



Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

"Papel das Yops de *Yersinia pseudotuberculosis* na modulação da resposta imune celular durante infecção experimental."

Luis Gustavo Silva Monnazzi

ARARAQUARA

2007



Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

"Papel das Yops de *Yersinia pseudotuberculosis* na modulação da resposta imune celular durante infecção experimental."

Luis Gustavo Silva Monnazzi

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Análises Clínicas, área de Análises Clínicas.

ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. Beatriz Maria Machado de Medeiros

ARARAQUARA

2007

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Monnazzi, Luis Gustavo Silva

M748p Papel das Yops de *Yersinia pseudotuberculosis* na modulação da resposta imune celular durante infecção experimental. / Luis Gustavo Silva Monnazzi. – Araraquara, 2007.
118 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Beatriz Maria Machado de Medeiros

1. *Yersinia pseudotuberculosis* (Yops) 2. Citotoxicidade. 3. Citocinas. 4. NF-kB. I. Medeiros, Beatriz Maria Machado de, orient..II. Título.

CDD: 616.0145

CAPES: 40300005

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Beatriz Maria Machado de Medeiros
(Orientador e Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Leonilda Maria Barbosa dos Santos
(Membro Titular)

Prof^º. Dr^º. Phileo Pinge Filho
(Membro Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Cleni Mara Marzochi Machado
(Membro Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Alexandrina Sartori
(Membro Titular)

Araraquara, novembro de 2007.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Básica, Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP - Araraquara), com apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), através do auxílio à pesquisa (Proc. nº 04/14079-9), e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), através do auxílio à pesquisa (Proc. nº 479860/2004-1) e concessão da bolsa.

*“ Para todas as coisas tenho
força em virtude daquele que
me confere poder”
Filipenses 4:13*

*Aos meus pais, José Carlos e Maria Aparecida,
que por uma vida de dedicação, amor e
trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a
oportunidade de realizar sonhos e conquistas.*

*Aos meus irmãos, Carlos, Marcelo e João Paulo,
exemplos de dignidade, bondade e caráter.*

*Aos meus queridos sobrinhos, Gabriel, Rafael,
Ana Carolina e Giancarlo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

À Prof^a. Dr^a. Beatriz Maria Machado de Medeiros, meu muito obrigado pela amizade, carinho, paciência e orientação ao longo de todos estes anos.

À amiga Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta, não só pela amizade, carinho e auxílio técnico, mas, principalmente, pelo sorriso e bom humor constantes.

À minha querida amiga Prof^a. Dr^a. Ana Rita P. Tumitan pelo exemplo de persistência, determinação, coragem e competência.

Às minhas grandes e inesquecíveis amigas Daniele C. G. Maia, Juliana L. Monteiro, Lílian C. Baeza e Patrícia F. Andreotti, por fazerem parte, sem dúvida alguma, dos melhores momentos desta jornada.

Aos amigos Adolfo C. Barreto, Ana Carolina Malaspina, Carolina F. Barbosa, Elisabeth E. Aoki, Gabriela M. P. A. Camargo e José Mário L. Maia pelo carinho, amizade, presença e apoio.

Aos colegas de laboratório Aline Tansine, Fabrício R. Ghiraldi, Gabriela D. Passerine, Jerusa G. Magro, Larissa M. Zenatti, Orivaldo P. Ramos e Sílvia E. S. de C. Pinto, pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivência.

À Prof^a. Dr^a. Alexandrina Sartori (ICB-UNESP-Botucatu) e ao Prof^o. Dr^o. Paulo Ignácio da Costa (FCF-UNESP-Araraquara) que, como membros da banca de qualificação, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

Ao Profº Drº Luiz Carlos Spolidório (Odontologia-UNESP-Araraquara) pela colaboração na análise histológica.

Ao Profº. Drº. Sandro R. Valentini, que permitiu o uso de equipamentos indispensáveis à realização deste trabalho.

À Fabiana R. de Moraes (FCF-USP-Ribeirão Preto), pelo carinho e prontidão com que sempre me auxiliou no manuseio do citômetro de fluxo e nas análises dos resultados de citometria.

Ao Profº. Drº. Hans Wolf-Watz, da Universidade de Umea (Suécia), pelas amostras bacterianas cedidas.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FCF-UNESP (Araraquara), Cláudia, Laura e Sônia, pela atenção, carinho e paciência.

Às bibliotecárias, Irani e Natalina, da FCF-UNESP (Araraquara) pela colaboração durante a pesquisa e revisão bibliográfica.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

I – INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	22
II - OBJETIVOS	33
III – MATERIAIS E MÉTODOS	34
1 - Fluxograma de trabalho	34
2 – Animais de experimentação	35
3 - Amostras bacterianas	35
4 - Infecção experimental dos animais com as amostras de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YpIII	35
4.1 - Reativação das amostras de <i>Yersinia</i>	35
4.2 - Determinação da dose infectante	36
4.3 - Preparo do inóculo	36
4.4 - Esquema de infecção	37
5 - Cinética de Infecção	37
6 - Análise histológica de cortes de baço e fígado de animais infectados com a amostra selvagem	37
7 - Quantificação das subpopulações de linfócitos T e determinação do padrão de citocinas Th1 e Th2 através do método de citometria de fluxo	38
7.1 - Obtenção das células esplênicas	38
7.2 - Viabilidade das células esplênicas	38
7.3 - Análise fenotípica dos linfócitos esplênicos	38
7.4 - Detecção intracelular das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, INF-γ, TNF-α e TGF-β	39

8 - Determinação da ativação de NF-κB nos linfócitos esplênicos	40
8.1 - Obtenção do extrato nuclear	41
8.2 - Ensaio de ativação do fator de transcrição NF-κB	41
9 - Avaliação da atividade citotóxica dos linfócitos esplênicos	42
9.1 - Obtenção das células do exsudato peritoneal	42
9.2 - Infecção dos macrófagos “in vitro”	42
9.3 - Obtenção dos linfócitos T CD8	43
9.4 - Ensaio de Citotoxicidade	43
10 - Análise Estatística	44
IV – RESULTADOS	45
1 – Determinação da dose infectante para as amostras de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	45
2 – Determinação da cinética de infecção no baço e fígado	47
3 – Verificação do peso do baço e do fígado no decorrer da cinética de infecção	51
4 - Alterações patológicas macroscópicas no fígado e no baço	54
5 - Análise histológica do baço e fígado	55
6 - Análise fenotípica das subpopulações de linfócitos T esplênicos	58
7 – Detecção intracelular das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e TGF-β	62
8 – Avaliação da ativação do fator nuclear κB (NF- κB) nos linfócitos esplênicos	75
9 - Avaliação da atividade citotóxica dos LT-CD8	77
V - DISCUSSÃO	79
VI - CONCLUSÕES	98
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
VIII - APÊNDICE	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	-	Micrograma
μL	-	Microlitro
BAB	-	“Blood Agar Base” (Agar base de sangue)
BOD	-	Demanda bioquímica de oxigênio
BSA	-	Albumina bovina
CD	-	“Cluster of Differentiation” (Grupo de diferenciação)
CO_2	-	Dióxido de Carbono
DL_{50}	-	Dose Letal mediana
D.O.	-	Densidade óptica
DTT	-	Ditiotreitól
EDTA	-	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	-	“Ethylenebis (oxyethylene-nitrilo) tetraacetic acid”
ELISA	-	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
FITC	-	Isotiocianato de fluoresceína
g	-	Grama
g	-	Força gravitacional
GAP	-	Proteínas ativadoras de GTPases
GTP	-	Guanosina trifosfato
H_2SO_4	-	Ácido Sulfúrico
Hepes	-	“N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid”
HKY	-	Antígeno da <i>Yersinia</i> morta pelo calor
HRP	-	“Horseradish peroxidase”
IFN- γ	-	Interferon-gama
IL	-	Interleucina
kb	-	Quilobase
KCl	-	Cloreto de potássio
kDa	-	Quilodalton
L	-	Litro
LDH	-	Lactato desidrogenase
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LT	-	Linfócito T

MAPKs	-	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MHC	-	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
MOI	-	Multiplicidade de infecção
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
NF- κ B	-	Fator Nuclear kappa B
NK	-	“Natural Killer”
NO	-	Óxido Nítrico
°C	-	Graus Centígrados
PBS	-	Solução tampão salina-fosfato
PE	-	Ficoeritrina
pi	-	Pós-infecção
pg	-	Picogramas
PMA	-	Forbol-miristato-acetato
PMSF	-	“Penhylmethylsulfonyl fluoride”
SD	-	Desvio padrão
SPRD	-	“Spectral red”
TCR	-	Receptor de células T
TGF- β	-	“Transforming Growth Factor β ”
TNF- α	-	Fator de Necrose Tumoral
TSB	-	“Tryptic Soy Broth”
TTSS	-	Sistema de secreção do tipo três
UFC	-	Unidade formadora de colônia
WT	-	“Wild Type” (tipo selvagem)
Yops	-	Proteínas de membrana externa de <i>Yersinia</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo dos mecanismos de ação das principais Yops efetoras, dentro da célula do hospedeiro.....23

Figura 2 - Cinética de infecção no baço (A) e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados pela via intravenosa com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. No 2^o, 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia pós-infecção os animais foram sacrificados, o baço e o fígado foram retirados, homogeneizados em salina 0,85% e alíquotas de 0,1 mL, de duas diluições seriadas (1/10 e 1/100), foram semeadas em placas de BAB. Após 48 h de incubação a 26°C, o número de UFC por órgão foi determinado. Os valores apresentados correspondem às médias de 4 animais por dia. O desvio padrão foi sempre menor que 25% dos valores observados.....49

Figura 3 - Peso do baço (A) e fígado (B) de camundongos BALB/c no 2^o, 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia pós-infecção pela via intravenosa com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Os animais foram sacrificados, o baço e o fígado foram retirados, homogeneizados em salina 0,85% e alíquotas de 0,1 mL, de duas diluições seriadas (1/10 e 1/100), foram semeadas em placas de BAB. Após 48 h de incubação a 26°C, o número de UFC por órgão foi determinado. Os valores apresentados correspondem às médias dos pesos (em gramas) de, no mínimo, 4 animais por dia \pm SD..... 52

Figura 4 - Análise histológica de baço após infecção intravenosa com amostra selvagem (WT) de *Y. pseudotuberculosis*. Os órgãos foram retirados de camundongos BALB/c infectados e não infectados no 14^o dia pós-infecção. Os cortes (5 μ m) foram corados com hematoxilina e eosina (HE). As figuras mostradas representam os aumentos de 100x (A e B), 200x (C e D) e 400x (E e F).....56

Figura 5 - Análise histológica de fígado após infecção intravenosa com amostra selvagem (WT) de *Y. pseudotuberculosis*. Os órgãos foram retirados de camundongos BALB/c infectados e não infectados no 14^o dia pós-infecção. Os cortes (5 μ m) foram corados com hematoxilina e eosina (HE). As figuras mostradas representam os aumentos de 100x (A e B), 200x (C e D) e 400x (E e F).....57

Figura 6 - Quantificação das subpopulações de linfócitos T (LT) durante infecção com as amostras WT, YopE⁻, YopH, YopM e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Camundongos BALB/c foram sacrificados no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia após a infecção e os LT esplênicos e suas subpopulações quantificadas através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados apresentados correspondem às médias \pm SD do número absoluto de linfócitos ($\times 10^6$) por baço (n = 6 animais por dia).....60

Figura 7 - Cinética da produção de citocinas pelos LT-CD4 esplênicos após infecção intravenosa com as amostras WT, YopE⁻, YopH, YopM e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Camundongos BALB/c foram sacrificados no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia após a infecção e as citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β detectadas e quantificadas intracelularmente através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) \pm SD obtidas com os linfócitos estimulados em cultura com PMA + Ionomicina (n = 6 animais por dia).....65

Figura 8 - Cinética da produção de citocinas pelos LT-CD8 esplênicos após infecção intravenosa com as amostras WT, YopE⁻, YopH, YopM e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Camundongos BALB/c foram sacrificados no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia após a infecção e as citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β detectadas e quantificadas intracelularmente através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) \pm SD obtidas com os linfócitos estimulados em cultura com PMA + Ionomicina (n = 6 animais por dia).....66

Figura 9 - Histogramas representativos dos aumentos mais significativos na produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ pelos LT-CD8, em relação aos animais controles, durante infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os valores apresentados nos quadrantes dos histogramas correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de seis animais por dia.....67

Figura 10 - Histogramas representativos dos aumentos mais significativos na produção das citocinas TNF- α e TGF- β pelos LT-CD8, em relação aos animais controles, durante infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os valores apresentados nos quadrantes dos histogramas correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de seis animais por dia.....68

Figura 11 – Influência da infecção com a amostra selvagem (WT), com a amostra curada do plasmídeo de virulência e com as amostras mutantes YopJ⁻, YopE⁻, YopH⁻ e YopM⁻ de *Y. pseudotuberculosis* na ativação do fator de transcrição nuclear κ B. Quatro grupos de seis camundongos BALB/c foram infectados via intravenosa com as amostras acima citadas. Extratos nucleares dos linfócitos destes animais foram obtidos no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dias após a infecção com as respectivas amostras e o estado de ativação do NF- κ B foi avaliado usando-se o kit TransAM. Os resultados mostrados representam as médias de dois experimentos feitos em triplicata \pm desvio padrão.....76

