



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Microbiologia Médica e Imunologia II

Imunidade Natural

Maria Cristina Queiroga

Título:

Microbiologia Médica e Imunologia II-Imunidade Natural

Autores:

Maria Cristina Queiroga

ISBN: 978-972-778-153-9

Edição:

1ª Edição (fevereiro 2020)

Índice

Introdução	4
História breve da Imunologia	5
Defesas do hospedeiro	7
Barreiras Físicas	7
Fatores mecânicos	7
Fatores químicos	8
Fatores biológicos.....	8
Imunidade inata ou natural ou não específica	9
Fatores químicos	9
Fatores biológicos.....	11
Efeitos sistêmicos da inflamação.....	23
Febre.....	24
Leucocitose.....	24
Outras reações de fase aguda	25
Libertação de proteínas de fase aguda.....	24
Bibliografia:	26

Introdução

Os microrganismos são ubiqüitários. Vivemos num mundo de microrganismos. Eles habitam todos os ambientes que circundam os animais e o próprio organismo do animal. É o sistema imunitário que nos mantém vivos, a nós e aos outros animais, neste mundo de microrganismos.

Podemos ver o sistema imunitário como uma rede interativa em que a presença de invasores estranhos causa diversas alterações que geram uma série crescente de respostas, através de múltiplas vias que eventualmente resultam na ativação das defesas, eliminação dos invasores e subsequente aumento da resistência à invasão.

De entre os microrganismos, alguns são **patogénicos**, isto é, têm capacidade de provocar doença, outros não são. A **patogenicidade** é a capacidade de provocar doença. O grau ou intensidade da patogenicidade é a **virulência**. Esta é determinada por três características do agente patogénico: capacidade invasora, infecciosidade e potencial patogénico.

A **capacidade invasora** é a capacidade do microrganismo se estender aos tecidos adjacentes ou a outros tecidos. A **infecciosidade** é a capacidade do microrganismo se estabelecer e formar um foco de infeção. O **potencial patogénico** refere-se à capacidade de causar dano no hospedeiro. O potencial patogénico está muito dependente, mas não só, da **toxicidade**, ou a capacidade do microrganismo de produzir toxinas.

A virulência pode ser medida experimentalmente através da **dose letal 50 (DL 50)**, que corresponde à dose do microrganismo que ao ser administrada a 100 animais causa a morte em 50 deles, e da **dose infecciosa 50 (DI 50)**, a dose que infeta 50 animais quando é administrada a 100.

Um microrganismo muito virulento tem maiores possibilidades de causar doença do que um de baixa virulência. Se uma bactéria pode causar doença a maioria das vezes que invade um animal saudável, mesmo que em baixas doses, trata-se de um **patogénico primário**. Exemplos de patogénicos primários são o vírus da esgana, o vírus da imunodeficiência humana e a *Brucella abortus*. Outros microrganismos podem ter uma virulência tão baixa que apenas causam doença se administrados em altas doses ou se as defesas do hospedeiro estão deprimidas. Estes são **patogénicos oportunistas**. Exemplos destes são *Mannheimia haemolytica*, *Candida albicans*, etc.

Sempre que um microrganismo parasita está a crescer e a multiplicar-se no hospedeiro (dentro ou fora) existe uma **infecção**. Esta situação pode, ou não, resultar em doença. Quando o microrganismo, ou os seus produtos, provocam no hospedeiro alteração no estado de saúde em que parte ou a totalidade do organismo não está equilibrado, ou está incapacitado de desenvolver as suas funções, estamos perante uma **doença infecciosa**.

Para produzir doença o agente patogénico tem que: (1) Ter acesso ao hospedeiro, (2) aderir, colonizar ou invadir, (3) multiplicar-se (crescer) ou completar o ciclo de vida no hospedeiro (dentro ou fora), (4) ultrapassar os mecanismos de defesa do hospedeiro e (5) possuir capacidade mecânica, química ou molecular para danificar o hospedeiro.

O **sistema imunitário** é um conjunto de órgãos, tecidos, células e moléculas, que existem distribuídos por todo organismo e que protegem o hospedeiro dos microrganismos e dos seus produtos metabólicos. O sistema imunitário reconhece substâncias estranhas e microrganismos e desenvolve mecanismos que levam à sua neutralização ou destruição.

De acordo com o dicionário de português Porto Editora on-line (consultado em maio de 2013), **imunidade** é a “invulnerabilidade natural ou adquirida dos organismos vivos ao ataque de certos agentes infecciosos ou tóxicos; resistência”

A **resposta imune** é a sequência de mecanismos que se desenvolvem adequados à eliminação de um agente específico.

A **imunologia** é a ciência que estuda a resposta imune, nos seus aspectos biológicos, químicos e físicos; a estrutura e função do sistema imunológico; a imunização e as disfunções do sistema imunitário.

História breve da Imunologia

No século XII os chineses repararam que pessoas que recuperavam da varíola eram resistentes a novos ataques da doença. Resolveram infetar deliberadamente recém-nascidos com varíola, através da aplicação de pústulas de pessoas infetadas em pequenas incisões feitas na pele. As crianças que resistiam à doença, ficavam protegidas por toda a vida. Os riscos inerentes a este processo eram aceitáveis, visto que a mortalidade infantil era muito elevada. Usando pústulas recolhidas de pessoas com casos de doença menos grave, a mortalidade acabava por ser

reduzida, cerca de 1% das crianças submetidas a este processo, chamado **variolação**, muito menor que os 20% de mortalidade associada a casos clínicos de varíola.

O conhecimento sobre a variolação chega à Europa no início do século XVIII.

A peste bovina era uma doença viral, comum na Europa desde o século IX, que causava a morte a um elevado número de bovinos. Como os tratamentos habituais da altura não resultavam, e as lesões da doença nos bovinos se assemelhavam às lesões da varíola, em 1754 foi instituído um procedimento em que se fazia uma incisão na barbeta do animal afetado onde se inseria um pano ensopado no corrimento nasal do próprio animal. Este processo reduzia os sintomas da doença e os animais inoculados tornavam-se resistentes. Este método tornou-se popular e havia pessoas que viajavam pela Europa a **inocular** bovinos.

Em 1798, Edward Jenner, um médico inglês, descobriu que as pústulas de animais com peste bovina podiam ser utilizadas para fazer a variolação, reduzindo os riscos a níveis insignificantes. Com este processo, chamado **vacinação** (do latim *vaca*) foi possível erradicar a varíola do Mundo em 1970.

A inoculação foi utilizada na tentativa de controlar várias doenças, como a varíola ovina e a peripneumonia bovina, com resultados variáveis.

