el desarrollo de vacunas obtenidas a través de ingeniería genética.

Sin embargo, antes de entrar a campos de la genómica y proteómica de estos protozoarios y sus inmunógenos, se debería estar consciente en este campo que en realidad se conoce poco aún acerca de los mecanismos patogénicos del parásito en la infección y de los mecanismos inmunológicos que utilizan las aves para protegerse de las coccidias. Esta situación ha conducido en los últimos años al estudio inmunológico de esta relación.

Las respuestas inmunológicas a este tipo de parásito son complejas e involucran los dos tipos de inmunidad específica: la humoral y la celular. Se han hecho estudios con aves bursaectomizadas que muestran desarrollo inmune de resistencia normal a las coccidias, lo que no sucede en aves timoectomizadas en las que se observan lesiones severas, lo que indica un papel de mayor importancia para las células T, sin que las células B pierdan su valor, este sea minorizado sin mucho fundamento científico aún. In vitro se ha observado que la proliferación de linfocitos T se ve aumentada en respuesta a la infección con diferentes antígenos coccidianos: Eimeria tenella, Eimeria acervulina y Eimeria maxima, dando una idea acerca de la importancia de la protección conferida por estas células contra las coccidias. Aunque actualmente se desconocen los mecanismos inmunológicos exactos involucrados en la protección contra la coccidiosis, algunos estudios recientes sobre la respuesta inmune del huésped contra las coccidias revelan que la respuesta mediada por células juega un papel muy importante, sugiriendo un papel de tipo efector directo en esta respuesta por parte de las células T con «Cluster of differentiation CD 8+».

El tejido primario para la invasión de la coccidia es el epitelio intestinal, luego entonces es crucial el conocimiento de la interacción entre células T y coccidias a nivel intestinal, donde las células T se encuentran eliminando continuamente al parásito, por lo cual siempre se debe considerar esta relación para cuando se desea efectuar el diseño de una vacuna que sea efectiva.

Sin embargo, existe muy poca información disponible relacionada con el sistema inmune intestinal de las aves (en contraste a lo que ya se sabe del sistema inmune de los mamíferos). El tejido linfóide asociado al intestino de los pollos (GALT) que incluye células inmunoregulatorias y efectoras, ha mostrado ser en diversas situaciones experimentales la primera línea de defensa a nivel de superficie de mucosa intestinal.

El aumentar nuestros conocimientos sobre los mecanismos del sistema inmune intestinal del ave contra la infección por coccidias, contribuirá en el futuro a diseñar nuevos esquemas de vacunación contra la coccidiosis que sean realmente efectivos y no manifiesten los efectos detrimentales que se han observado en ocasiones principalmente sobre parámetros productivos y pigmentación.

La inmunidad celular durante un brote de coccidiosis aviar.

En las aves, como en los mamíferos, las células T comprenden dos tipos celulares distintos que varían en sus funciones: células cooperadoras (T CD4+) y células efectoras (T CD8+), las primeras auxilian en la síntesis de anticuerpos y reacciones de hipersensibilidad, mientras que las segundas regulan los efectos citotóxicos. Estas células efectoras reconocen antígenos extraños unidos a moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), mientras las células cooperadoras reconocen antígenos extraños en asociación con moléculas clase II del MHC. La identificación de antígenos de superficie ha hecho posible la distinción entre linfocitos cooperadores con marcador CD4+ y efectores con marcador CD8+ utilizando para ello anticuerpos monoclonales, sin embargo estos antígenos no son indicadores absolutos de una sola función.

La importancia de los linfocitos T (LT) en la respuesta inmune a las coccidias está bien documentada, por ejemplo en ratones se ha determinado que la inmunidad conferida por células esplénicas y de nódulos linfáticos provenientes de ratones inmunes a *Eimeria falciformis* puede ser transferida a ratones no inmunes que resisten adecuadamente a un desafío. En un ensayo in vivo se ha observado que una depleción parcial de LT inducida por un anticuerpo monoclonal contra el antígeno Thy 1.2 produce un abatimiento casi total de la inmunidad protectora contra *E. falciformis* alargando el periodo de patencia.

Se ha observado además que la reacción a una infección primaria por coccidias en animales atímicos es más severa que en animales normales, además de no generar una resistencia específica de tipo inmune ante la reinfección por la misma coccidia. Los resultados de otros estudios indican que la depleción de LT CD4+, in vivo, incrementa la severidad de una infección primaria por *E. vermiformis*, pero no tiene efecto cuando la inmunidad ya se encuentra establecida.