Figura 12 - Ensaio de citotoxicidade: LT-CD8 esplênicos foram obtidos de camundongos BALB/c no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia pós-infecção intravenosa com a amostra selvagem (WT), com a curada do plasmídeo de virulência (YpIII) e com as amostras mutantes de *Y. pseudotuberculosis*. Os LT-CD8 (10⁶ células) foram cocultivados por 4 horas com os macrófagos (10⁵ células) infectados com a amostra WT (MOI de 10). A citotoxicidade foi determinada através da detecção da enzima LDH no sobrenadante da cocultura usando o kit CytoTox 96 (Promega). Camundongos não infectados serviram como controles. Para cada dia do experimento foram usados “pools” de LT-CD8 obtidos de três animais. Os resultados representam a média de dois ensaios feitos em triplicata.....78

Figura 13 – Esquema representativo dos parâmetros avaliados no presente trabalho, dos respectivos resultados obtidos e das principais Yops envolvidas em cada uma das alterações decorrentes da infecção intravenosa de camundongos BALB/c com *Y. pseudotuberculosis*.....97

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Descrição resumida dos mecanismos moleculares e respectivos efeitos celulares das Yops efectoras.....27
- Tabela 2** - Doses das amostras bacterianas usadas para infecção dos lotes experimentais.....46
- Tabela 3** – Número de UFC (log) no baço e fígado dos animais no decorrer da infecção com a amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis*, as respectivas mutantes e a amostra curada do plasmídeo de virulência (valores representam médias \pm SD de 4 animais por dia).....50
- Tabela 4** – Peso, em gramas, do baço e do fígado dos animais durante a cinética de infecção (valores representam médias de, no mínimo, 4 animais por dia \pm desvio padrão).....53
- Tabela 5** - Número absoluto de linfócitos T e das subpopulações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, por baço, no decorrer da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* (os valores mostrados representam médias \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia).....61
- Tabela 6** - Detecção intracelular da citocina IL-2 nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia.....69
- Tabela 7** - Detecção intracelular da citocina IL-4 nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia.....70
- Tabela 8** - Detecção intracelular da citocina IL-10 nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia.....71

Tabela 9 - Detecção intracelular da citocina IFN- γ nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia.....72

Tabela 10 - Detecção intracelular da citocina TNF- α nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia.....73

Tabela 11 - Detecção intracelular da citocina TGF- β nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia.....74

Tabela 12 – Valores de citotoxicidade (%) apresentados pelos linfócitos T CD8⁺ obtidos de animais infectados com a amostra selvagem, com a amostra curada do plasmídeo de virulência e com as mutantes de *Y. pseudotuberculosis*, nos diferentes dias após a infecção.....78

RESUMO:

As três espécies patogênicas do gênero *Yersinia*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, compartilham um tropismo pelos tecidos linfóides e um plasmídeo de 70-kb que é essencial para a virulência. O plasmídeo codifica um sistema de secreção do tipo III e proteínas efetoras chamadas Yops (*Yersinia* outer proteins). Este sistema de secreção é responsável por translocar as Yops para dentro das células do hospedeiro, onde elas interagem com alvos específicos e alteram as funções destas células. As Yops são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro, permitindo à bactéria se replicar extracelularmente nos tecidos e órgãos linfóides. Embora haja muita informação sobre os mecanismos usados pela *Yersinia* para evadir do sistema imune inato de defesa, pouco se sabe sobre como ela afeta a resposta imune adaptativa *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência das Yops E, H e M, translocadas pela *Y. pseudotuberculosis*, na colonização e persistência da bactéria no baço e fígado dos animais infectados, nas quantidades de LT-CD4 e LT-CD8 durante a infecção e na produção das principais citocinas Th1 e Th2 por estas subpopulações de linfócitos. Além disso, foi verificado o papel destas Yops sobre a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e sobre a atividade citotóxica dos LT-CD8. Para isso, camundongos BALB/c fêmeas foram infectados intravenosamente com a amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis* (WT), ou com amostras mutantes incapazes de secretar as Yops E, H e M (YopE⁻, YopH⁻ e YopM⁻), ou ainda com a amostra curada do plasmídeo de virulência (YpIII). No 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia pós-infecção (pi), os animais foram sacrificados e as células esplênicas foram obtidas de camundongos infectados e de camundongos não infectados (grupo controle). Os níveis de colonização no baço e no fígado foram determinados por contagem do número de unidades formadoras de colônias. Tanto a análise fenotípica quanto a detecção intracelular das citocinas foi feita por citometria de fluxo. A ativação do NF- κ B foi medida por ELISA e a citotoxicidade dos LT-CD8 foi determinada espectrofotometricamente por análise enzimática da liberação da lactato desidrogenase. Embora todas as amostras tenham sido eficientes na colonização do baço e do fígado, a amostra YopH⁻ foi mais rapidamente eliminada dos mesmos. A população de LT esplênicos diminuiu durante a infecção com todas as amostras estudadas, exceto durante a infecção com a amostra YopH⁻, quando pudemos observar um aumento no número de ambas subpopulações de LT, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. Constatamos também que YopE atua sinergicamente com a YopH na diminuição das quantidades de LT durante a infecção, uma vez que os menores valores foram observados quando ambas estavam presentes. As Yops E, H e M suprimiram a produção das citocinas pelos LT-CD4 e mantiveram a produção pelos LT-CD8 em níveis basais. Nós não pudemos atribuir a

exatamente uma Yop o papel supressor sobre a produção de citocinas pelos LT-CD4, mas, ao contrário, pudemos perceber as funções redundantes que elas apresentam e como isto mantém a bactéria virulenta e apta a sobreviver dentro do hospedeiro. Por outro lado, a produção de citocinas pelos LT-CD8 foi mais evidentemente influenciada pela presença da YopH. Todas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* inibiram a ativação do NF- κ B e, mais uma vez, as Yops E e H parecem ter papéis importantes nesta inibição. A infecção com a amostra YopH⁻ apresentou os maiores valores de citotoxicidade no 5º dia pi (cerca de 4 vezes maior do que a amostra WT), o que conferiu à YopH um provável papel inibidor da atividade citotóxica dos LT-CD8. Os resultados apresentados pela amostra YpIII deixaram clara a influência de fatores de virulência não plasmideais em muitos resultados obtidos. De uma forma geral, os resultados apontaram a YopH de *Y. pseudotuberculosis* como o fator de virulência mais importante entre as Yops E, H e M, e que exerce os papéis mais relevantes na modulação da resposta imune celular após infecção intravenosa de camundongos BALB/c.

Palavras-chaves: *Yersinia pseudotuberculosis*, Yops, citotoxicidade, citocinas Th1 e Th2, NF- κ B.

ABSTRACT:

The three pathogenic species of the genus *Yersinia*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*, share a tropism for lymphoid tissues and a 70-kb plasmid essential for virulence. The plasmid encodes a type III secretion system and effector proteins called Yops (*Yersinia* outer proteins). This secretion system is responsible for translocating the Yops into the host cells, where they interact with specific host targets and alter the functions of these cells. Yops are able to modulate the host immune defenses allowing the bacteria to replicate extracellularly in lymphoid tissues and organs. Although there is ample information on the mechanisms used by *Yersinia* to evade the innate immune system, very little is known about how it affects the adaptive immune response *in vivo*. The aim of this research was to analyze the influence of translocated Yops E, H and M of *Y. pseudotuberculosis* on the colonization and persistence of the bacterium in the spleen and liver of infected animals, on the quantities of CD4 and CD8 T cells during the infection and on the production of the main Th1 and Th2 cytokines by these lymphocyte subpopulations. In addition, it was verified the role of these same Yops on the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) and on the CD8 T cells cytotoxic activity. To this end, female BALB/c mice were infected intravenously with the wild type *Y. pseudotuberculosis* (WT), or with the mutant strains unable to secrete the Yops E, H and M (YopE⁻, YopH⁻ and YopM⁻) or with the plasmid-cured strain (YpIII). On the 5th, 7th, 14th and 21st days post-infection (pi), the animals were sacrificed and the spleen cells were isolated from infected and uninfected mice (control group). The levels of colonization in the spleen and liver were determined by counting the number of colony-forming units. Both the phenotypic analysis of lymphocytes and the intracellular detection of cytokines were measured by flow cytometry. The NF- κ B activation was measured by NF- κ B ELISA and the CD8 T cells cytotoxicity was determined spectrophotometrically by assaying the lactate dehydrogenase released. Although all the strains had been efficient in the colonization of spleen and liver, the YopH⁻ strain was more rapidly eliminated from both. The splenic T-cell population decreased during the infection with all studied strains except during the infection with the YopH⁻ mutant strain, when we could observe a rise in the number of both T-cell subpopulations, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺. We also find that YopE acts synergically with YopH in decreasing the number of T cells during the infection, since the smallest values were observed when both were present. The Yops E, H and M suppressed the cytokine production by the CD4 T cells, but maintained its production by the CD8 T cells at background levels. We could not ascribe to exactly one of these Yops the suppressive role on cytokine production by CD4 T cells but, on the contrary, we perceived a

redundancy in their roles and how this keeps the bacterium virulent and able to survive inside the host. On the other hand, the production of cytokines by the CD8 T cells was more prominently influenced by the presence of YopH. All the different strains of *Y. pseudotuberculosis* inhibited the NF- κ B activation and, once again, Yops E and H seem to have important roles in this inhibition. The infection with YopH⁻ mutant strain exhibited the greatest values of cytotoxicity on the 5th day pi (about 4-fold higher than WT), which confers on the YopH a probable role as inhibitor of the CD8 T cell cytotoxic activity. Many of results with strain YpIII made clear the influence of non-plasmidial virulence factors. Taken together, the results point to YopH of *Y. pseudotuberculosis* as the most important virulence factor, among the Yops E, H and M, and it exerts the most relevant role in the modulation of cellular immune response to intravenous infection of BALB/c mice.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, Yops, cytotoxicity, Th1 and Th2 cytokines, NF- κ B.

I – INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O gênero *Yersinia* compreende três espécies patogênicas para humanos: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Embora existam diferenças no modo de entrada no hospedeiro e na gravidade das doenças causadas, todas estas espécies de *Yersinia* apresentam um tropismo pelo tecido linfóide (podendo se disseminar via corrente sanguínea) e uma notável capacidade de resistir à resposta imune inata do hospedeiro. Vários dias após a infecção de roedores por via oral, a bactéria *Yersinia* é encontrada nos linfonodos mesentéricos e, subsequentemente, no baço e fígado (CORNELIS et al., 1998).

Y. enterocolitica e *Y. pseudotuberculosis* são capazes de se multiplicar no meio ambiente e quando introduzidas no homem podem causar várias doenças gastrintestinais, desde enterite até linfadenite mesentérica. A infecção geralmente se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados (BOTTONÉ, 1997). No intestino delgado, a bactéria invade a barreira intestinal passando através das células M, que são células especializadas do epitélio associado aos folículos e cuja função é capturar antígenos. Após a invasão do epitélio intestinal, a bactéria se replica dentro das placas de Peyer e também se espalha para os linfonodos mesentéricos, provocando linfadenite mesentérica, um evento característico da infecção intestinal por *Yersinia* (FALKOW et al., 1992). Barnes et al. (2006) mostraram que a colonização do baço e do fígado de animais infectados com *Y. pseudotuberculosis* independe de replicação prévia da bactéria nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos. Todas as três espécies patogênicas de *Yersinia* possuem um plasmídeo de virulência de 70-kb, altamente homólogo, chamado pIB1 em *Y. pseudotuberculosis*, pYV em *Y. enterocolitica* e pCD1 em *Y. pestis* (PORTNOY et al., 1981). Estes plasmídeos constituem fatores de virulência essenciais à bactéria, uma vez que codificam proteínas estruturais (“Yop secretion” - Ysc), reguladoras (“Low calcium response” - Lcr) e efetoras (“Yersinia outer proteins” - Yops) de um sistema de secreção do tipo III (TTSS). Este sistema de secreção permite à *Yersinia* secretar e translocar as Yops para dentro das células do hospedeiro (CORNELIS, 2002). Graças à ação das Yops, *Yersinia* spp pode residir extracelularmente nos tecidos infectados e resistir à eliminação pelo sistema imune, quer pela indução de apoptose nas células de defesa do hospedeiro, quer pela inibição de respostas pró-inflamatórias ou até mesmo da fagocitose (CORNELIS, 2002; JURIS et al., 2002; MONACK et al., 1997; SCHESSER et al., 1998; GROSDENT et al., 2002; PALMER et al., 1998).