Só em 1879, Louis Pasteur descobre o princípio subjacente à imunização. No decorrer dos seus trabalhos sobre cólera aviária, verificou que algumas galinhas que tinham sido inoculadas com culturas de *Pasteurella multocida* envelhecidas, e que não tinham morrido em resultado dessa inoculação, ao serem novamente inoculadas com culturas frescas da mesma bactéria, não sucumbiam a este agente patogénico, estavam protegidas. Pasteur percebeu que o fenómeno seria o mesmo que estava na base dos resultados da vacinação de Jenner. Esta descoberta lançou a ciência da imunologia. Pasteur produziu depois uma vacina para carbúnculo hemático, cultivando *Bacillus anthracis* a altas temperaturas e uma vacina da raiva para o que utilizou medula espinal dessecada, obtida de cães afetados com raiva.

Pasteur produziu vacinas com **microrganismos vivos** atenuados, mas pouco tempo depois, Daniel Salmon e Theobald Smith demonstraram que é possível produzir vacinas eficientes com microrganismos mortos (mortas pelo calor).

Passado algum tempo, von Behring e Kitasato mostraram que filtrados de culturas de *Clostridium tetani* podiam tornar os animais resistentes ao tétano, mesmo sem conter o

microrganismo. Revelaram, portanto, que **produtos bacterianos**, neste caso a toxina tetânica, também protegem os animais da doença.

Em 1900 muitas vacinas já tinham sido produzidas e a indução de imunidade para doenças infecciosas nos animais era um fenômeno reconhecido. Porém, só depois se tem vindo a perceber os processos moleculares e celulares da imunidade antimicrobiana.

Defesas do hospedeiro

As defesas do hospedeiro, ou o sistema imunitário, consistem numa rede complicada de reações bioquímicas e celulares que interagem entre si.

A entrada de um agente patogénico no organismo animal pode alterar a expressão de um grande número de moléculas e desenvolvem-se vários mecanismos que de forma concertada levam à destruição dos agentes invasores. As três grandes barreiras que protegem os animais dos microrganismos invasores são: (1) barreiras físicas, (2) imunidade inata e (3) imunidade adaptativa. Cada uma delas atua de forma mais eficiente do que a anterior.

Antes de mais, há fatores de ordem geral que interferem com a maior ou menor suscetibilidade de um indivíduo aos microrganismos. Os fatores individuais, de natureza natural/inata, que afetam a resistência são a espécie; a raça, o sexo; a idade; o estado fisiológico, o estado de nutrição, o estado de saúde.

Barreiras Físicas

As **barreiras físicas** são a primeira barreira à entrada de microrganismos no organismo animal. Estas são constituídas pela pele e mucosas e são adjuvadas por fatores mecânicos, químicos e biológicos.

Fatores mecânicos

Alguns dos fatores mecânicos associados a esta primeira barreira são: os cílios que existem na epiderme e não permitem a adesão de corpos estranhos que contactam com a pele, existem também nas fossas nasais para impedir a entrada de corpos estranhos para o interior do

organismo; a descamação da pele - a pele está em constante renovação, evitando a fixação de corpos estranhos, ao ser substituídas as células arrastam consigo os agentes microbianos; a queratinização - a última camada da epiderme é queratinizada, ou seja, é mais resistente, diminuindo o risco de agressão por qualquer agente patogénico; o sentido do fluxo dos mucos e excreções - o fluxo dos mucos (respiratório e urinário) é no sentido do interior para o exterior do corpo, o que permite a eliminação de eventuais agentes alojados nas respetivas vias, o leite é também um bom exemplo deste mecanismo, a sua ejeção é efetuada no sentido do interior para o exterior; a viscosidade do muco - os mucos protetores do organismo são pegajosos, o que permite a fixação de agentes e impede a sua progressão para o interior do organismo; a diarreia e vômito - sempre que o tubo digestivo deteta um agente agressor ou irritante age no sentido da eliminação do mesmo, tal como acontece no aparelho respiratório, que se protege através da tosse e do espirro para proceder à eliminação de agentes estranhos no trato respiratório.

Fatores químicos

Os fatores químicos associados à primeira barreira de defesa são as secreções e enzimas. As glândulas sebáceas, sudoríparas e lacrimais segregam substâncias tóxicas para muitas bactérias, impedindo a sua progressão no organismo, como exemplo temos a lisozima, que é uma enzima encontrada em todos os fluidos corporais exceto no fluido cérebroespinal e na urina, que cliva a ligação entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina, desta forma destrói a parede celular das bactérias de Gram positivo. Os microrganismos ingeridos com os alimentos são destruídos no estômago pelo ácido clorídrico e pelas enzimas do suco gástrico, os que resistem chegam ao intestino onde são sujeitos a um pH alcalino que tem como intuito provocar a morte dos que apenas sobrevivem em meios ácidos. Associados à pele também encontramos fatores químicos como o pH ácido, a presença de enzimas e a presença de ácidos gordos, que têm como função provocar a lise e não permitir a entrada de microrganismos.

Fatores biológicos

Como fatores biológicos associados à 1ª barreira temos a microbiota indígena, microbiota normal ou flora normal que é constituída pelo conjunto de microrganismos que colonizam a pele e mucosas dos animais e que competem com os microrganismos potencialmente patogénicos. Dos microrganismos que colonizam a pele e as mucosas, a maior comunidade

encontra-se no intestino. A microbiota intestinal consiste em mais de mil espécies (nos humanos), em que cada indivíduo alberga cerca de 160 espécies e cerca de 10^{14} células (nove em cada 10 células no corpo humano, são bactérias. Nos animais estima-se que seja um número aproximado). As bactérias contêm cerca de 100 vezes mais genes do que o genoma humano. Pessoa/ Animal + microrganismo = superorganismo – este é regulado pelo sistema imune. A maioria da microbiota são bactérias (anaeróbios facultativos e anaeróbios), algumas arqueobactérias, poucos eucariotas e muitos vírus e bacteriófagos. Estes microrganismos ligam-se a recetores específicos, alimentam-se dos recursos disponíveis impedindo assim a sobrevivência de outros microrganismos que tentem fixar-se aos animais. A flora indígena tem ainda a capacidade de produzir substâncias bactericidas (bacteriocinas) que destroem e impedem a penetração de microrganismos estranhos no animal formando assim as denominadas barreiras biológicas.

Imunidade inata ou natural ou não específica

A **imunidade inata** consiste em vários mecanismos de ação rápida que respondem prontamente aos primeiros sinais de invasão microbiana para impedir a entrada e progressão dos agentes patogénicos no organismo. A ação destes mecanismos é igual para qualquer agente patogénico e a eficiência da resposta imune natural não melhora ao longo de repetidos contactos, ou seja, a resposta a uma segunda infeção é igual à resposta à primeira infeção.