Sin embargo, en ensayos in vitro cuando se indujo la depleción de LT CD4+ pero no la de LT CD8+, los cuales provenían de ratones inmunes, se observó que se impedía la transferencia de inmunidad a ratones receptores no inmunes, sugiriendo un papel muy importante por parte de los LT CD4+ cooperadores en la inducción de resistencia a las infecciones por *E. vermiformis*.

En las aves se ha observado que las células esplénicas y linfocitos sanguíneos de aves inmunes son capaces de transferir resistencia a aves no inmunes. Se ha descubierto que

una de las linfocinas de mayor involucramiento en esta actividad es el interferón gamma, el cual en diversos ensayos de evaluación, se ha determinado que las cantidades liberadas por linfocitos esplénicos muestran un patrón de comportamiento muy diferente a lo largo del periodo de prepatencia después de un desafío con *E. tenella* durante la respuesta primaria que a lo largo de una secundaria, mostrando que esta citocina tiene un papel de primer orden en las infecciones por coccidia (Juárez et al, 1999). El rol de los LT en la resistencia a la coccidiosis ha sido investigado con agentes que suprimen las respuestas inmunes mediadas por células, como la ciclosporina A (Cs-A), betamethasona y la dexamethasona.

Cuando la Cs-A fue proporcionada junto con los ooquistes, la infección se vio reducida, posiblemente por su efecto sobre los ooquistes, sin embargo, cuando fue proporcionada antes del desafío con los ooquistes, la susceptibilidad a la infección se vio aumentada y cuando se dio antes de un desafío secundario la inmunidad protectora se vio abatida.

Además cuando se proporcionó (Cs-A) a aves domésticas (gallinas) antes de ser infectadas con tres diferentes especies de *Eimeria* provenientes de pavo permitió que estas completarán su ciclo de vida en ellas, indicando que los LT también se hallan involucrados en la resistencia natural a especies que infectan a otros huéspedes diferentes.

Los resultados para las otras dos drogas fueron similares, además de que las respuestas de IgG e IgA específicos a la *Eimeria* utilizada en el desafío se vieron aumentadas. Estos resultados sugieren un papel principal para los LT en la regulación de la inmunidad protectora contra coccidia tanto en huéspedes naturales como extraños.

En algunos trabajos se ha mostrado la activación de LT específicos a algún antígeno en específico en aves inmunizadas contra *Eimeria* a través de ensayos linfoproliferativos, algunos antígenos solubles provenientes de diferentes estadios de *E. tenella*, *E. máxima* o *E. acervulina*, fueron capaces de inducir la proliferación de LT obtenidos de aves que habían sido previamente inmunizadas contra la especie específica utilizada para la estimulación, sin embargo, se observó que los antígenos de *E. acervulina* inducen poca o nula proliferación de LT provenientes de aves inmunizadas contra *E. tenella*, indicando por lo tanto que la naturaleza de las respuestas inmunes son altamente especie-específicas por parte del huésped. Sin embargo, en un estudio reciente se ha reportado que los LT de aves inmunes a *E. tenella* responden a la estimulación con factores solubles de *E. acervulina* siempre y cuando se utilicen grandes concentraciones de este antígeno, y viceversa, sucede lo mismo si se estimulan LT de aves inmunes a *E. acervulina* con antígenos solubles de *E. tenella* o *E. acervulina* respondiendo igualmente bien a ambos antígenos. Este reporte sugiere que las reacciones cruzadas de las respuestas mediadas por los LT pueden ser inducidas bajo determinadas circunstancias. Aunque si realmente existiera la reactividad cruzada de los LT a estos epitopos en específico, la respuesta a la pregunta de: ¿Porqué esto no se ha podido observar cuando se efectúan pruebas in vivo? permanece aún sin esclarecer.

Los linfocitos t cd8+ son la respuesta al misterio del transporte de los esporozoitos hacia las criptas de lieberkun.

Por años se había intentado descubrir sin lograrlo: ¿Cuáles eran las células intraepiteliales que participaban en el transporte de los esporozoitos del epitelio intestinal al epitelio de las criptas? Sin embargo, investigaciones recientes han cambiado este panorama, aunque el papel exacto de lo que esta situación implica, aún hoy en día sigue generando controversia dentro de la comunidad científica.