Enquanto algumas Yops são efetoras intracelulares outras, como a YopB e a YopD, são secretadas no meio extracelular e têm como função translocar as efetoras para o interior das

células eucarióticas. Pelo menos seis proteínas efetoras seriam ativas na célula do hospedeiro: YopH, YopE, YopJ, YpkA, YopM e YopT. Os efeitos destas Yops foram estudados inicialmente em macrófagos e linhagens de células epiteliais (CORNELIS & WOLF-WATZ, 1997; CORNELIS et al., 1998). Quando a bactéria estabelece contato com macrófagos, a maquinaria tipo III injeta alguns desses fatores de virulência dentro do citosol da célula alvo, abolindo o processo de fagocitose e induzindo apoptose nos mesmos (ROSQVIST et al., 1991; PERSSON et al., 1997; LEE et al., 2001) (Figura 1). Estudos mais recentes propõem a existência de um mecanismo de patogenicidade conservado no gênero *Yersinia*, importante nos estágios iniciais do processo infeccioso, que consiste numa fase de sobrevivência dentro dos macrófagos, onde a bactéria consegue alterar as funções antibacterianas destas células (PUJOL & BLISKA, 2005).

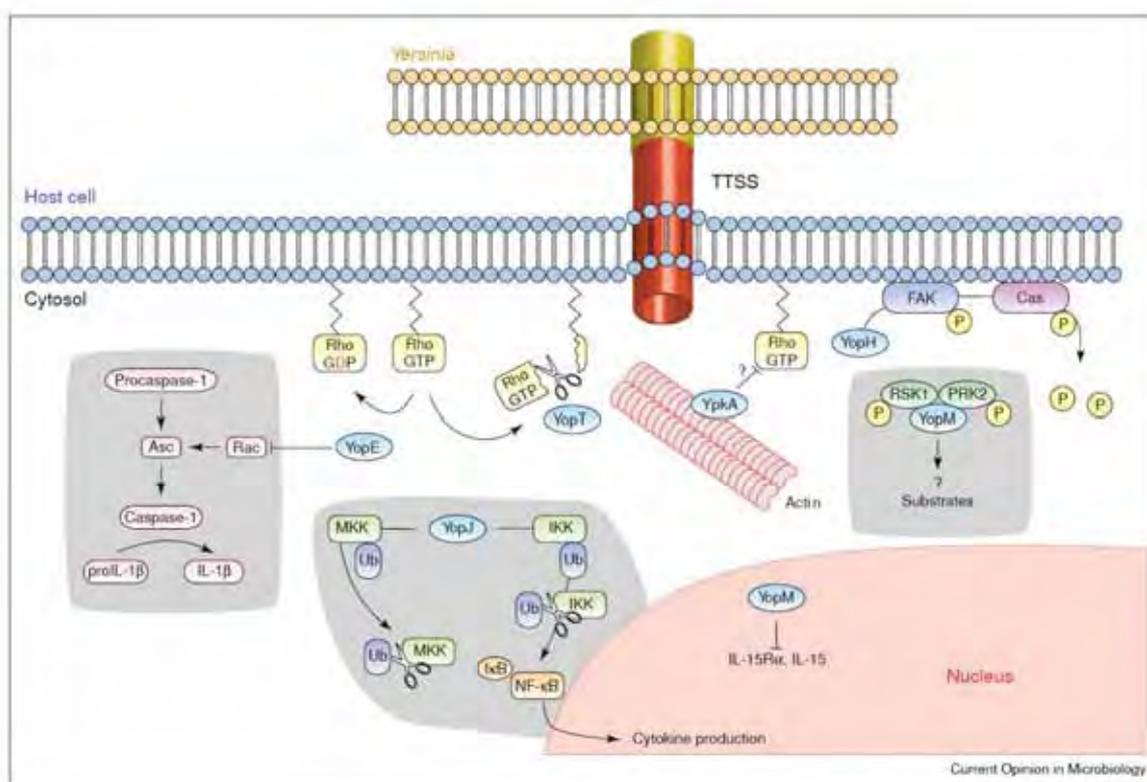


Figura 1 - Esquema representativo dos mecanismos de ação das principais Yops efetoras, dentro da célula do hospedeiro. (Fonte: NAVARRO et al., 2005)

A atividade da YopE, uma proteína de 25 kDa, está associada com despolicimerização do citoesqueleto da célula do hospedeiro, prevenindo assim a ingestão da bactéria (ROSQVIST et al., 1991), uma vez que a fagocitose é um processo citoesqueleto-dependente. A YopE é um determinante de virulência essencial que contém um domínio efetor carbóxi-terminal (SORY et al., 1995; SCHESSER et al., 1996) o qual compartilha um alto grau de similaridade com o domínio amino-terminal da exoenzima S (ExoS) de *Pseudomonas aeruginosa* e SptP de

Salmonella typhimurium. Foi demonstrado que YopE e ExoS possuem atividade GAP (Proteínas Ativadoras de GTP-ases) sobre as GTP-ases da família Rho (RhoA, Rac e Cdc42) *in vitro*, e que esta atividade GAP é essencial para a citotoxicidade mediada pela YopE (GOEHRING et al., 1999; BLACK & BLISKA, 2000; Von PAWELL-RAMMINGEN et al., 2000). Estudos mais recentes apontaram um novo papel para a YopE na modulação da resposta inflamatória durante infecção de macrófagos *in vitro*; demonstrou-se o envolvimento de Rho GTPases, em particular Rac1, na regulação da ativação da caspase-1 (SCHOTTE et al., 2004).

As funções de YopT (35,5 kDa) ainda não são muito claras, o que é bastante compreensível, considerando que ela foi descoberta há menos tempo que as demais (CORNELIS, 2002). Esta maior demora na descoberta da YopT se deve, provavelmente, ao fato dela não ser expressa pelo sorotipo O:3 de *Y. pseudotuberculosis*, que é uma cepa muito usada na pesquisa com *Yersinia*. (VIBOUD & BLISKA, 2005). No entanto, tem sido demonstrado que as funções da YopT muito se assemelham às da YopE (IRIARTE & CORNELIS, 1998), embora seja secretada em quantidades bem menores que esta. A YopE e a YopT podem afetar diferentes vias de sinalização a fim de potencializar o efeito citotóxico da bactéria e assegurar a sobrevivência do patógeno no tecido linfóide (JURIS et al., 2002). Shao et al. (2002), identificaram a YopT como um membro da nova família das cisteína-proteases que contêm resíduos invariantes de Cys, His e Asp. Além disso, eles demonstraram que a YopT cliva as Rho GTPases próximo à região carbóxi-terminal, liberando-as da membrana. Em um outro estudo, eles mostraram que a YopT cliva as Rho GTPases RhoA, Rac e Cdc42 diretamente na cisteína da porção C-terminal (SHAO et al., 2003).

A YopH é uma tirosina fosfatase com 51 kDa que desfosforiliza p130^{Cas}, p125^{FAK}, paxilina e a proteína ligante de Fyn (FBP), todas elas proteínas tirosina-fosforiladas encontradas nos complexos de adesão focal (FA). A atividade de YopH parece causar a desunião de FA, o que diminui a entrada da bactéria nas células HeLa ou sua fagocitose pelos macrófagos (BLACK & BLISKA, 1997; PERSSON et al., 1997; BLACK et al., 1998; HAMID et al., 1999), e também inibe o “burst” oxidativo. Além disso, YopH pode funcionar cooperativamente com YopE na inibição da fagocitose por neutrófilos (RUCKDESCHEL et al., 1996). Sauvonnet et al. (2002a) evidenciaram a atuação da YopH na inativação da via do fosfatidilinositol-3 quinase, com conseqüente supressão, nos macrófagos, da expressão da proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) e da proliferação de células T. A descoberta do efeito supressor sobre os linfócitos T e B, atribuído à YopH (YAO et al., 1999), vem dando margem a uma série de pesquisas. Recentemente foram apontados os alvos através dos quais a proteína fosfatase YopH atua sobre os linfócitos T. Alonso et al. (2004), mostraram que a YopH inibe a sinalização pelo TCR,

uma vez que promove a desfosforilação de Lck na posição Tyr-394 e, conseqüentemente, paralisa as células T, prevenindo o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa.

A YpkA (“*Yersinia* protein kinase A”) é outra Yop com 81 kDa, que mostra extensa homologia com proteínas eucarióticas, mais propriamente com a família PSK das proteínas serina/treonina quinases. Ela se autofosforila e, assim como a Yop H, interfere com a transdução de sinais nas células do hospedeiro por interferir com os níveis celulares de fosforilação (GALIOV et al., 1993; HAKANSSON et al., 1996; HARTLAND & ROBINS-BROWNE, 1998). Dentro das células, YpkA se posiciona na superfície interna da membrana plasmática (HAKANSSON et al., 1996). Juris et al. (2000) relataram que a YpkA é inicialmente produzida como uma quinase inativa, que é posteriormente ativada pela actina, durante a translocação para dentro da célula do hospedeiro. A interação entre YpkA e actina sugere que mudanças morfológicas induzidas pela YpkA poderiam ser causadas por alterações no citoesqueleto de actina (JURIS et al., 2000), e que o rompimento deste se deve à ação da YpkA sobre a pequena GTPase RhoA, a qual desempenha um importante papel na dinâmica da actina dentro das células (BARZ et al., 2000; DUKUZUMUREMYI et al., 2000). Embora a actina possa ser fosforilada *in vitro* (JURIS et al., 2000), seu substrato *in vivo* não é conhecido. Através dessa habilidade em romper o citoesqueleto de actina, YpkA pode prejudicar a fagocitose da *Yersinia* por macrófagos e também a movimentação dessas células às áreas de infecção (JURIS et al., 2002). Um estudo recente revelou que a YpkA pode afetar o citoesqueleto através de mecanismos tanto dependentes como independentes de sua atividade quinase (WILEY et al., 2006). Há evidências de que a YpkA é capaz de induzir anergia em macrófagos, e que desta forma suprime a fagocitose e favorece a sobrevivência da *Yersinia* (JURIS et al., 2006).

Essas Yops, ao dificultarem ou mesmo inibirem a fagocitose da bactéria, fornecem à mesma tempo suficiente para se replicar no organismo do hospedeiro (Tabela 1).

A proteína YopM (41 kDa) possui uma função enigmática até o momento. Ela consiste quase inteiramente de seqüências semelhantes às repetições ricas em leucinas (LRRs) (EVDOKIMOV et al., 2001) e tem se mostrado essencial para a virulência em modelos murinos de infecção (LEUNG et al., 1990). Ela se liga tanto à trombina quanto ao fator de von Willebrand, mas essas propriedades são dispensáveis para a virulência (HINES et al., 2001). Acredita-se que o domínio LRR seja um motivo funcional de interação entre proteínas numa variedade de vias de sinalização no interior da célula e também no meio extracelular, e exatamente esta diversidade tem dificultado a descoberta da via exata que a YopM poderia afetar (JURIS et al., 2002). Estudos têm demonstrado que a YopM não é apenas translocada dentro das células HeLa durante infecção com *Yersinia*, mas também se localiza no núcleo dessas células,

trafegando através de uma via associada a vesículas (SKRZYPEK et al., 1998). Foi constatado que a YopM se liga e promove a atividade quinase da proteína quinase C2-like e da proteína quinase-1 ribossomal S6 (McDONALD et al., 2003), o que poderia explicar o efeito da YopM sobre a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e crescimento celular (SAUVONNET et al., 2002b). A YopM pode ter muitos efeitos patogênicos, e um deles pode ocorrer no núcleo, modulando a expressão gênica do hospedeiro em benefício do patógeno (SKRZYPEK et al., 2003).

A YopJ (32,5 kDa) é a Yop efetora que possui funções antiinflamatórias mais importantes além de ser responsável pela indução de apoptose em macrófagos *in vitro* e *in vivo* (MILLS et al., 1997; MONACK et al., 1997; MONACK et al., 1998). Após a indução transitória de múltiplas vias de sinalização (MAPK e NF- κ B) pelo lipopolissacarídeo (LPS), a infecção por *Yersinia* resulta numa severa inibição das vias MAPK (Erk, JNK e p38) nos macrófagos (RUCKDESCHEL et al., 1997) e também num bloqueio da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), através da inibição da degradação do I κ B e subsequente translocação do NF- κ B em macrófagos e células epiteliais. Estudos sobre as possíveis funções da YopJ têm sugerido, também, que a mesma seja capaz de inibir a produção de citocinas como TNF- α e IL-8, graças à presença de um domínio SH2-like, que constitui uma característica comum de muitas proteínas sinalizadoras eucarióticas (SCHESSER et al., 1998; BOLAND & CORNELIS, 1998; PALMER et al., 1998). Considerando que os promotores do TNF- α e da IL-8 possuem sítios de ligação para o NF- κ B e AP-1 (ROEBUCK, 1999; LIU et al., 2000), e que os sinais MAPK e NF- κ B convergem para os fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, a inibição da produção de citocinas é provavelmente resultado do rompimento da ativação da MAPK e NF- κ B (JURIS et al., 2002). A apoptose de macrófagos causada pela YopJ, muito provavelmente, também resulta da inativação do NF- κ B (PAGLIARI et al., 2000). Artigos de Orth et al. (2000) revelaram que a YopJ pode funcionar como uma cisteína protease. Esses autores também sugerem que a YopJ possa ser uma protease ubiquitina-like, a qual tem sido recentemente envolvida na modulação de várias vias de sinalização de células eucarióticas (YEH et al., 2000). A sugestão de que a YopJ possa inibir a sinalização por remover proteínas ubiquitina-like dá uma nova perspectiva no que diz respeito aos mecanismos de patogenicidade da *Yersinia* e vias de sinalização das células eucarióticas (JURIS et al., 2002).