Fatores químicos

Diversos **fatores químicos** contribuem para a defesa do hospedeiro, atuando sobre os microrganismos que ultrapassaram a primeira barreira. Alguns desses fatores são: as proteínas do complemento. O complemento é constituído por mais de 30 proteínas presentes no plasma na sua forma inativada e que são produzidas maioritariamente pelos hepatócitos. Ao ser ativada a primeira proteína da cadeia, as proteínas seguintes são ativadas como uma cascata, ampliando a resposta. As proteínas são clivadas e, assim, ativadas libertando-se fragmentos que vão atuar sobre a proteína seguinte. Algumas destas proteínas atuam diretamente na lise de células e bactérias de Gram negativo, outras estimulam a resposta inflamatória com desgranulação de mastócitos e ação quimiotática e outras, ainda, são opsoninas que recobrem os agentes infecciosos e depois se ligam a recetores nas células fagocitárias, potenciando a fagocitose.

Outros fatores químicos importantes são as citocinas que são glicoproteínas produzidas por linfócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos, plaquetas e outras células que atuam como mediadores da resposta imunitária e inflamatória. Estas moléculas de sinalização estabelecem a interação entre células. As células do sistema imune podem sintetizar e segregar centenas de citocinas diferentes que controlam a resposta imune. As citocinas afetam muitas células diferentes e cada célula segrega, geralmente, várias citocinas ao mesmo tempo. Isto resulta numa complexa rede de sinais transmitidos entre as células

Os sinais intercelulares são transmitidos de 2 formas. (1) *Volume transmission*, em que uma molécula (citocina) é libertada pela célula que emite o sinal, difunde-se no meio extracelular e vai ligar-se a recetores específicos na célula alvo, e (2) *network transmission*, quando duas células estabelecem contacto direto usando recetores complementares e o sinal é transmitido de uma célula à outra. Independentemente de como o sinal é transmitido, a célula alvo é sinalizada através de recetores apropriados e é induzida a comportar-se de uma forma específica.

Quando a citocina se liga ao recetor específico, são gerados fatores de transcrição que vão ativar a transcrição de determinados genes. Como resultado desta alteração na transcrição de genes, são produzidas e segregadas novas proteínas e as células alvo alteram o seu comportamento, podendo iniciar ou parar a proliferação, segregar outras moléculas, expressar outros recetores ou, até, induzir a sua própria morte.

As citocinas diferem das hormonas convencionais em diferentes aspetos. (1) Ao contrário das hormonas que atuam num único tipo de célula alvo, as citocinas são pleiotrópicas, isto é, uma citocina pode atuar sobre muitas células diferentes. (2) As células do sistema imune geralmente segregam várias citocinas, por exemplo, os macrófagos segregam pelo menos quatro interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18) e fator de necrose de tumores- α (TNF- α). (3) As citocinas são redundantes na sua atividade biológica, isto é, várias citocinas diferentes têm efeitos semelhantes, por exemplo IL-1, TNF- α , TNF- β , IL-6, *high mobility group box protein-1* (HMGB1) e a quimoquina CCL3, todas atuam sobre o cérebro causando a febre. (4) Os sinais mediados por citocinas são transitórios e a mensagem transmitida pode variar ao longo do tempo conforme as variações nas citocinas presentes num determinado ambiente. Além de pleiotrópicas e redundantes, outras propriedades das citocinas são: são proteínas de curta duração, têm estrutura e recetores muito diversos, podem atuar localmente e/ ou sistemicamente, são cuidadosamente reguladas e são tóxicas em doses elevadas.

A nomenclatura das citocinas não se baseia em nenhuma relação sistemática entre estas proteínas.

- Interleuquinas (IL) – Estabelecem a comunicação entre linfócitos e outros leucócitos. São uma mistura heterogénica de proteínas com pouco em comum além do nome.
- Interferões (IFN) – Há três tipos de interferões, I, II e III. São muitos os Interferões do tipo I e são identificados por letras gregas. Os interferões do tipo I (IFN- α e IFN- β) são maioritariamente antivirais e têm um papel imunoregulador secundário, mas o IFN- α é um mediador chave na inflamação aguda; Só há um interferon do tipo II, IFN- γ , produzido pelos linfócitos T quando estimulados pelos antígenos; há três do tipo III. Os interferões dos tipos II e III são principalmente imunoreguladores.
- Factores de necrose de tumores (TNF) – São proteínas citotóxicas para células tumorais; mediadores de inflamação.
- Quimoquinas – São moléculas quimiotáticas para leucócitos, estimulam a circulação, migração e ativação destas células.
- Fatores de crescimento celular (*colony stimulating factors* – CSF) - Regulam a produção de células sanguíneas, regulando a atividade das células estaminais.

Ainda outros fatores químicos importantes são moléculas antimicrobianas produzidas por neutrófilos, macrófagos, células epiteliais, células de Paneth e plaquetas. As defensinas matam ou inativam bactérias, fungos e vírus com envelope e neutralizam toxinas; a lisozima, que está também presente no sangue, destrói o peptidoglicano e é uma opsonina; a beta-lisina, produzida pelas plaquetas, que provoca a lise de bactérias Gram-positivas, as lactoferrina e transferrina que sequestram iões ferro (indispensável para as bactérias) e a fibronectina que estimula a fagocitose porque opsoniza os agentes estranhos.

Fatores biológicos

Podemos considerar **fatores biológicos** mecanismos mais complexos também de resposta a microrganismos invasores.

Inflamação

O mais importante destes mecanismos é a **inflamação** que concentra células defensivas e moléculas antimicrobianas nos locais invadidos por microrganismos e onde há destruição tecidual.

A inflamação aguda ocorre poucos minutos após os tecidos serem danificados. Este dano nos tecidos geram três tipos de sinais para iniciar a inflamação: (1) as células danificadas libertam – *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) ou alarminas - que induzem a libertação de citocinas, quimoquinas e enzimas pelas células sentinela, (2) os microrganismos invasores libertam moléculas – *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) que também atuam sobre as células sentinela e (3) a dor causada pelo dano tecidual provoca a libertação de péptidos bioativos pelos nervos sensitivos. Esta mistura de moléculas, mediadores da inflamação, atrai leucócitos e atua sobre os vasos sanguíneos, aumentando a chegada de sangue ao local.

As células sentinela são macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Estas células são ativadas quando as DAMPs ou as PAMPs se ligam aos seus recetores – *toll-like receptors* (TLRs) - passando a sintetizar e segregar uma mistura de moléculas que promovem a inflamação, inibem o crescimento microbiano e iniciam os primeiros passos da imunidade adaptativa, citocinas. Estas moléculas segregadas difundem-se e ligam-se a recetores nas células vizinhas induzindo a libertação de outras citocinas.