¿Cuál es el hecho?

Bueno, se ha observado que un poco después del inicio de la infección con coccidia, los esporozoitos se observan invadiendo las células superficiales del epitelio intestinal, de hecho, el desarrollo de esquizogonia y gametogonia de algunas especies como *E. brunetti* y *E. praecox* tiene lugar allí, mientras que otras especies como *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, y *E. tenella* se desarrollan en el epitelio de las criptas.

Se ha observado que cuando se desafían aves previamente inmunes a *E. tenella*, únicamente doce horas después se observa un 50% menos de esporozoitos dentro de las células intestinales, esto en comparación a aves que no son inmunes y que fueron también desafiadas. Sin embargo, y aquí empieza una parte de lo polémico del asunto: Aves inmunes contra *E. acervulina* en condiciones de un segundo desafío tienen un 11% más de esporozoitos intracelulares que las aves no inmunes que también fueron desafiadas al mismo tiempo del segundo desafío de las inmunes.

Esto es impactante, ya que en términos generales de acuerdo a las publicaciones tempranas efectuadas por Peter Long, este investigador determinó en forma general que la respuesta secundaria a *E. acervulina* es mucho más eficiente en términos de protección, que la respuesta a un desafío secundario con *E. tenella*, de lo cual se puede deducir que la inmunidad no depende necesariamente del decremento en la invasividad de los esporozoitos, dado que en las aves inmunes a *E. acervulina* se observó que se evitaba completar el ciclo del parásito, lo cual se manifestó prácticamente por una menor tasa en la eliminación de ooquistes.

Los esporozoitos de algunas especies de *Eimeria* son transportados dentro de algunas células huéspedes del sitio de invasión al sitio de desarrollo, sin embargo, en la mayoría de los estudios no se ha podido determinar exactamente qué células son. Dos investigadores, Lawn y Rose en 1982 reportaron que los esporozoitos de *E. tenella* son transportados de la superficie del epitelio a las criptas dentro de linfocitos intraepiteliales (IEL's), aunque se observó una gran cantidad de macrófagos en la región intraepitelial, muy pocos de ellos contenían esporozoitos, los espacios entre el tejido contenía pocos esporozoitos y no se observaron estadios de desarrollo de la coccidia (trofozoitos o merozoitos) dentro de los IEL's.

Algunos trabajos recientes han identificado positivamente a las células responsables de transportar esporozoitos de *E. acervulina*. Utilizando una doble tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales para leucocitos aviares y esporozoitos de *E. acervulina*. Se encontró que el transporte ocurre primariamente en los LT CD8+ y posiblemente en igual cantidad dentro de macrófagos, quizá también un pequeño número de LT CD4+ pueden estar involucrados.

Esto resulta controversial ya que se sabe que los LT CD8+ no son células fagocíticas, lo cual indica que son invadidas activamente por los esporozoitos, y los LT CD8+ al migrar hacia las criptas intestinales los transportan. En estos trabajos se hallaron esporozoitos tanto en LT como en macrófagos lo cual explica en parte la confusión que existía anteriormente sobre la identidad de las células de transporte.

En los macrófagos la entrada de los esporozoitos puede ser por invasión activa o bien por fagocitosis, aunque Trout y Lillehoj desde 1995 mostraron que el porcentaje de invasión fue semejante al de los LT CD8+. Las mismas poblaciones celulares están involucradas en el transporte de esporozoitos tanto durante una infección primaria como durante una secundaria; la gran cantidad de esporozoitos observados en el interior de los LT CD8+ durante la infección secundaria sugieren que el transporte activo de esporozoitos se ve inhibido.

Lo anterior concuerda con lo que se ha observado en aves inmunes contra *E. tenella* que no muestran un decremento en el transporte de esporozoitos, pero sí una inhibición de la transferencia de los esporozoitos contenidos en los IEL's a las criptas intestinales. Esta inhibición de la transferencia de los esporozoitos a las células epiteliales de las criptas durante la infección secundaria posiblemente se debe a que los esporozoitos son incapaces para salir de los LT CD8+ activados, aunque para determinar el significado de este evento se requiere de efectuar más investigaciones al respecto.