Tabela 1 - Descrição resumida dos mecanismos moleculares e respectivos efeitos celulares das Yops efetoras:

Yop	Mecanismo molecular	Efeito celular
YopE	Proteína ativadora de GTPases (GAP): induz hidrólise do GTP das RhoGTPases (RhoA, Rac1, Cdc42).	Rompimento do citoesqueleto de actina e prevenção da produção de IL-1 β através da inibição da Rac1.
YopT	Cisteína protease: cliva as RhoGTPases (RhoA, Rac1, Cdc42) em suas porções C-terminais, liberando-as da membrana celular. Inibe irreversivelmente a sinalização pela família Rho.	Rompimento do citoesqueleto de actina.
YopH	Proteína fosfatase (PTPase): desfosforila FAK, p130Cas, paxilina, FBP, SKAP-HOM. Inibe a via PI3K/Akt e interfere com a produção de MCP-1.	Rompimento do complexo de adesão focal e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias.
YpkA /YopO	Serina/Treonina quinase: alvo intracelular desconhecido. Ativada pela actina celular. Sua porção C-terminal interage com RhoA e Rac1.	Rompimento do citoesqueleto de actina.
YopM	Proteína constituída por repetições ricas em leucinas (LRR): se localiza no núcleo, forma complexos com RSK1 e PRK2 (substratos desconhecidos) e diminui os níveis de produção de IL-15 e IL-15R α .	Depleção de células NK.
YopJ / YopP	Cisteína protease: rompe as vias MKK e NF- κ B.	Inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e indução de apoptose em macrófagos infectados.

A resposta imune adaptativa, com a participação de diversas citocinas é essencial para a defesa do hospedeiro contra patógenos bacterianos, incluindo os membros patogênicos do gênero *Yersinia* (AUTENRIETH et al., 1992; AUTENRIETH et al., 1993a). No entanto, o efeito da *Yersinia* sobre os componentes do sistema imune adaptativo, o qual é tão importante à sobrevivência dos animais infectados e à ligação observada entre infecção por *Yersinia* e auto-imunidade, não está claro. Durante o curso natural da infecção por *Yersinia*, a bactéria certamente encontra linfócitos quando ela coloniza e se multiplica extracelularmente nas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço e fígado (AUTENRIETH et al., 1993b; AUTENRIETH & FIRSCHING, 1996). Nas lesões de baço e fígado induzidas por *Yersinia* estão presentes tanto células T como macrófagos (AUTENRIETH et al., 1993a).

Vários estudos têm demonstrado a importância de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α , IFN- γ e IL-12 durante a resposta imune contra *Yersinia*. A neutralização destas

citocinas foi capaz de eliminar a resistência a este patógeno, sugerindo que macrófagos ativados por células T são importantes células efetoras na resposta protetora à *Yersinia* (AUTENRIETH & HEESEMAN, 1992; BOHN et al., 1994; BOHN & AUTENRIETH, 1996).

Estudos *in vitro* indicam que *Yersinia* pode se ligar tanto a linfócitos T quanto B, presumivelmente através das integrinas presentes nos linfócitos (LUNDGREN et al., 1996; ARENCIBIA et al., 1997). Assim, linfócitos T e B são alvos potenciais para a bactéria *in vivo*. Yao et al. (1999) relataram que *Y. pseudotuberculosis* pode interferir diretamente na ativação mediada por receptor de antígeno na célula B e T e que os efeitos inibitórios sobre os linfócitos são dependentes da produção de YopH. A presença da YopH nas células T e B resulta na hipofosforilação de quase todos os componentes tirosina-fosforilados associados com o complexo de sinalização do receptor do antígeno após ativação do mesmo. Conseqüentemente, células T expostas transitoriamente à *Yersinia* foram incapazes de promover o influxo de cálcio e produzir citocinas. Da mesma maneira, células B expostas transitoriamente a *Yersinia*, foram incapazes de regular positivamente a molécula co-estimuladora B7.2, em resposta à estimulação antigênica. Como resultado, uma grande variedade de respostas imunes mediadas por células T ou B pode ser profundamente afetada durante a infecção. Ao estudar a influência das Yops sobre a ativação policlonal dos linfócitos B de camundongos, Crespo et al. (2002) mostraram que existem diferenças na capacidade imunomoduladora entre as Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Enquanto as Yops secretadas por *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, de baixa virulência para camundongos, provocaram forte ativação, as Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis* não provocaram ativação policlonal dos linfócitos B. Portanto, o contato dos linfócitos B com as Yops de *Y. pseudotuberculosis* impede a ativação destas células e, conseqüentemente, a produção aumentada de imunoglobulinas policlonais (MEDEIROS et al., 2003).

Estas observações sugerem uma nova maneira pela qual *Yersinia* pode incapacitar a resposta imune adaptativa do hospedeiro. Assim, *Yersinia* parece ter evoluído no que diz respeito à produção de fatores de virulência que são dirigidos especificamente contra os diferentes tipos celulares que a bactéria encontra no curso de uma infecção.

Um balanço entre as citocinas Th1 e Th2 pode influenciar o curso da infecção por *Yersinia*, principalmente na fase inicial da resposta imune do hospedeiro (ZHAO et al., 2000).

As subpopulações Th1 e Th2 têm sido relacionados à regulação de muitas respostas imunes. As citocinas tipo Th1, como interferon- γ – (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) são necessárias para uma efetiva resposta imune celular contra bactérias intracelulares, enquanto células Th2 (IL-4 e IL-5) são responsáveis pela indução da resposta humoral. Deste

modo, as respostas Th1 são essenciais para a eliminação da bactéria, enquanto as Th2 estão associadas com a suscetibilidade e disseminação da infecção (HERMANN-MÄRHER & HÖKLER, 1998; YIN et al., 1997).

O IFN- γ , também envolvido na resposta contra *Yersinia*, é a principal citocina ativadora de macrófago, promovendo funções críticas tanto na imunidade inata quanto na adaptativa mediada por células. Produzido por células NK, células CD4⁺ Th1 e linfócitos T CD8⁺, constitui a principal citocina do perfil Th1. Na resposta imune adaptativa, o IFN- γ é produzido por LT em resposta ao reconhecimento do antígeno, e suas principais funções são aumentar a função microbicida dos macrófagos, por estimular a síntese de reativos intermediários do oxigênio e óxido nítrico, e estimular a expressão de moléculas do MHC de classe I e II; além de promover a diferenciação dos linfócitos em CD4⁺ Th1, dentre outras funções. O TNF- α atua em sinergismo com o IFN- γ na ativação macrofágica (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Camundongos BALB/c são maus produtores de IFN- γ , enquanto camundongos C57BL/6 são bons produtores dessa citocina. A administração de IFN- γ , IL-12, ou anticorpos anti-IL-4 tornam os camundongos BALB/c resistentes à *Yersinia*. Estes resultados sugerem que IL-4, produzida por células T CD4⁺, deve estar envolvida na promoção da suscetibilidade de camundongos BALB/c à *Yersinia*. Além disso, foi demonstrado que os níveis elevados de IFN- γ , predominantemente dependentes de IL-12, produzidos por células T CD4⁺ e células NK de camundongos C57BL/6, correlacionam-se com resistência contra *Yersinia*. De acordo com estes resultados, a proteção mediada por IL-12 dos camundongos BALB/c foi parcialmente eliminada através de administração de anticorpos anti-IFN- γ (BOHN & AUTENRIETH, 1996).

Enquanto o IFN- γ se apresenta como a principal citocina do perfil Th1, a IL-4 constitui a principal do perfil Th2, possuindo funções tanto indutoras como efectoras. As maiores fontes de IL-4 são os LT CD4⁺ do perfil Th2 e os mastócitos e basófilos ativados (SEDER & PAUL, 1994). As ações biológicas mais importantes desta citocina são: estimular a mudança das cadeias pesadas das imunoglobulinas para o isotipo IgE e estimular o desenvolvimento de células Th2 a partir dos LT CD4; além de funcionar como um fator de crescimento autócrino para estas células (ABBAS & LICHTMAN, 2003).

O papel das citocinas Th2 tais como IL-4 ou IL-10 na infecção por *Yersinia* precisa ser melhor investigado (HEIN et al., 2000).

A resposta inflamatória é eventualmente abolida por citocinas antiinflamatórias, especialmente a IL-10. Esse processo natural de regulação assegura a homeostase no interior do hospedeiro e previne o choque séptico (TATO & HUNTER, 2002; VASSELON & DETMERS, 2002). Um estudo mostrou que o antígeno V (LcrV) de *Y. pestis* regula negativamente o

processo inflamatório durante a rápida e letal peste, por estimular a produção de IL-10 (BRUBAKER, 2003). A IL-10 é induzida pela IL-12, porém inibe a produção e os efeitos mediados pela mesma (MORRIS et al., 1994). A IL-10 parece agir de forma antagônica à IL-12 durante yersiniose em camundongos BALB/c, de modo que a adição de IL-10 às culturas de esplenócitos diminui a produção de IFN- γ induzida por *Yersinia*, enquanto que a adição de anticorpos anti-IL-10 aumenta a produção do mesmo. (BOHN & AUTENRIETH, 1996). Ao estudar a expressão de mRNA, Bohn et al. (1994), demonstraram que camundongos C57BL/6 produzem mais IL-10 do que os BALB/c.

Especula-se que o TGF- β seja crítico para se obter uma ótima resposta imune contra *Yersinia*, já que, talvez, ele possa ser o responsável pelo balanço tanto das atividades tóxicas quanto das protetoras mediadas pela IL-12 (BOHN et al., 1998). A principal ação do TGF- β no sistema imune é inibir a proliferação e ativação de linfócitos e outros leucócitos. Ele é secretado por LT estimulados, fagócitos mononucleares ativadas por LPS e muitos outros tipos celulares. Alguns LT reguladores produzem TGF- β e IL-10, que também possui atividade imunossupressora (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Os LT reguladores induzidos por administração de antígenos pela via oral e cuja ação supressora é exercida por meio da produção de TGF- β pertencem a um subgrupo chamado Th3 (WEINER, 2001). O efeito imunossupressor do TGF- β parece ser causado por inibição da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-12 (ESPEVIK et al., 1987, RANGES et al., 1987, HUNTER et al., 1995). Na infecção experimental por *Yersinia*, a administração de TGF- β aumentou a resistência contra a bactéria em camundongos resistentes, mas não teve impacto no curso da infecção em camundongos BALB/c. A administração de IL-12 mais TGF- β tornou os camundongos C57BL/6 mais resistentes à infecção pela *Yersinia* e aboliu os efeitos tóxicos da IL-12 (BOHN et al., 1998). Entretanto, o papel imunorregulador do TGF- β ainda não está claro. Encontram-se relatos contraditórios sobre as respostas Th1 mediadas por TGF- β , indicando que esta citocina estimula (FARGEAS et al., 1992; NAGELKERKEN et al., 1993; SWAIN et al., 1991) ou regula negativamente o desenvolvimento de células Th1 (HOHEN et al., 1995; WU et al., 1994).

O papel do TGF- β também apresenta-se contraditório durante a infecção com outros patógenos. O TGF- β promove infecção por *L. braziliensis* (BARRAL et al., 1993) e *T. gondii* (HUNTER et al., 1995) em correlação com a regulação negativa de IL-4 e IL-10 (BARRAL et al., 1993). Por outro lado, TGF- β exerce um papel benéfico na resistência contra *C. albicans* (SPACCAPELO et al., 1995) e *L. monocytogenes* (NAKANE et al., 1996), regulando positivamente a produção de IL-4 e IL-10 (SPACCAPELO et al., 1995), regulando negativamente IFN- γ e TNF- α , e induzindo a produção de IL-6 (NAKANE et al., 1996).

Frente a tantas controvérsias e incertezas no que diz respeito ao balanço entre as citocinas pró-inflamatórias e reguladoras durante as infecções por *Yersinia*, torna-se bastante evidente a importância e necessidade de estudá-las.

Estudos realizados pelo nosso grupo sugeriram que enquanto as Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis*, principalmente a YopE e a YopH, possuem efeitos supressores sobre a produção de IL-12, TNF- α e NO (MONNAZZI et al., 2004), o extrato celular e as Yops de *Y. enterocolitica* estimulam a produção de TNF- α , embora bem menos que o LPS (CARLOS et al., 2004).

O papel das células T CD4⁺ na eliminação da infecção por *Yersinia*, embora parece ser ambíguo. As células T CD4⁺ promovem eliminação de *Y. enterocolitica* em camundongos C57BL/6, ao mesmo tempo em que promovem exacerbação da infecção em camundongos BALB/c (BOHN & AUTENRIETH, 1996). Já a depleção de células NK ou células T CD8⁺ não tiveram impacto na eliminação da infecção por *Yersinia* em camundongos BALB/c. Entretanto, tanto células T CD8⁺ quanto células NK são cruciais na eliminação de infecção por *Yersinia* em camundongos BALB/c depletados de células T CD4⁺, sugerindo que células T CD4⁺ podem inibir as células T CD8⁺ e NK no que se refere à sua potencial capacidade de eliminar *Yersinia* (BOHN et al., 1998).