DAMPs são moléculas originadas em tecidos danificados do próprio animal, como sulfato de heparano, fibrinogénio e proteínas de choque térmico.

PAMPs são moléculas altamente conservadas, ou padrões moleculares, que estão presentes em diversos microrganismos. Estas moléculas incluem o LPS, das bactérias de Gram-negativo, os ácidos lipoteicóicos das bactérias de Gram-positivo, os glicolípidos das micobactérias e os mananos das leveduras, tal como o DNA bacteriano e os ácidos nucleicos virais.

Os TLRs são um grupo importante de *pattern-recognition receptors* (PRRs) que são glicoproteínas transmembranares. Estas atuam como receptores, expressos à superfície de muitas células, principalmente das células sentinela e das células epiteliais do trato respiratório e do intestino. Nos mamíferos, existem 10 (ou mais) TLRs diferentes, cada um pode ser receptor para uma ou mais moléculas microbianas específicas (**Tabela 1**). No seu conjunto estes 10 TLRs têm capacidade para reconhecer todos os agentes infecciosos. Quando um TLR se liga a

uma molécula de um microrganismo invasor, é desencadeado na célula o sinal para ativação dos genes para a produção de citocinas. Desenvolve-se uma cascata que envolve várias reações bioquímicas, contando com muitas proteínas, que diferem de acordo com o respetivo TLR. Todos os TLR, excepto o TLR3, usam uma proteína inicial chamada MyD88 para ativar três fatores de transcrição principais: NF- κ B (*nuclear factor kappa-B*), MAPK (*MAP kinase*) e IRF3. Os fatores NF- κ B e MAPK ativam os genes para as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α e o fator IRF3 (*interferon regulator factor*) ativa os genes para o INF- β . Estas citocinas são produzidas como precursores inativos, que são, depois, ativados pela proteína caspase-1, que, por sua vez, é ativada por um complexo de proteínas chamado inflamassoma.

Tabela 1. Recetores *Toll-like* e respetivos PAMPs reconhecidos (adaptado de Tizard, 2004)

TLR	Ligando no microrganismo
TLR 1	Lipoproteínas diaciladas
TLR 2	Peptidoglicano Lipoproteínas bacterianas Zimosan (carbohidrato insolúvel da parede das leveduras) Alguns LPS Espiroquetas Micobactérias Ácido lipoteicóico Proteínas de choque térmico Células necrosadas
TLR 3	RNA viral de dupla cadeia
TLR 4	LPS Ácido lipoteicóico Proteínas virais Proteínas de choque térmico Fibrinogénio Ácidos gordos saturados B-defensinas Sulfato de heparan (resultante de células danificadas)
TLR 5	Flagelina e bactérias flageladas
TLR 6	Células necrosadas Lipoproteínas diaciladas Peptidoglicano (com o TLR 2)
TLR 7	Pequenas moléculas antivirais
TLR 8	Pequenas moléculas antivirais
TLR 9	Dinucleótido CpG (citosina-guanina) não metilado de DNA bacteriano
TLR 10	Um pseudogene (gene não funcional)

Alguns TLRs estão localizados na superfície das células, ligados à membrana celular, são responsáveis pelo reconhecimento de agentes invasores extracelulares, como as bactérias e fungos. Outros localizam-se dentro da célula, dentro de vesículas, e detetam agressores intracelulares como os vírus.

Existem outros PRRs, alguns também ligados à membrana celular, como os recetores de manose, outros no citoplasma, como os recetores *NOD-like*, e outros ainda, são solúveis, como a ficolina e algumas proteínas do complemento.

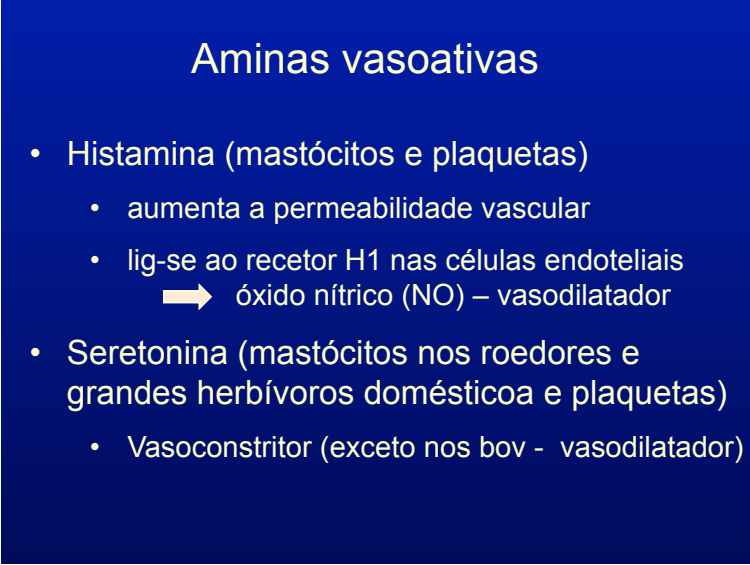
Quando estimuladas, as células sentinela sintetizam e segregam três citocinas principais (citocinas pró-inflamatórias): TNF- α , IL-1 e IL-6. A TNF- α é a primeira a ser produzida muito cedo na inflamação, seguida de ondas de IL-1 e depois da IL-6. As células sentinela ativadas também produzem um grande número de proteínas quimiotáticas, quimoquinas, que atraem células de defesa ao local da invasão microbiana, e enzimas como a óxido nítrico sintetase 2 (NOS2), que gera oxidantes como o óxido nítrico (NO), a ciclooxigenase-2 (COX-2), que origina lípidos inflamatórios como as prostaglandinas e os leucotrienos. Quando produzidas em quantidades suficientes para atingir o cérebro e o fígado, estas moléculas causam a febre e sintomas de doença e promovem a resposta de fase aguda. Se as células sentinela detetam DNA ou RNA virais, também segregam INF- α e INF- β .

Fatores vasoativos são mediadores da inflamação que atuam sobre os vasos sanguíneos, provocando alterações. Logo após a lesão, o fluxo sanguíneo nos pequenos capilares no local diminui, permitindo aos leucócitos ligarem-se à parede do vaso. Então, esses vasos dilatam (vasodilatação) e o fluxo sanguíneo aumenta muito, causando um aumento da permeabilidade vascular com saída de líquido dos vasos para os tecidos, provocando o edema e o aumento de volume. Ao mesmo tempo, ocorrem alterações nas células endoteliais, permitindo a adesão dos neutrófilos e monócitos. Se houver dano da parede vascular, as plaquetas também se ligam a esses locais, libertando fatores de coagulação e moléculas vasoativas. Há duas fases na saída de líquido dos vasos, primeira há uma inicial imediata causada pelas moléculas vasoativas produzidas pelas células sentinela, pelos tecidos danificados e pelos nervos. Várias horas depois quando os leucócitos começam a transvasar, as células endoteliais e perivascularares contraem-se, afastando-se umas das outras, permitindo a saída de líquido pelos espaços intercelulares. Depois da eliminação do agente invasor, o processo inflamatório termina e o fluxo sanguíneo retorna ao normal.