Función de los Lt cd8+ en la infección por coccidia aviar. La esfera de las respuestas inmunes celulares inducidas por las infecciones coccidianas involucra ambos tipos de resistencia, específica y no específica, las que incluyen a factores solubles (complemento), células asesinas naturales (NK), macrófagos, LT cooperadores y LT citotóxicos. La resistencia inespecífica es responsable de la eliminación de parásitos durante las fases tempranas de una infección primaria, mientras que la resistencia específica usualmente se considera en el contexto del efecto que ejerce durante una infección secundaria, dando como resultado una reducción en el número de ooquistes eliminados, así como una atenuación de los signos clínicos.

Se ha observado que en huéspedes inmunes, cuando se efectúa un traslado directo de esporozoitos (transferencia quirúrgica), cuando éstos entran al intestino un poco después de la inoculación, se muestran impedidos para completar su desarrollo; cuando estos mismos esporozoitos son removidos 24-48 hrs postinoculación, y son inoculados en un huésped no inmune completan su desarrollo y se observa un efecto patogénico bien evidente.

La inmunidad adquirida a la coccidiosis involucra mecanismos que a la vez que ayudan a reducir el número de esporozoitos intracelulares inhiben el desarrollo natural del parásito. Aunque no se ha demostrado un papel directo de los LT CD8+ en la resistencia a la coccidiosis, después de una infección secundaria se ha reportado un incremento del número de estas células en el epitelio del intestino.

Se han observado frecuentemente LT CD8+ en contacto directo con células epiteliales infectadas con el parásito, sugiriendo que estas células epiteliales infectadas pueden ser un blanco para los LT citotóxicos en un contexto adecuado de modulación para su

destrucción por medio de las moléculas del MHC clase I.

En los ratones, una depleción selectiva de los LT CD8+ in vivo da como resultado un ligero incremento en la producción de ooquistes después de una infección secundaria con *E.*

vermiformis, sin embargo, no tiene ningún efecto si esto se realiza durante el transcurso de una infección primaria. Este mismo tratamiento incrementa significativamente la producción de ooquistes después de una infección secundaria con *E. pragensis*, con un ligero decremento en la cantidad de ooquistes después de una infección primaria.

Se han observado resultados similares en aves con depleción de LT CD8+ después de la infección primaria y secundaria con *E. acervulina*. La depleción de LT CD8+ incrementa la severidad de una infección secundaria al haber ausencia de células citotóxicas que en condiciones normales eliminan a las células infectadas y así limitan la replicación del parásito. Estas observaciones, junto con los hallazgos histológicos, dan una evidencia fuerte de que los LT CD8+ intervienen en la inmunidad específica de las aves contra los parásitos coccidianos.

Los linfocitos nk (población null) en la inmunidad contra la coccidiosis aviar.

La resistencia inespecífica responsable de la eliminación de parásitos, involucra componentes no específicos de la inmunidad, tales como las células NK o los macrófagos. En años recientes se ha despertado un interés considerable en la población linfoide de la mucosa intestinal, particularmente en las células NK intraepiteliales.

Se ha postulado que las células NK juegan un papel importante como mecanismo de defensa primario del huésped contra tumores, bacterias y virus, así también como en la homeocinesis de los tejidos normales. El epitelio intestinal de los pollos contiene células análogas en actividad a las células NK de los mamíferos. Se ha observado una correlación positiva entre la actividad de las células NK y la resistencia genética contra la coccidiosis. El incremento de la actividad de las células NK ocurre regularmente en estadios tempranos de la infección por coccidia, sugiriendo un papel importante para las células NK en el control de la proliferación parasitaria y la disminución de los efectos detrimentales de una infección. Los niveles de actividad de las células NK son más altos de lo normal exactamente sobretodo cuando coinciden con la eliminación del parásito. El aumento de la actividad de las células NK observada durante el periodo posterior a la infección con parásitos del género *Eimeria* se acompaña con un incremento en el número de IEL's que expresan el CD8+.

Es evidente que en la protección efectiva contra la coccidiosis empleando vacunas de coccidias aún falta mucho por conocer, sobretodo acerca de la relación inmunológica de protección que muestran algunos elementos celulares del ave con relación al parásito, sin embargo, lo descubierto hasta hoy en día de alguna forma marca ya la pauta a seguir.

Marco Antonio Juárez Estrada.

Departamento de Producción Animal: Aves FMVZ-UNAM. México.