O grupo de proteínas pertencentes à família NF- κ B de fatores de transcrição é muito importante no que diz respeito à regulação do sistema imune, principalmente por estar envolvido na expressão de genes de citocinas. Os cinco membros da família NF- κ B incluem NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB e c-Rel. A invasão do hospedeiro por um patógeno está frequentemente associada com a ativação do NF- κ B, o qual coordena vários aspectos da função imune necessários para a resistência à infecção. No entanto, alguns microrganismos conseguem interferir com a ativação do NF- κ B evadindo-se da resposta imune do hospedeiro (TATO & HUNTER, 2002) e sobrevivendo no interior do mesmo. *Yersinia enterocolitica* prejudica a ativação do NF- κ B em macrófagos peritoneais murinos e células da linhagem J774.1 e também nas células HeLa epiteliais humanas (RUCKDESCHEL et al., 1998).

A ativação do NF- κ B fornece proteção contra a morte por apoptose (BAICHWAL & BAEUERTE, 1997). De forma análoga, a ativação do NF- κ B é essencial para a autodefesa e sobrevivência dos macrófagos quando do encontro com bactéria ou LPS (ALIPRANTIS et al., 2000; KITAMURA, 1999; RUCKDESCHEL et al., 1998). A YopP de *Yersinia enterocolitica* é capaz de, simultaneamente, bloquear a via do NF- κ B e desencadear a apoptose em macrófagos (RUCKDESCHEL et al., 2001b). Ruckdeschel et al. (2001a) demonstraram que a arginina-143 da YopP de *Y. enterocolitica* é crucial na supressão do NF- κ B e na indução de apoptose em

macrófagos. A YopJ de *Y. pseudotuberculosis* também causa inibição da ativação do NF- κ B e da expressão de genes de citocinas (SCHESSER et al., 1998).

Alguns vírus, como por exemplo o HIV, manipulam a ativação do fator NF- κ B no sentido de promover a inibição da resposta imune (AKARI et al., 2001; BOUR et al., 2001).

O desenvolvimento de estratégias para interferir com a ativação do NF- κ B fornece, sem dúvida, vantagens aos microrganismos invasores, mas algumas vezes torna-se obscuro se a ativação deste fator, em resposta à infecção, beneficia mais ao hospedeiro ou ao patógeno (TATO & HUNTER, 2002).

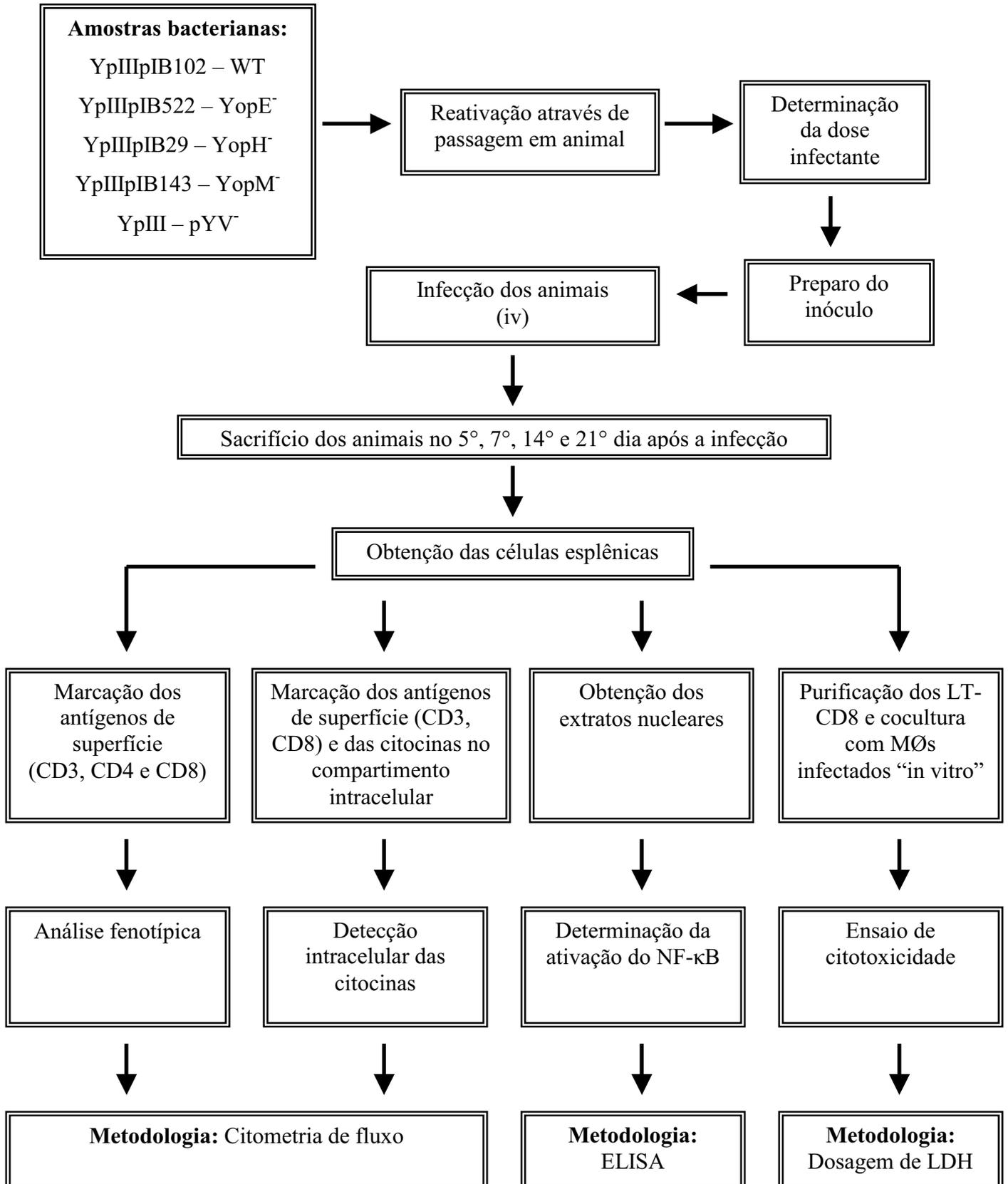
Tendo conhecimento da importância dos perfis Th1 e Th2 durante a infecção por bactérias do gênero *Yersinia*, objetivou-se neste trabalho verificar a influência das proteínas Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis*, codificadas por plasmídeo, sobre a síntese, *in vivo*, das citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , IL-2 e TNF- α), do perfil Th2 (IL-4 e IL-10) e TGF- β ; e também sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Ainda com o intuito de estudar mais a fundo as maneiras pelas quais esta bactéria influencia a resposta imune adaptativa do hospedeiro e, ao mesmo tempo, como este responde, foi analisada a influência das Yops sobre as subpopulações de linfócitos T predominantes durante a infecção e sobre a função citotóxica dos LT CD8.

II - OBJETIVOS

1. Determinar a cinética de infecção da amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis* e das amostras mutantes para a secreção das Yops, no baço e fígado dos animais infectados por via intravenosa .
2. Quantificar as subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 no decorrer da infecção com as diferentes amostras bacterianas.
3. Verificar o papel das Yops E, H e M na determinação do padrão de citocinas Th1 e Th2 durante infecção de camundongos BALB/c.
4. Verificar o papel das Yops E, H e M na ativação do fator de transcrição NF- κ B.
5. Avaliar a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8 obtidos de camundongos infectados.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Fluxograma de trabalho:



2 – Animais de experimentação:

Camundongos BALB/c, fêmeas, SPF (*specific pathogen free*), com seis a oito semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP). Os animais foram transportados em mini-isoladores até a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP – Câmpus Araraquara) onde ficaram alojados no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas. Os animais permaneceram em isoladores durante todo o tempo dos experimentos, para garantir sua condição SPF. A ração, a água e a serragem fornecidas aos animais foram previamente esterilizadas em autoclave a 120°C por 15 minutos.

3 - Amostras bacterianas:

- *Yersinia pseudotuberculosis* YpIIIpIB102 (WT): amostra selvagem, portadora do plasmídeo de virulência e, portanto, capaz de secretar todas as Yops.
- *Yersinia pseudotuberculosis* YpIIIpIB522 (*yopE*⁻): amostra mutante defectiva na secreção da YopE.
- *Yersinia pseudotuberculosis* YpIIIpIB29 (*yopH*): amostra mutante defectiva na secreção da YopH.
- *Yersinia pseudotuberculosis* YpIIIpIB143 (*yopM*): amostra mutante defectiva na secreção da YopM.
- *Yersinia pseudotuberculosis* YpIIIpIB232 (*yopJ*): amostra mutante defectiva na secreção da YopJ.
- *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII: amostra curada do plasmídeo de virulência e, portanto, incapaz de secretar todas as Yops.

Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo Dr. Hans Wolf-Watz, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Umea, Suécia.

4 - Infecção experimental dos animais com as amostras de *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII.

4.1 - Reativação das amostras de *Yersinia*:

As amostras foram enviadas em pequenos pedaços de filtro de nitrocelulose e foram recuperadas colocando-se os filtros em placas de Luria Agar (GibcoBRL) contendo 50 µg/mL de kanamicina, uma vez que todas as amostras são kanamicina resistentes. Os crescimentos bacterianos conseguidos nas placas de Luria foram semeados em caldos tripticase soja (TSB) (Acumedia), também contendo 50 µg/mL de kanamicina, e a partir dos crescimentos obtidos nestes caldos é que foram preparados os respectivos estoques glicerinados; os quais foram mantidos a -80°C. Antes de serem utilizadas, as bactérias foram reativadas através de passagem em camundongos. Para tal, dois camundongos foram inoculados por via intravenosa com 0,2 mL de uma suspensão do microrganismo contendo cerca de 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, a qual foi preparada a partir de uma suspensão contendo 10^{10} UFC/mL, padronizada pela escala 3 de Mac Farland e apresentando leitura de densidade óptica, a 550nm, igual a 0,36 (Du^R 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer – Beckman). Após 24 horas, esses animais foram sacrificados e os respectivos baços retirados e macerados em solução salina estéril. Uma alíquota deste macerado (aproximadamente 0,2 mL) foi semeada em placas contendo meio ágar base de sangue (BAB) (Bio-Rad), as quais foram incubadas a 25 °C por 48 horas. A partir deste crescimento foi preparado o inóculo utilizado para infectar os animais.

4.2 - Determinação da dose infectante:

O crescimento bacteriano obtido no meio de cultura BAB, devidamente reativado, foi ressuspendido em salina 0,85% estéril e padronizado em espectrofotômetro a 550nm, conforme já descrito no item 3.1. A partir da suspensão contendo 10^{10} UFC/mL foram feitas várias diluições do inóculo a fim de se ajustar o número de UFC/mL a serem inoculadas. Grupos de 5 camundongos foram inoculados com cada uma das diluições a serem testadas (três diluições de cada amostra), e observados diariamente por um período de 30 dias. O número de mortes dentro deste intervalo foi devidamente anotado.

4.3 - Preparo do inóculo:

Após reativação e determinação da dose infectante, foi preparado o inóculo bacteriano utilizado na infecção dos animais. Este inóculo foi também preparado com a amostra reativada e de acordo com a metodologia anteriormente descrita (item 3.1). A concentração da dose inoculada foi sempre confirmada através da semeadura da suspensão contendo 10^4 UFC/mL (0,1 mL) em meio de cultura BAB.

4.4 - Esquema de infecção:

Lotes de 24 animais foram infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*, mantendo-se um lote com o mesmo número de animais não infectados como controle. A inoculação se deu pela via intravenosa, através da veia da cauda, e o volume inoculado foi sempre de 0,2 mL por camundongo. Grupos de animais infectados e controles foram sacrificados, os baços retirados (em condições assépticas) no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dias após a infecção (pi) e as respectivas suspensões de células esplênicas preparadas de acordo com os ensaios aos quais se destinavam.

5 - Cinética de Infecção:

Para estudar a cinética de infecção das diferentes amostras, lotes de 20 animais foram infectados como descrito acima e grupos de 4 animais foram sacrificados no 2^o, 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dias pi. O baço e o fígado de cada animal foram removidos assepticamente e homogeneizados em salina 0,85%. A partir destes macerados foram preparadas as diluições 1/10 e 1/100. Alíquotas de 0,1mL de cada uma das diluições foram semeadas em duplicata em placas de BAB. As UFC foram contadas após um período de incubação de 48 horas a 25 °C em estufa BOD. As colônias de *Yersinia* foram confirmadas através do teste de aglutinação com soro específico anti-*Y. pseudotuberculosis* produzido em coelho.

Concomitante ao experimento de cinética de infecção, realizou-se a pesagem do baço e fígado dos animais infectados e de animais não infectados, para comparação dos resultados.