As moléculas vasoativas têm várias origens, algumas derivam de precursores inativos no plasma, outras de células: células sentinela (macrófagos e mastócitos); de leucócitos (neutrófilos e basófilos); das plaquetas ou das células dos tecidos do hospedeiro danificadas. Os nervos sensitivos também podem produzir neurotransmissores que causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. O fator de ativação plaquetária (PAF) é libertado das células lesionadas, leucócitos e mastócitos.

São fatores vasoativos as aminas vasoativas (**Figura 1**), os péptidos vasoativos e os lípidos vasoativos ou eicosanoides.

- Aminas vasoativas – são libertadas pelos mastócitos e plaquetas. São aminas vasoativas a histamina e a serotonina.



Aminas vasoativas

- **Histamina (mastócitos e plaquetas)**
 - aumenta a permeabilidade vascular
 - lig-se ao recetor H1 nas células endoteliais
 ➔ óxido nítrico (NO) – vasodilatador
- **Seretonina (mastócitos nos roedores e grandes herbívoros domésticoa e plaquetas)**
 - Vasoconstritor (exceto nos bov - vasodilatador)

Figura 1. Aminas vasoativas

- Péptidos vasoativos – são gerados por proteólise de percursos inativos. Por exemplo, proteases dos mastócitos atuam sobre as proteínas C3 e C5 do complemento para gerar os péptidos C3a e C5a que promovem a libertação de histaminas dos mastócitos e são quimiotáticos para neutrófilos e monócitos. Os grânulos dos mastócitos contêm outras proteases, calicreínas, que atuam sobre as proteínas quinogénios para gerar as quininas que são pequenos péptidos vasoativos, que aumentam a permeabilidade vascular, estimulam os neutrófilos e desencadeiam a expressão de recetores da dor e podem ter ação antimicrobiana, sendo a mais importante a bradiquinina. Os neuropéptidos, como a substância P e a neuroquinina são produzidos pelos nervos sensitivos, causando dor, desencadeando vasodilatação e aumento da permeabilidade

vascular. O mais importante é a *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) que é um potente vasodilatador e indutor de dor.

- Lípidos vasoativos – Quando os tecidos são danificados, ou as células sentinela são estimuladas, as suas fosfolipases atuam sobre os fosfolípidos da membrana celular produzindo o ácido araquidônico. Este vai ser convertido pelos enzimas 5-lipoxigenase ou cicloxigenases (COX-1 e COX-2) em lípidos vasoativos ou eicosanoides (**Figura 2**). São eicosanoides as prostaglandinas, os tromboxanos, as prostaciclina, os leucotrienos, e os ácidos hidroperóxido e hidroxieicosatetraenoico. As prostaglandinas e alguns leucotrienos produzem dilatação vascular, outras prostaglandinas provocam aumento da permeabilidade vascular, outros leucotrienos são importantes fatores quimiotáticos (LTB₄) (**Figura 3**).

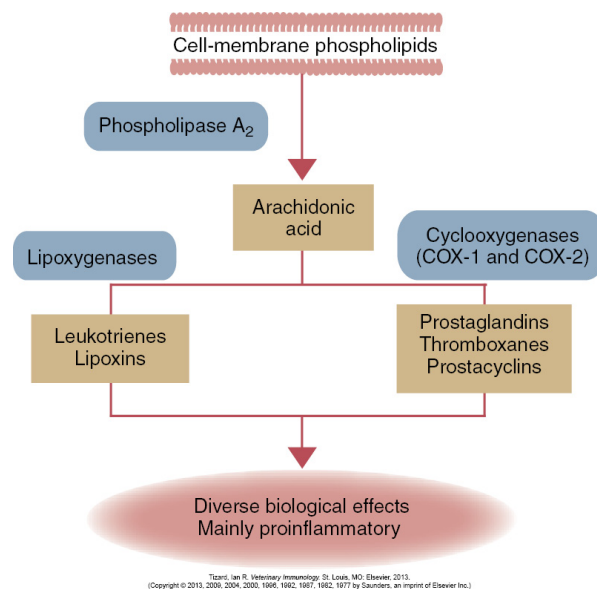


Figura 2. Formação de eicosanoides

Lípidos vasoativos = Eicosanoides

- **Leucotrienos (LT)**
 - LTB_4 (neutrófilos, macrófagos e mastócitos) – atrai neutrófilos e eosinófilose ativa neutrófilos
 - LTC_4 } (mastócitos, eosinófilos e basófilos) -
 - LTD_4 } aumentam a permeabilidade vascular e
 - LTE_4 } contração do músculo liso
- **Lipoxinas** (neutrófilos) – inibe migração dos neutrófilos
- **Prostaglandinas (PG)** – ação variada
 - PGE_2 } (maioria das células nucleadas)
 - PGF_2 }
 - Tromboxanos (TxA_2 e PGA_2) - plaquetas
 - Prostaciclina (PGI_2) – células endoteliais

Figura 3. Eicosanoides

Fagocitose

Outros fatores biológicos é a **fagocitose**, processo mediado pelos fagócitos que internalizam os microrganismos e procedem á sua digestão;

As fases da fagocitose são: ativação, quimiotatismo, adesão, ingestão e destruição.

A fagocitose pode ser mediada por opsonização (**Figura 4**). Tanto os neutrófilos como as bactérias têm geralmente carga negativa e repelem-se mutuamente. A carga eletrostática das bactérias é neutralizada através da sua cobertura por moléculas eletropositivas que são as opsoninas.

Fagocitose do tipo 1 – mediada por anticorpos

Fagocitose do tipo 2 – mediada por C3b

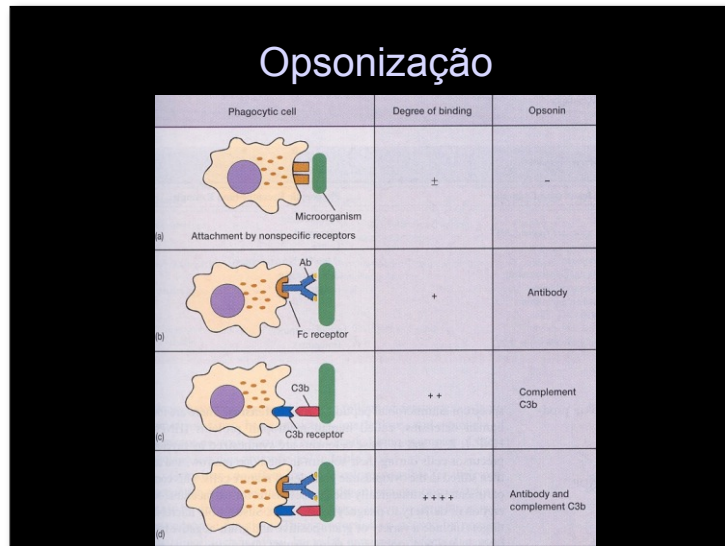


Figura 4. Opsonização

A destruição dos microrganismos fagocitados ocorre por ação de enzimas líticas contidos nos lisossomas e por explosão respiratória (*respiratory burst*). Poucos segundos depois de encontrar a bactéria, o neutrófilo aumenta o seu consumo de oxigénio quase 100 vezes. Isto resulta na ativação do complexo enzimático de superfície NOX.

NOX (NADPH oxidase) – complexo enzimático na superfície celular. Na célula em repouso estes componentes estão separados, mas quando o neutrófilo é ativado pelo TNF-alfa, ou outro estímulo inflamatório, o complexo NOS forma-se e é ativado. O NOX leva à formação dos iões de oxigénio e, por fim à formação de ácido hipocloroso (HOCl) que inativa as bactérias por desnaturação e agregação das proteínas e oxidação dos lípidos.

Autofagia – *M. tuberculosis* resiste dentro dos macrófagos por impedir a fusão do fagossoma com o lisossoma. Quando o macrófago é ativado pelo IFN-gama produzido pelos Linfócitos Th1, é desencadeada a autofagia, forma-se um novo auto-fagossoma em volta do fagossoma bloqueado, que se funde com o lisossoma, permitindo a destruição dos microrganismos. Várias bactérias intracelulares são eliminadas por autofagia: *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella Typhimurium*. Mas há bactérias que desenvolveram mecanismos para evitar a autofagia: *Listeria*, *Shigella* e outras sobrevivem dentro do auto-fagossoma.

Cascata do complemento

A **cascata do complemento** é outro fator biológico. O sistema do complemento é composto por cerca de 30 proteínas que circulam no sangue (5% a 10% das proteínas séricas) ou são recetores nas membranas celulares. A maioria destas proteínas são sintetizadas no fígado outras são produzidas pelos macrófagos e circulam de forma inativa. Quando um agente patogénico invade o organismo, algumas proteínas são ativadas e interagem umas com as outras produzindo uma cascata de ativação em que uma proteína ativa a seguinte e esta uma outra e assim sucessivamente. Há três vias de ativação do complemento, a via clássica que é ativada por anticorpos ligados a antigénios e, portanto, já pertence à imunidade adaptativa, a via da lectina e a via alternativa em que a primeira proteína, esta um PRR, se liga a estruturas dos próprios microrganismos, PAMPs, como a manose da parede das leveduras, o LPS ou ácidos teicóicos, sem intervenção de anticorpos, e, portanto, são vias inatas.

A via clássica de ativação do complemento é desencadeada por um aglomerado de imunoglobulinas ligada a um agente patogénico e, portanto, está associada à resposta imune adaptativa. Ao contrário das vias inatas que são imediatas, esta via depende da formação prévia de anticorpos (Ac), portanto só poderá funcionar 7 a 10 dias após a infeção. No entanto, após ativada, é muito eficiente.

Quando as moléculas de Ac se ligam aos antigénios, expõem locais ativos nas respetivas frações FC. Se duas IgG, ou uma só IgM, estiverem ligados a um microrganismo, expondo os locais ativos, a proteína C1q do complemento pode ligar-se e é desencadeada a cascata quando pelo menos duas das suas seis terminações estão ligadas à fração FC do Ac. Duas moléculas de C1r e duas de C1s estão ligadas à C1q. Quando a C1q se liga, dá-se uma alteração conformacional que é transmitida à C1r, que vai expor um local ativo proteolítico. Este atua sobre a C1s convertendo-a numa enzima ativa. Esta C1 ativada cliva a C4 em C4a e C4b. A C2 liga-se à C4b para formar o complexo C4b2. Então, a C1s ativada cliva a C2 ligada, libertando um pequeno péptido C2a e C3 convertase C4b2b que atua sobre a C3, continuando a via comum ou via de amplificação.

Além de se ligar a complexos imunes, a C1q pode também ligar-se a células necróticas e apoptóticas, proteínas da matriz extracelular, pentaxinas, como a proteína C reativa, proteínas amiloides e priónicas e DNA. No entanto, todas estas substâncias, com exceção dos complexos imunes, podem também ligar-se aos inibidores do complemento, C1-BP e fator H, não proporcionando a ativação completa do complemento.

A via da lectina é iniciada quando proteínas, PRRs solúveis, se ligam a carboidratos nos agentes patogénicos. Estas lectinas incluem a *manose binding lectin* (MBL) e a ficolina. A MBL pode ligar-se a bactérias, fungos, protozoários e vírus, ligando-se à manose ou N-acetilglucosamina nas paredes celulares, mas não se liga a glicoproteínas mamíferas. Depois de ligada, a MBL ativa um protease chamada MASP-2 (*MBL-associated serine protease*) que atua sobre a C4, clivando-a em C4a e C4b. Isto expõe um grupo tioéster na C4b que gera um grupo carboxilo reativo, estabelecendo uma ligação covalente entre a C4b e a superfície microbiana. A proteína C2 liga-se à C4b, formando o complexo C4b2. Nesta altura a C2 é clivada pela MASP-2, formando-se a C4b2b, ou C3 convertase, que vai atuar sobre a C3b clivando-a em C3a e C3b. A ficolina liga-se aos oligossacáridos nos microrganismos levando ao mesmo processo. Cada complexo C4b2b pode originar 200 moléculas de C3b.

A via alternativa é responsável por 80% a 90% da ativação do complemento e é desencadeada quando já existe C3b. Esta liga-se à superfície do agente patogénico e, com outras proteínas do complemento, forma outra C3 convertase chamada C3bBb.