6 - Análise histológica de cortes de baço e fígado de animais infectados com a amostra selvagem

O baço e o fígado de animais infectados com a amostra WT e de animais não infectados foram obtidos no 14^o dia pi. Em seguida, estes órgãos foram fixados em formalina e embebidos em parafina. Cortes de 5µm foram diafanizados em xilol e corados com hematoxilina e eosina (H/E). Na análise histológica descritiva foram avaliadas as alterações morfológicas e a presença de reação inflamatória no tecido esplênico e hepático em decorrência da infecção. As imagens foram obtidas através de microscópio óptico (Leica), com câmera de vídeo acoplada e microcomputador, com um programa analisador de imagens (DC Viewer) conectado.

7 - Quantificação das subpopulações de linfócitos T e determinação do padrão de citocinas Th1 e Th2 através do método de citometria de fluxo (Morita et al., 1998).

7.1 – Obtenção das células esplênicas:

Os camundongos do grupo controle e infectados foram sacrificados em câmara de CO₂, os baços retirados em condições assépticas e macerados em 5 mL de tampão salina-fosfato (PBS - pH 7,2) gelado. A suspensão de células assim obtida foi transferida para tubos cônicos de polietileno e centrifugada a 358 g (Centrífuga Fanem Excelsa II 206MP). Após a centrifugação, as células foram lavadas em meio PBS (pH 7,2) por mais duas vezes. Antes da terceira lavagem, as células foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente em uma solução de cloreto de amônio 0,83% e soro fetal (3:1) para que ocorresse a lise das hemácias. Realizou-se nova centrifugação e, ao término da mesma, as células foram lavadas com 5 mL de RPMI-1640 (Sigma) suplementado com L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 ug/mL) e 10% de soro fetal bovino. Em seguida as células foram ressuspensas em 1 mL RPMI, igualmente suplementado, para contagem do número de linfócitos viáveis.

7.2 - Viabilidade das células esplênicas:

O número de células mononucleares viáveis presente no baço de cada camundongo foi avaliado através da técnica de exclusão do Azul Trypan (Mishell & Shiigi, 1980). Para isso as células foram diluídas 1:100 no respectivo corante e contadas em Câmara de Neubauer.

7.3 - Análise fenotípica dos linfócitos esplênicos:

Para cada animal foi preparada uma suspensão contendo 2×10^6 células esplênicas/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal, 2 mM de L-glutamina, 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol, 10 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (RPMI-c). Esta suspensão de células foi usada tanto para realização da análise fenotípica dos linfócitos quanto para a detecção intracitoplasmática das citocinas. Uma parte desta suspensão, que foi destinada à tripla coloração com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular, foi transferida para um outro tubo cônico e centrifugada a 358 g por 5 minutos. O sedimento celular

foi solubilizado em solução de PBS contendo 1% de BSA e a solução *Mouse FcBlock*TM (BD PharMingen) foi adicionada a cada tubo. Após incubação de 20 minutos a 4°C iniciou-se a marcação dos antígenos CD3, CD4 e CD8. Para isso, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com quantidades saturantes dos anticorpos anti-CD3 conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD4 conjugado à ficoeritrina (PE) e anti-CD8 conjugado ao “spectral red” (SPRD) (todos da marca Southern Biotech). Ao término desta incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA (358 g / 5 minutos) e ressuspensas em PBS contendo 1% de formol.

As células permaneceram na solução de PBS 1% de formol, a 4°C e no escuro até o momento da análise no citômetro de fluxo FACSCanto (BD). Os linfócitos foram especificamente analisados por “gating” seletivo baseado nos parâmetros de tamanho e granulosidade celulares. As imunoglobulinas isotipo-específicas, não reagentes, marcadas com os mesmos fluorocromos (Caltag), foram utilizadas como controles (isotipo controle). Para análise dos dados foi utilizado o programa FACSDiva (BD).

7.4 - Detecção intracelular das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, INF- γ , TNF- α e TGF- β :

O restante da suspensão de células esplênicas a 2×10^6 células/mL, destinada à detecção intracitoplasmática das citocinas, foi distribuída em uma placa de 24 cavidades. Parte destas células foram estimuladas com 25 ng/mL de forbol miristato acetato (PMA) (Sigma) e 1 μ g/mL de ionomicina (Sigma), e a outra parte não recebeu estímulo. As células foram incubadas por 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, por 4 horas. Em seguida, foi adicionado 10 μ g/mL de brefeldina A (Sigma) a todas as cavidades e a placa foi incubada, nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO₂, por mais duas horas. A brefeldina A foi utilizada para melhorar a análise das citocinas intracelulares devido ao seu efeito inibitório na secreção de proteínas, o que permite um acúmulo das citocinas no complexo de Golgi e conseqüentemente um aumento do sinal, que poderá ser detectado pelo citômetro de fluxo. Ao final do período total de seis horas de incubação, as suspensões de células, tanto estimuladas “in vitro” quanto não estimuladas, foram transferidas das cavidades da placa para respectivos tubos cônicos e centrifugadas a 358 g por 5 minutos. Em seguida as células foram lavadas uma vez com PBS 1% de BSA (358 g / 5 minutos) e ressuspensas igualmente em PBS 1% de BSA. Adicionou-se às suspensões celulares a solução *Mouse FcBlock*TM (BD PharMingen) e as células foram incubadas a 4°C por 20 minutos. Terminada esta incubação, as células foram distribuídas nos respectivos tubos de citometria e iniciou-se a marcação das moléculas de superfície CD3 e CD8; uma vez

que a produção de citocinas foi analisada nas subpopulações CD4 e CD8 de linfócitos T. Para isto, foram adicionados os anticorpos anti-CD3 (FITC) e anti-CD8 (SPRD) e realizou-se uma incubação por 30 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS 1% BSA (358 g / 5 minutos) e ressuspensas na solução *CytoFix / CytoPerm* (BD PharMingen) a fim de proporcionar a fixação e permeabilização das células. Após incubação de 20 minutos a 4°C e ao abrigo da luz, as células foram lavadas mais duas vezes com o tampão *Perm Wash* (BD PharMingen). As células foram ressuspensas em 50µL de *Perm Wash* e então foram adicionados, cada um ao seu respectivo tubo para citometria, os anticorpos monoclonais citocina-específicos e anticorpos monoclonais isotipo-controles, todos conjugados com PE; exceto o anticorpo anti-TGF-β que era biotilado. Seguiu-se nova incubação a 4°C e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com *Perm Wash* e todos os tubos, com exceção daqueles destinados à marcação do TGF-β, foram adicionados de PBS 1% de formol e acondicionados a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo. Aos tubos contendo as células incubadas com o anticorpo anti-TGF-β biotilado acrescentou-se a estreptavidina conjugada à PE (BD PharMingen) e os mesmos foram incubados por mais 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Terminado este período, estas células também foram lavadas mais duas vezes com o tampão *Perm Wash* e adicionadas de PBS 1% de formol. Assim como os demais, estes tubos foram acondicionados a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo.

A análise dos dados foi feita no citômetro FACSCanto usando o programa FACSDiva (BD). As citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4⁺ foram analisadas indiretamente através da separação e análise da população de linfócitos CD3⁺ CD8⁻, visto que a estimulação com forbol ésteres diminui a expressão de CD4 (SOLBACH, 1982).

8 – Determinação da ativação do NF-κB nos linfócitos esplênicos (Viboud et al., 2003):

A ativação do NF-κB foi avaliada no 5º, 7º, 14º e 21º dia após a infecção com a amostra selvagem da *Y. pseudotuberculosis*, com a amostra curada do plasmídeo de virulência e com as amostras mutantes defectivas na secreção das Yops J, E, H e M, utilizando-se o kit TransAM (ActiveMotif). Para tanto, foi necessário obter os extratos nucleares dos linfócitos provenientes dos animais infectados com as diferentes amostras bacterianas de interesse e dos animais controles. Foram sacrificados seis animais para cada dia de experimento

8.1 - Obtenção do extrato nuclear (Schreiber et al., 1989):

Os linfócitos esplênicos dos animais foram obtidos assepticamente, conforme já descrito anteriormente, e o número de células ajustado em 2×10^6 células/mL em TBS (pH 7,2). Foi transferido 1mL dessa suspensão para microtubos de 1,5 mL e as células foram sedimentadas por “spinning” durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400 μ L de Tampão A (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF). Os tubos foram gentilmente homogeneizados e incubados por 15 minutos em banho de gelo. Após o período de incubação, foram adicionados 25 μ L da solução de Nonidet P-40 10% (NP-40) e os microtubos foram agitados vigorosamente durante 10 segundos. As células foram centrifugadas durante 1 minuto a 13000 g, ressuspensas em 50 μ L de Tampão C (20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) e, em seguida, colocadas em plataforma de agitação a 4°C, por 15 minutos. Após esse período de agitação o extrato nuclear foi centrifugado a 13000 g, durante 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante obtido foi coletado e acondicionado a -80°C. Uma pequena alíquota destes extratos foi usada para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

8.2 - Ensaio de ativação do fator de transcrição NF- κ B:

Este ensaio foi realizado conforme o protocolo do kit TransAM NF- κ B (Active Motif) e usando-se os tampões e soluções que acompanhavam o mesmo.

Foram adicionados às cavidades da placa, sobre as quais já se encontravam aderidos oligonucleotídeos com sítios de ligação do DNA do NF- κ B (5' - GGGACTTTCC - 3'), 30 μ L do “tampão de ligação”. Em seguida foram colocados 20 μ L/cavidade de cada amostra (extratos nucleares), já diluídas 1/100 em “tampão de lise”. As amostras foram diluídas cem vezes a fim de se alcançar a concentração de 2 a 20 μ g de extrato nuclear, sugerida pelo fabricante. A placa foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente e com agitação suave (aproximadamente 100 rpm, sobre plataforma de agitação). Durante esta incubação, foi proporcionada a ligação específica da forma ativa do NF- κ B, contida nos extratos nucleares, aos oligonucleotídeos imobilizados nas cavidades da placa. Terminado o período de incubação, as cavidades foram lavadas três vezes com 200 μ L/cavidade de “tampão de lavagem”. Foram adicionados então 100 μ L do anticorpo primário contra o NF- κ B por cavidade. Seguiu-se nova incubação por 1 hora, à temperatura ambiente, porém não mais sob agitação. Estes anticorpos usados para detectar o NF- κ B reconhecem um epítipo nas subunidades p65 ou p50 que se torna acessível apenas quando

este fator nuclear encontra-se ativado e ligado ao seu DNA alvo. Após a incubação com o anticorpo primário, as cavidades foram novamente lavadas três vezes com o “tampão de lavagem” (200 µL/cavidade) e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP) foi adicionado (100 µL/cavidade). Mais uma incubação de 1 hora, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz foi realizada e, ao término desta, foram executadas as devidas lavagens da mesma forma como já descrito acima. Como última etapa do ensaio, foram adicionados às cavidades 100 µL da “solução de substrato” e a placa foi incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi paralisada pela adição de igual volume da “solução de parada” e, logo em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro de microplacas (BioRad 550) usando-se o filtro de 450 nm.

Como controle positivo para a ativação do NF-κB foram usados extratos nucleares de células Jurkat (2,5 µg/cavidade) estimuladas com TNF-α, fornecidos pelo kit.

9 – Avaliação da atividade citotóxica dos linfócitos esplênicos.

9.1 – Obtenção das células do exsudato peritoneal:

Os camundongos destinados à obtenção de células do exsudato peritoneal foram previamente inoculados com 3,0 mL de Tioglicolato 3% (Difco) pela via intraperitoneal a fim de estimular os macrófagos desta cavidade. Após 3 dias de estímulo, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal exposta. Foram inoculados nesta cavidade 5,0 mL de PBS estéril gelado e através de massagem do peritônio as células foram desprendidas e coletadas. As células foram então lavadas de 2 a 3 vezes por centrifugação a 358 g (Centrífuga Fanem Excelsa II 206MP) durante 5 minutos em PBS estéril e, em seguida, ressuspensas em 1mL de RPMI-1640 para contagem em câmara de Neubauer.

9.2 – Infecção dos macrófagos “in vitro”:

Os macrófagos peritoneais de camundongos, obtidos como descrito acima foram infectados com a amostra selvagem da bactéria. Para isso, uma suspensão de macrófagos ajustada em 5×10^5 células/mL foi distribuída em uma placa de microcultivo, no volume de 100 µL por cavidade. Sobre estas células foram adicionados 100 µL de uma suspensão bacteriana, preparada com a amostra selvagem da *Y. pseudotuberculosis*, na concentração de 5×10^6 UFC/mL; fornecendo uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1:10. A placa foi

centrifugada a 250 g por 5 minutos e incubada durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Terminada esta incubação, as células foram lavadas duas vezes com RPMI-1640 a fim de se remover as bactérias não internalizadas e, em seguida, incubadas por igual período e nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO₂ com 100 µL por cavidade de uma solução de gentamicina 100 µg/mL. Ao final deste período, os macrófagos devidamente infectados foram lavados mais duas vezes com o meio RPMI-1640.

9.3 – Obtenção dos linfócitos T CD8 (LT-CD8):

No 5º, 7º, 14º e 21º dia pi foram obtidas as células esplênicas, conforme descrito no item 6.1, de três animais por dia. Foi feito um “pool” com estas células. Os LT-CD8 presentes neste “pool” foram selecionados através de passagem em coluna de enriquecimento para LT-CD8 (R&D MCD8C-1000), a concentração foi ajustada em 2×10^6 células/mL e, então, estes LT-CD8 foram cocultivados, em placas de 96 cavidades, com os macrófagos infectados.