A proteína C3 é a mais importante do complemento e a que existe em maiores concentrações no sangue. É constituída por duas cadeias, α e β , ligadas entre si por pontes dissulfureto, e é sintetizada pelos hepatócitos e pelos macrófagos. Esta proteína possui uma cadeia lateral tioéster muito reativa que, quando ativada, se liga à superfície dos microrganismos, marcando-os para destruição pelas células imunes. Para prevenir que se ligue a células normais do organismo animal, esta cadeia está escondida dentro da molécula que se encontra enrolada. Quando a C3 é clivada em C3a e C3b, a C3b expõe a ligação tioéster entre a cisteína e a glutamina. Esta ligação quebra-se para formar um grupo carboxilo reativo que permite à molécula ligar-se de forma covalente à superfície celular. Quando isto acontece em células normais, liga-se ao C3b uma outra proteína chamada fator H, induzindo uma protease, chamada fator I, a degradar o C3b. Este processo depende da existência de glicoproteínas ricas em ácido siálico e outros polissacarídeos neutros ou aniónicos que estimulam a ligação do fator H ao C3b. A parede das bactérias não tem ácido siálico, portanto o fator H não se liga e o C3b persiste, expondo um local para ligação de outra proteína do complemento, o fator B. Após esta ligação, o fator B é clivado pela protease fator D, libertando o fragmento solúvel Ba e deixando o C3bBb, C3 convertase, ligado à bactéria que vai ativar a proteína C3, dividindo-a em C3a e C3b.

A partir deste ponto haverá uma via comum, também chamada via de amplificação. A C3b, ligada à superfície microbiana, liga-se à C5. As duas C3 convertases, C4b2b e C3bBb, atuam sobre a C5, quando esta está ligada à C3b (formam-se as C5 convertases C4b2b3b e C3bBb3b),

libertando um pequeno péptido chamado C5a e expondo no C5b um local para ligação à C6 e C7 para formar o complexo C5b67. Este complexo tem a capacidade de se introduzir na membrana celular do microrganismo, ligando-se, então, à C8 e a 12 a 18 moléculas de C9 para formar um estrutura tubular chamada complexo terminal do complemento (*terminal complement complex* – TCC) ou complexo de ataque membranar (*membrane attack complex* – MAC). O MAC faz um orifício na membrana celular do agente invasor. Se forem formados suficientes complexos, o microrganismo sofrerá lise osmótica.

Mais importante do que a lise causada pelo MAC, é o efeito pro-inflamatório muito potente dos pequenos péptidos formados durante a cascata, C3a e C3b. Estes péptidos induzem a desgranulação dos mastócitos e estimulam as plaquetas a libertar as moléculas vasoativas histamina e serotonina, desencadeiam a inflamação, são quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos, aumentam a permeabilidade vascular, causando a libertação de enzimas dos lisossomas dos neutrófilos e tromboxanos dos macrófagos e são anafilatoxinas (quando injetadas em quantidades suficientes podem causar a morte ao animal de forma semelhante ao choque anafilático). A C3a é capaz de inativar bactérias rompendo a membrana celular, designadamente, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*.

Além dos péptidos C3a e C5a, outros também têm ação quimiotática (Tabela 2). Quando C5a atrai neutrófilos, também estimula a sua atividade oxidativa e a expressão de integrinas e do recetor CR1.

Tabela 2. Péptidos quimiotáticos

Fator	Célula alvo
C3a	Eosinófilos
C5a	Neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, basófilos
C567	Neutrófilos, eosinófilos
Bb	Neutrófilos
C3e	Promove leucocitose

Outra função importante do complemento é a opsonização. C3b e C4b são opsoninas. Ligam-se de forma covalente à superfície dos microrganismos, marcando-os como estranhos. Por outro

lado, as células fagocitárias expressam o recetor CR1 que se liga aos microrganismos opsonizados, promovendo a fagocitose do tipo II.

Células

Os leucócitos são as células responsáveis pela resposta imune (**Figura 5**). Os linfócitos são responsáveis pela imunidade adaptativa, mas também têm um papel fundamental na imunidade natural, através da produção de citocinas e, também na destruição celular por células assassinas (*natural killers* – NK), que são células citotóxicas não específicas (**Figura 6**)

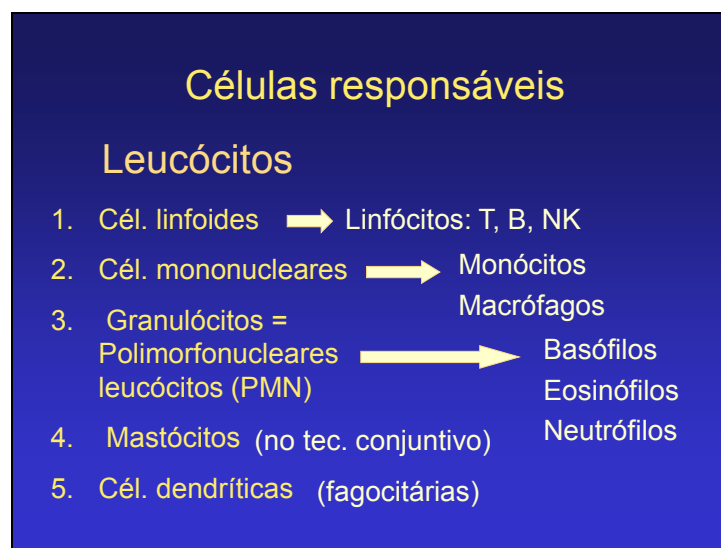


Figura 5. Leucócitos

As células *natural killer* (NK) ou *large granular lymphocytes* (LGL) são morfológicamente semelhantes a linfócitos mas maiores e contêm grânulos citoplasmáticos. Possuem marcadores de superfície CD56 e CD 16 e não CD3. Estas células têm a capacidade de destruir células infectadas por vírus e células tumorais, mas são pouco eficientes. No entanto, se forem ativadas por IL-2 e IFN- γ tornam-se *lymphokine activated killer cells* (LAK) aumentando a capacidade para destruir as células afetadas. Para distinguir as células normais das células alteradas, as NK e as LAK utilizam dois tipos de receptores de superfície, um KAR (*killer activating receptor*) e um KIR (*killer inhibiting receptor*). Quando a célula alvo exibe um KAL (*killer activating ligant*) que é o ligando para o KAR é destruída. No entanto se o KIR também se ligar aos seu ligando, que é a

molécula MHC classe I, a lise da célula é inibida. Portanto se a célula alvo expressar MHC-I não será destruída mesmo que tenha KAL. As células normais expressam MHC-I na sua superfície, mas as células tumorais e as células infectadas por vírus têm a expressão destas moléculas diminuída, assim as NK e as LAK destroem seletivamente as células afetadas.

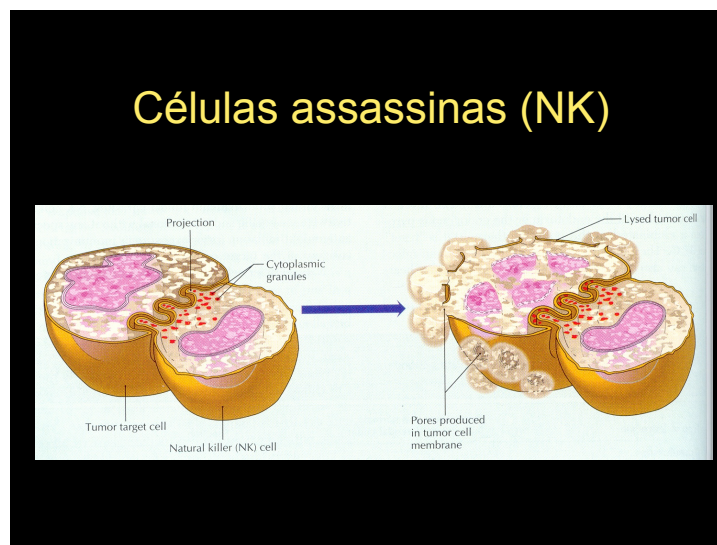


Figura 6. *Natural killers*

Outras células citotóxicas não específicas, as células killer (K) não são um tipo morfológico de células. Estas células são qualquer tipo de célula que tenha a capacidade de mediar a citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC – *antibody-dependent cellular cytotoxicity*). As células K têm na sua superfície receptores para a fração Fc das imunoglobulinas e podem ser NK, LAK, macrófagos, que têm receptores para IgG, e eosinófilos, que têm receptores para IgE. São os anticorpos que ligam e aproximam a célula K da célula alvo de forma a possibilitar a sua destruição.

Efeitos sistêmicos da inflamação

A disseminação através do sangue dos mediadores da inflamação vai provocar efeitos sistêmicos, como a febre, a leucocitose e a liberação de proteínas de fase aguda que, por sua vez, são responsáveis pelos sintomas de doença.

Febre

Quando os PAMPs se ligam a PRR das células sentinela há produção e libertação de IL-1, IL-6, TNF- α , que chegam ao cérebro por 2 vias:

- 1 – IL-1 liga-se a recetores nos neurónios sensitivos (principalmente nervo vago), produzindo o estímulo para o cérebro;
- 2 – citocinas difundem-se pelo sangue até ao cérebro ou são produzidas no cérebro.

Estas citocinas induzem a expressão de cicloxigenase-2 (COX-2) no hipotálamo, responsável pela produção de prostaglandina que vai provocar a elevação do ponto termostático corporal.

A febre aumenta a resposta inflamatória através da estimulação da leucodiapedese de PMN e quimiotaxia, com conseqüente aumento da acumulação de PMNs nos tecidos, da maturação de células dendríticas, da circulação de linfócitos e da sobrevivência de linfócitos T.

Leucocitose

Os IFN tipo 1, libertados nas infeções virais, estimulam a proliferação de células estaminais hematopoiéticas

O TNF- α – também estimula a proliferação de células estaminais hematopoiéticas.

Libertação de proteínas de fase aguda

Cerca de 90 min após o dano e durante 48h, a IL-1, TNF- α e principalmente IL-6 induzem a síntese de novas proteínas pelos hepatócitos (também por linfonodos, amígdalas, baço e leucócitos sanguíneos):

- PRR solúveis
 - proteína C-reativa (PCR) – opsonina, ativa complemento
 - amiloide sérica P (SAP)
 - proteína de ligação ao LPS
- Componentes do complemento
- Moléculas de ligação ao ferro
- Inibidores de proteases (α_1 -antitripsina)
- Outras (amiloide sérica A – SAA, fibrinogénio, ceruloplasmina)

Outras reações de fase aguda

Sonolência – a IL-1 que induz a liberação de moléculas que induzem o sono;

Inapetência – a IL-1 deprime o centro da fome no cérebro;

Perda muscular – as citocinas IL-1, IL-6, TNF- α provocam o catabolismo das proteínas no músculo esquelético;

Perda de peso – o TNF- α causa a inibição de síntese de enzimas necessárias à absorção de lípidos pelos pré-adipócitos e a perda de lípidos pelos adipócitos.

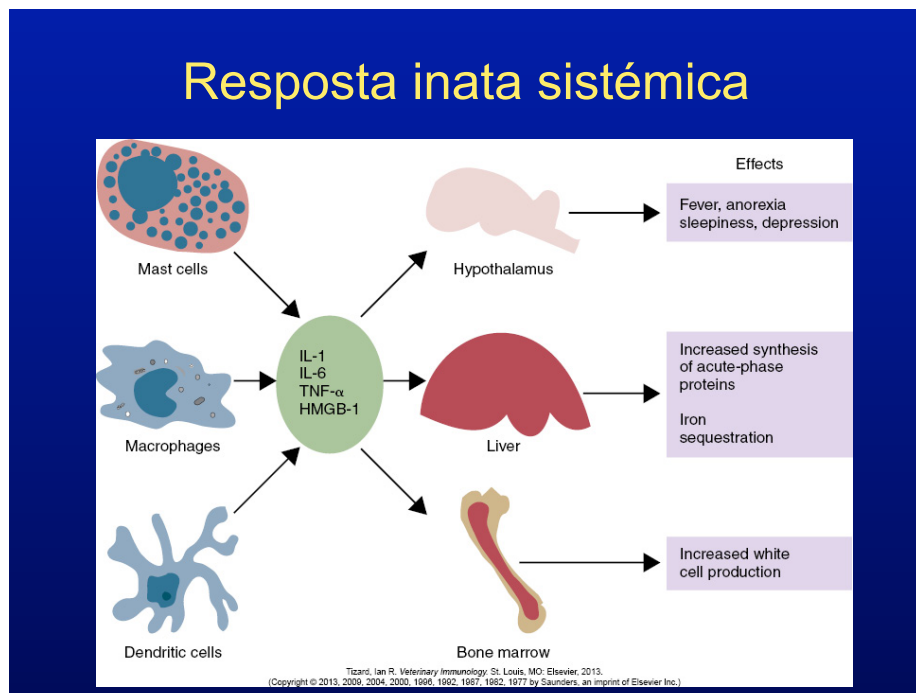


Figura 7. Efeitos sistêmicos da inflamação

Bibliografia

- ✓ Roitt, I.M., Roth, D.E., Male, D.K., Brostoff, J. (2012). Immunology., 8th Edition. Elsevier Publisher.
- ✓ Tizard, I.R. (2017). Veterinary Immunology. 10th Edition. Saunders. ISBN: 978-1-4557-0362-3.
- ✓ Willey, J., Sherwood, L, Woolverton, C. J. (2017). Prescott's Microbiology, 10th edition. WCB – McGraw-Hill Publishers.
- ✓ Zachary, J. (2011) Pathologic Basis of Veterinary Disease, 5th Edition. Editors: M. McGavin, Mosby. eBook ISBN: 978-0-3230-7534-3.