9.4 - Ensaio de Citotoxicidade (Dube et al., 2004):

Um ensaio de citotoxicidade não radioativo foi realizado utilizando-se o kit CYTO-TOX 96 (Promega). Os macrófagos peritoneais de camundongos, obtidos e infectados como descrito anteriormente, serviram como células apresentadoras de antígenos (CAA), que são as células-alvo da reação. As CAAs foram incubadas durante 4 horas a 37 °C e 5% CO₂ com os LT-CD8 (2×10^6 células/mL) provenientes dos animais infectados com as respectivas amostras bacterianas ou dos animais controles. Após esta incubação a placa foi centrifugada a 250 g, 4°C por 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa de 96 cavidades (50 µL/cavidade). Foram adicionados aos sobrenadantes iguais volumes da solução substrato (fornecida pelo kit) e a placa foi novamente incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao término deste período a reação foi interrompida através da adição de 50 µL/cavidade de uma solução de ácido acético 1 M (solução de parada fornecida pelo kit). A citotoxicidade foi determinada espectrofotometricamente (490 nm) através da análise da liberação de lactato desidrogenase (LDH) resultante da lise das CAAs pela ação dos LT-CD8. A lise específica foi calculada da seguinte forma: **% de citotoxicidade = (A - B-C) / (D - C) x 100**, onde A é o valor de lise obtido a partir da incubação das CAAs com os linfócitos T CD8 dos animais infectados ou dos animais controles (Lise Experimental), B constitui a lise espontânea

dos LT-CD8, C corresponde à liberação espontânea de LDH pelos macrófagos e D à liberação máxima de LDH pelos macrófagos .

10 - Análise Estatística:

Os dados foram apresentados como média \pm SD e a comparação entre os grupos de animais infectados e controles foi realizada através do teste *t* de Student, utilizando-se o programa Origin 5.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

IV – RESULTADOS

1 – Determinação da dose infectante para as amostras de *Yersinia pseudotuberculosis*:

Para determinar a dose infectante de cada amostra bacteriana usada neste trabalho, grupos de cinco camundongos foram inoculados com três suspensões de diferentes concentrações de cada uma delas e observados por um período de trinta dias. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Para a amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis* foram testadas as concentrações de 200, 20 e 1 UFC. Após o período de observação, foi possível escolher a concentração de 1 UFC para inoculação dos lotes experimentais visto que, com esta dose, os animais não foram a óbito durante o período de interesse.

Para a determinação da dose infectante da amostra YopE⁻ os camundongos foram inoculados com suspensões bacterianas cujas concentrações variaram de 2×10^5 a 2×10^3 UFC. Verificamos que nas concentrações 2×10^5 e 2×10^4 ocorreram mortes de animais durante o período observado. Portanto, foi escolhida a concentração de 2×10^3 UFC para a inoculação do lote.

Para a amostra mutante YopH⁻ os camundongos foram inoculados com suspensões bacterianas cujas concentrações foram de 2×10^6 , 2×10^5 e 2×10^4 UFC. Verificamos a ocorrência de óbitos para as concentrações de 2×10^6 e 2×10^5 UFC. Desta forma, a concentração escolhida para a inoculação do lote foi de 2×10^4 UFC.

A fim de determinar a dose infectante da amostra YopM⁻ foram inoculadas suspensões bacterianas com concentrações iguais a 2×10^4 , 2×10^3 e 2×10^2 UFC. Nos grupos de animais inoculados com as concentrações de 2×10^4 e 2×10^3 UFC ocorreram óbitos, o que nos levou a escolher a concentração de 2×10^2 UFC para a inoculação do lote.

A dose infectante da amostra YpIII correspondeu a 0,1 vez a DL₅₀, cujo valor já havia sido anteriormente determinado (MEDEIROS et al., 2006).

Tabela 2: Doses das amostras bacterianas usadas para infecção dos lotes experimentais:

Amostra bacteriana	Dose infectante (UFC)
YpIIIpIB102 (wt)	1
YpIIIpIB522 (<i>yopE</i> ⁻)	2 x 10 ³
YpIIIpIB29 (<i>yopH</i> ⁻)	2 x 10 ⁴
YpIIIpI141 (<i>yopM</i> ⁻)	2 x 10 ²
YpIII (pIB1 ⁻)	2 x 10 ⁴

2 – Determinação da cinética de infecção no baço e fígado:

O estudo da cinética de infecção foi feito para avaliar a capacidade que cada uma das amostras bacterianas possui de colonizar e persistir no baço e no fígado dos animais, após inoculação intravenosa.

Os índices de colonização bacteriana, durante a infecção com a amostra selvagem, aumentaram de forma gradativa até o 14º dia pós-infecção (pi). Pôde-se verificar, desde o 2º dia pi, um número bastante elevado de UFC em ambos os órgãos; algo que não ocorreu durante a infecção com as demais amostras. No 2º e 14º dia pi o número de UFC observado no baço foi maior do que no fígado. A partir do 7º dia pi os animais já apresentaram sinais físicos de infecção bastante evidentes e começavam a morrer. Poucos animais sobreviviam até o 21º dia pi, e entre os sobreviventes não foi possível recuperar a bactéria a partir de nenhum dos órgãos, os quais se apresentavam bastante atrofiados.

Durante o experimento com a amostra YopE⁻ o pico da colonização bacteriana também ocorreu no 14º dia pi, em ambos os órgãos. Tanto a colonização quanto a persistência desta bactéria foi maior no fígado do que no baço. Embora em pequena quantidade no 2º dia pi, a amostra YopE⁻ colonizou o fígado em todos os dias analisados. Por outro lado, o baço foi colonizado apenas do 5º ao 14º dia pi.

A amostra YopH⁻ colonizou o baço e o fígado dos animais infectados de maneira bastante parecida e persistiu em ambos durante o mesmo período de tempo. A colonização foi detectada do 5º ao 14º dia pi, sendo que os maiores valores de UFC no baço e no fígado ocorreram, respectivamente, no 14º e 7º dia pi. Esta amostra foi a que apresentou os maiores índices de colonização, no que diz respeito ao número de UFC. A ausência de UFC observada no 21º dia pi provavelmente se deve à eliminação da infecção pelos animais, uma vez que esta amostra foi a que apresentou menor virulência.

O processo de colonização promovido pela amostra YopM⁻ também começou a ser observado a partir do 5º dia pi nos dois órgãos estudados. Assim como aconteceu na maioria dos dias com as outras amostras, a taxa de colonização no fígado também foi um pouco maior do que no baço, principalmente no 7º dia pi. Embora o maior número de UFC no fígado tenha sido observado no 21º dia pi, do 7º ao 21º dia pi a variação observada foi muito pequena. Já no caso do baço, o número de UFC aumentou gradativamente ao longo da cinética e, por isso, o maior deles ocorreu no 21º dia pi.

A amostra YpIII, curada do plasmídeo de virulência, colonizou o baço dos animais desde o 2º até o 14º dia pi, sendo que os maiores níveis de colonização ocorreram no 7º dia pi. No

figado, foi possível observar UFC apenas no 2º dia pi e ainda assim em quantidade um pouco menor do que a observada no baço.

Os valores médios do número de UFC por órgão estão representados na Figura 2 (A e B) e Tabela 3.

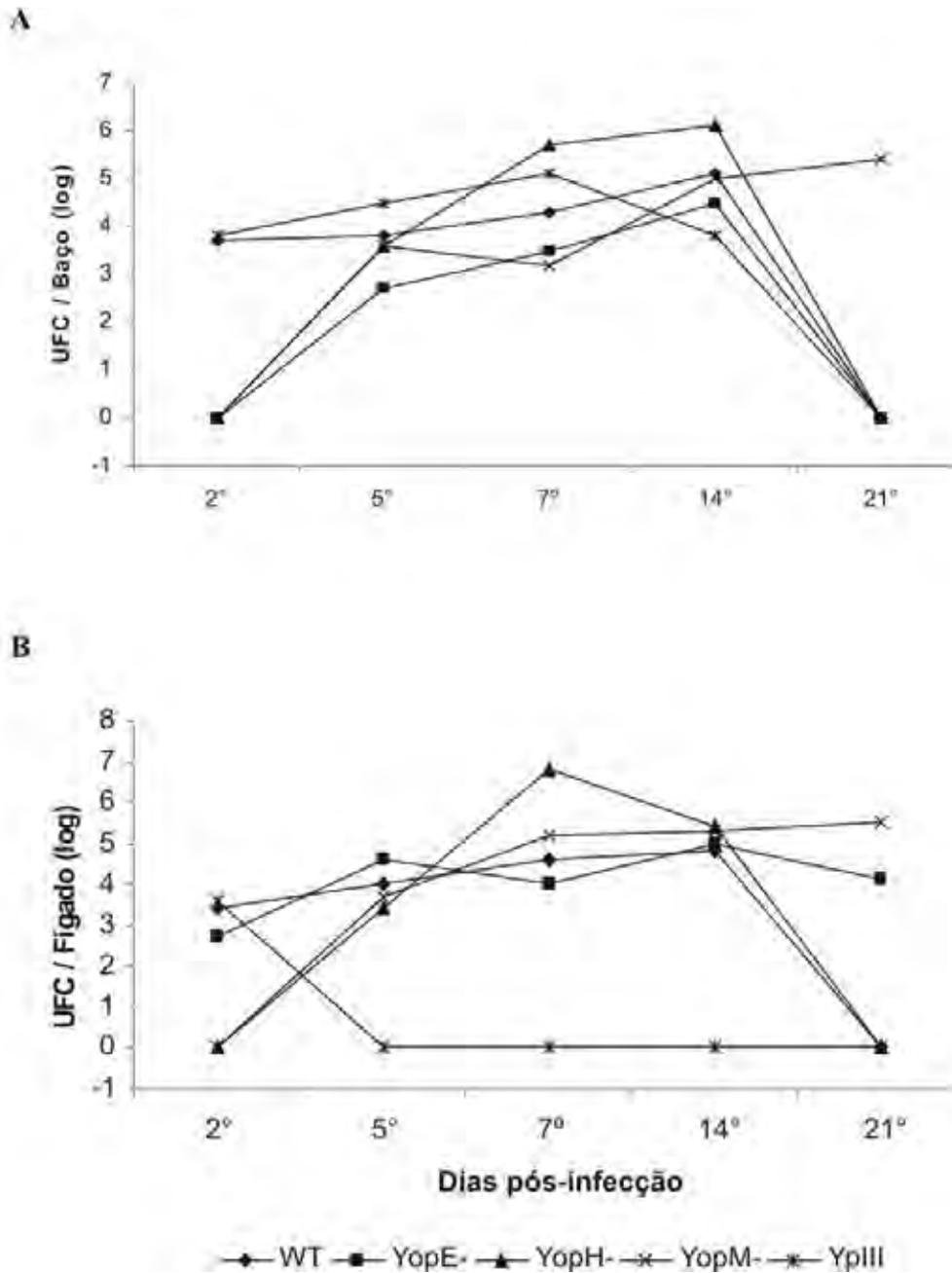


Figura 2 - Cinética de infecção no baço (A) e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados pela via intravenosa com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. No 2°, 5°, 7°, 14° e 21° dia pós-infecção os animais foram sacrificados, o baço e o fígado foram retirados, homogeneizados em salina 0,85% e alíquotas de 0,1 mL, de duas diluições seriadas (1/10 e 1/100), foram semeadas em placas de BAB. Após 48 h de incubação a 26°C, o número de UFC por órgão foi determinado. Os valores apresentados correspondem às médias de 4 animais por dia. O desvio padrão foi sempre menor que 25% dos valores observados.

Tabela 3 – Número de UFC (log) no baço e fígado dos animais no decorrer da infecção com a amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis*, as respectivas mutantes e a amostra curada do plasmídeo de virulência (valores representam médias \pm SD de 4 animais por dia):

Amostra bacteriana	Dias pós-infecção	Baço	Fígado
WT	2°	3,7 \pm 0,3	3,4 \pm 0,7
	5°	3,8 \pm 0,3	4,0 \pm 0,2
	7°	4,3 \pm 0,1	4,6 \pm 0,4
	14°	5,1 \pm 0,3	4,8 \pm 0,3
	21°	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
YopE ⁻	2°	0,0 \pm 0,0	2,7 \pm 0,4
	5°	2,7 \pm 0,0	4,6 \pm 0,3
	7°	3,5 \pm 0,4	4,0 \pm 0,3
	14°	4,5 \pm 0,4	5,0 \pm 0,5
	21°	0,0 \pm 0,0	4,1 \pm 0,5
YopH ⁻	2°	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
	5°	3,6 \pm 0,9	3,4 \pm 0,5
	7°	5,7 \pm 0,9	6,8 \pm 0,4
	14°	6,1 \pm 1,2	5,4 \pm 1,3
	21°	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
YopM ⁻	2°	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
	5°	3,6 \pm 0,5	3,7 \pm 0,6
	7°	3,2 \pm 0,5	5,2 \pm 0,4
	14°	5,0 \pm 0,4	5,3 \pm 0,6
	21°	5,4 \pm 0,5	5,5 \pm 0,1
YpIII	2°	3,8 \pm 0,3	3,6 \pm 0,5
	5°	4,5 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0
	7°	5,1 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0
	14°	3,8 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0
	21°	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

3 – Verificação do peso do baço e do fígado no decorrer da cinética de infecção:

Concomitante ao experimento de contagem do número de UFCs no 2º, 5º, 7º, 14º e 21º dia pi, realizou-se também a pesagem do baço e do fígado para avaliar possíveis alterações decorrentes da infecção (média e desvio padrão dos resultados estão apresentados na Figura 3 (A e B) e Tabela 4).

Todas as amostras estudadas, com exceção da WT no caso do fígado (2º dia pi) e da YopH⁻ no que diz respeito ao peso do baço (2º e 5º dias pi), causaram um decréscimo no peso de ambos os órgãos no decorrer da cinética.

A amostra selvagem promoveu uma redução significativa no peso do baço dos animais em todos os dias avaliados, embora o menor valor tenha sido observado no 14º dia pi (3,5 vezes menor do que o peso do baço dos animais não infectados). Já o fígado destes animais apresentou um aumento significativo em seu peso logo no 2º dia pi e em seguida, a partir do 5º dia, uma redução gradativa, cujo menor valor foi observado no 21º dia pi (cerca de 2 vezes menor do que o valor apresentado pelos animais controles).

Da mesma forma que a amostra WT, a amostra YopE⁻ promoveu uma redução significativa no peso do baço em todos os dias e o menor valor foi observado no 14º dia pi (2,8 vezes menor que os controles). O peso do fígado começou a apresentar valores menores do que os animais controles a partir do 7º dia pi, mas foi também no 14º dia pi que ocorreu a maior redução (2,4 vezes).

Os animais infectados com a amostra YopH⁻ apresentaram um aumento no peso do baço, em relação aos animais não infectados, logo no 2º e 5º dias pi (respectivamente 1,2 e 1,4 vezes). A partir do 7º dia pi, o peso do baço destes animais permaneceu constante e relativamente igual ao peso apresentado pelos animais controles. A única alteração significativa no peso do fígado dos animais infectados com esta amostra ocorreu no 14º dia pi, quando se observou uma pequena diminuição em relação aos controles.

A infecção com a amostra YopM⁻ ocasionou um decréscimo gradativo no peso do baço dos animais a partir do 7º dia pi, desta forma o menor valor foi observado no 21º dia pi (3,5 vezes menor do que o apresentado pelos animais controles). Já o peso do fígado sofreu redução apenas no 7º e 14º dia pi (1,3 e 1,5 vezes, respectivamente).

Embora de maneira menos evidente que as amostras WT, YopE⁻ e YopM⁻, a amostra YpIII também causou diminuição no peso do baço dos animais no decorrer da infecção. O peso do fígado, por sua vez, não sofreu alteração significativa em relação ao apresentado pelos animais não infectados.

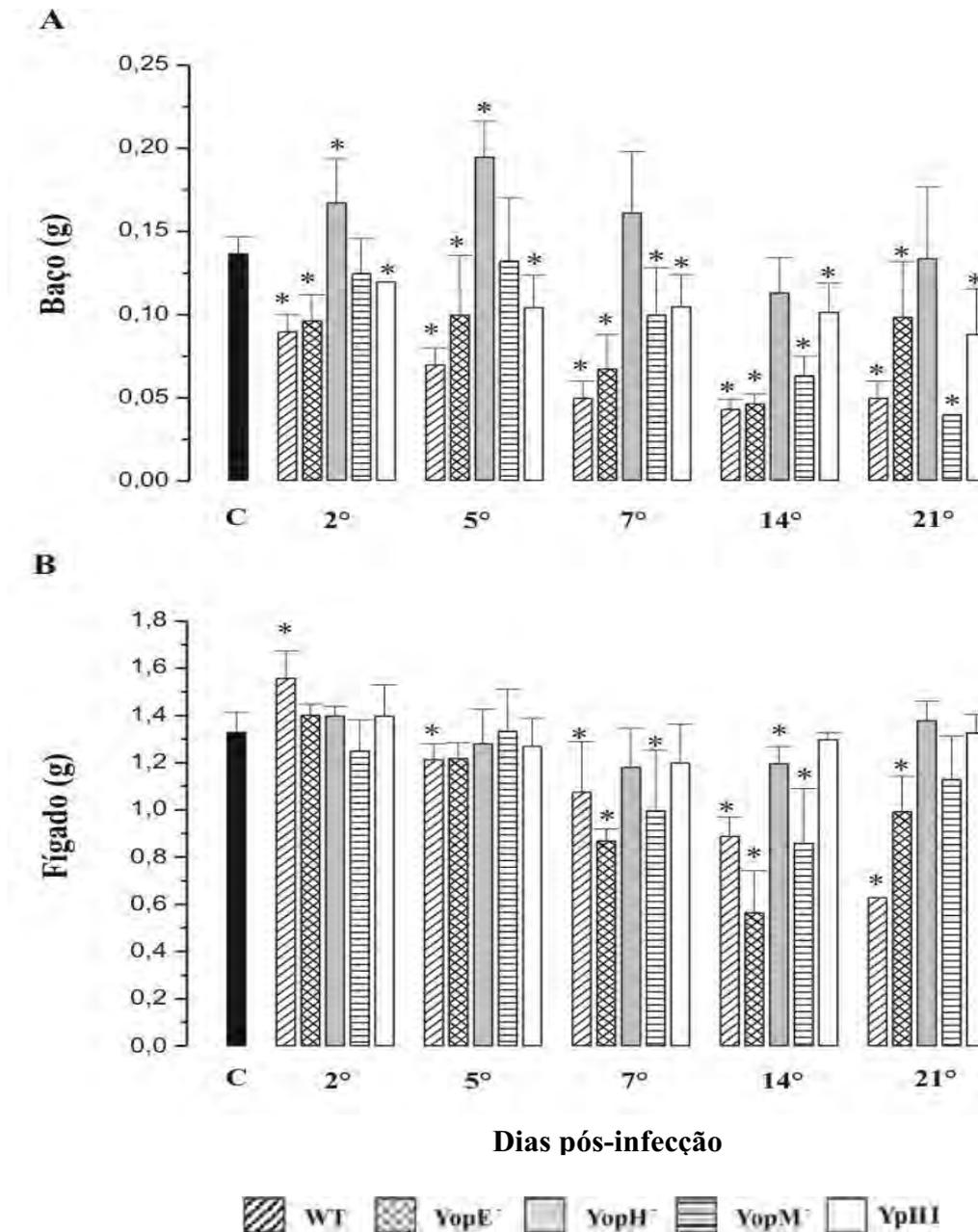


Figura 3 - Peso do baço (A) e fígado (B) de camundongos BALB/c no 2^o, 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia pós-infecção pela via intravenosa com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Os animais foram sacrificados, o baço e o fígado foram retirados, homogeneizados em salina 0,85% e alíquotas de 0,1 mL, de duas diluições seriadas (1/10 e 1/100), foram semeadas em placas de BAB. Após 48 h de incubação a 26°C, o número de UFC por órgão foi determinado. Os valores apresentados correspondem às médias dos pesos (em gramas) de, no mínimo, 4 animais por dia \pm SD.

C - Média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento.

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Tabela 4 – Peso, em gramas, do baço e do fígado dos animais durante a cinética de infecção (valores representam médias de, no mínimo, 4 animais por dia \pm desvio padrão):

Órgão	Amostra bacteriana	Dia pós-infecção					Controle
		2°	5°	7°	14°	21°	
Baço	WT	0,09 \pm 0,02*	0,07 \pm 0,01*	0,05 \pm 0,01*	0,04 \pm 0,01*	0,05 \pm 0,01*	0,14 \pm 0,01
	Yop E ⁻	0,10 \pm 0,02*	0,10 \pm 0,04*	0,07 \pm 0,02*	0,05 \pm 0,01*	0,10 \pm 0,03*	
	Yop H ⁻	0,17 \pm 0,03*	0,20 \pm 0,05*	0,16 \pm 0,04	0,11 \pm 0,02	0,13 \pm 0,04	
	Yop M ⁻	0,13 \pm 0,02	0,13 \pm 0,04	0,10 \pm 0,03*	0,06 \pm 0,01*	0,04 \pm 0,0*	
	YpIII	0,12 \pm 0,0*	0,10 \pm 0,02*	0,11 \pm 0,02*	0,10 \pm 0,02*	0,09 \pm 0,03*	
Fígado	WT	1,56 \pm 0,11*	1,22 \pm 0,07*	1,08 \pm 0,21*	0,89 \pm 0,08*	0,64 \pm 0,05*	1,33 \pm 0,08
	Yop E ⁻	1,40 \pm 0,05	1,22 \pm 0,06	0,87 \pm 0,05*	0,56 \pm 0,18*	1,00 \pm 0,15*	
	Yop H ⁻	1,40 \pm 0,04	1,28 \pm 0,14	1,18 \pm 0,16	1,20 \pm 0,07*	1,38 \pm 0,08	
	Yop M ⁻	1,25 \pm 0,13	1,34 \pm 0,18	1,00 \pm 0,26*	0,86 \pm 0,23*	1,13 \pm 0,18	
	YpIII	1,40 \pm 0,13	1,27 \pm 0,12	1,20 \pm 0,16	1,30 \pm 0,03	1,33 \pm 0,08	

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4 - Alterações patológicas macroscópicas no fígado e no baço:

Algumas alterações patológicas foram observadas no baço e fígado dos animais infectados, principalmente com as amostras mais virulentas.

Alterações macroscópicas nos órgãos dos animais infectados com a amostra WT foram vistas desde o 5º dia pi, quando já foi possível observar pequenas lesões granulomatosas no baço, até o 21º dia, quando, além destas lesões, também se observou a ausência de coloração característica nos dois órgãos. Para as amostras mutantes YopE⁻ e YopM⁻, também pôde-se notar, logo a partir do 7º, embora em maior grau a partir do 14º dia pi, a presença de pequenas lesões granulomatosas e coloração desbotada dos órgãos. Alguns animais infectados com a amostra YopM⁻ também apresentaram, no 21º dia pi, exsudato peritoneal opalescente. Vale também registrar que os animais infectados com as amostras WT, YopE⁻ e YopM⁻ tinham muita dificuldade em sobreviver até o 21º dia de infecção, e quando o faziam era com o estado físico bastante debilitado. Por outro lado, os animais infectados com a amostra YopH⁻ ou com a amostra YpIII sobreviveram com tranquilidade durante o período de estudo e muito raramente apresentaram alterações patológicas macroscópicas no baço ou fígado.

5 - Análise histológica do baço e fígado:

Cortes histológicos do baço e fígado de animais infectados com a amostra WT e de animais não infectados (controles) foram preparados a fim de caracterizar a natureza da lesão causada pela infecção. Esta amostra bacteriana foi escolhida para a realização desta análise por ser a mais virulenta e, portanto, ter induzido as mais relevantes alterações patológicas macroscópicas e no peso destes órgãos. Como estas alterações foram mais significativas, com todas as amostras, no 14º dia pi, escolheu-se este dia para fazer este experimento.

Os cortes do baço dos animais controles revelaram tecido esplênico circundado por delgado epitélio pavimentoso simples e por uma cápsula de tecido conjuntivo rico em fibras de colágeno. O tecido estava perfeitamente subdividido em polpa branca, composta por agregados de células linfóides dispostas como uma bainha cilíndrica e envolvendo a artéria esplênica, e polpa vermelha, composta por numerosos sinusóides vasculares de parede fina, separados pelos cordões esplênicos. Estes cordões apresentaram aspecto esponjoso e constituíam-se principalmente por macrófagos. Já os cortes dos animais infectados revelaram congestão da polpa vermelha com destruição total ou parcial dos folículos linfóides, formação de áreas necróticas e presença de neutrófilos e plasmócitos por toda a polpa branca e vermelha. As células linfocitárias da polpa branca, muitas vezes indistintas, estavam total ou parcialmente substituídas por células neutrofílicas e tanto a polpa branca quanto a vermelha apresentavam-se mais fibrosas (Figura 4).

Microscopicamente, os fígados dos animais do grupo controle apresentaram aspecto de normalidade, sendo compostos por placas de hepatócitos entremeados por sinusóides que representam os capilares sanguíneos de luz ampla. As placas de hepatócitos e sinusóides se estenderam a partir do espaço porta (representado por artéria). Os ductos biliares foram reconhecidos pelo epitélio que variou de cúbico a cilíndrico. Após a infecção o arcabouço hepático apresentou áreas desestruturadas, com intenso desarranjo lobular. As placas de hepatócitos e sinusóides não mais se estenderam a partir do espaço porta, mas formaram aglomerados celulares sem orientação definida. Os hepatócitos se apresentaram muitas vezes tumefeitos e com citoplasma granuloso e menos basófilo. Observou-se também escassas e pequenas áreas compostas por células leucocitárias e restos celulares, o que denota pequenos abscessos próximos ao sistema portal, além de vasos sanguíneos dilatados e congestos (Figura 5).

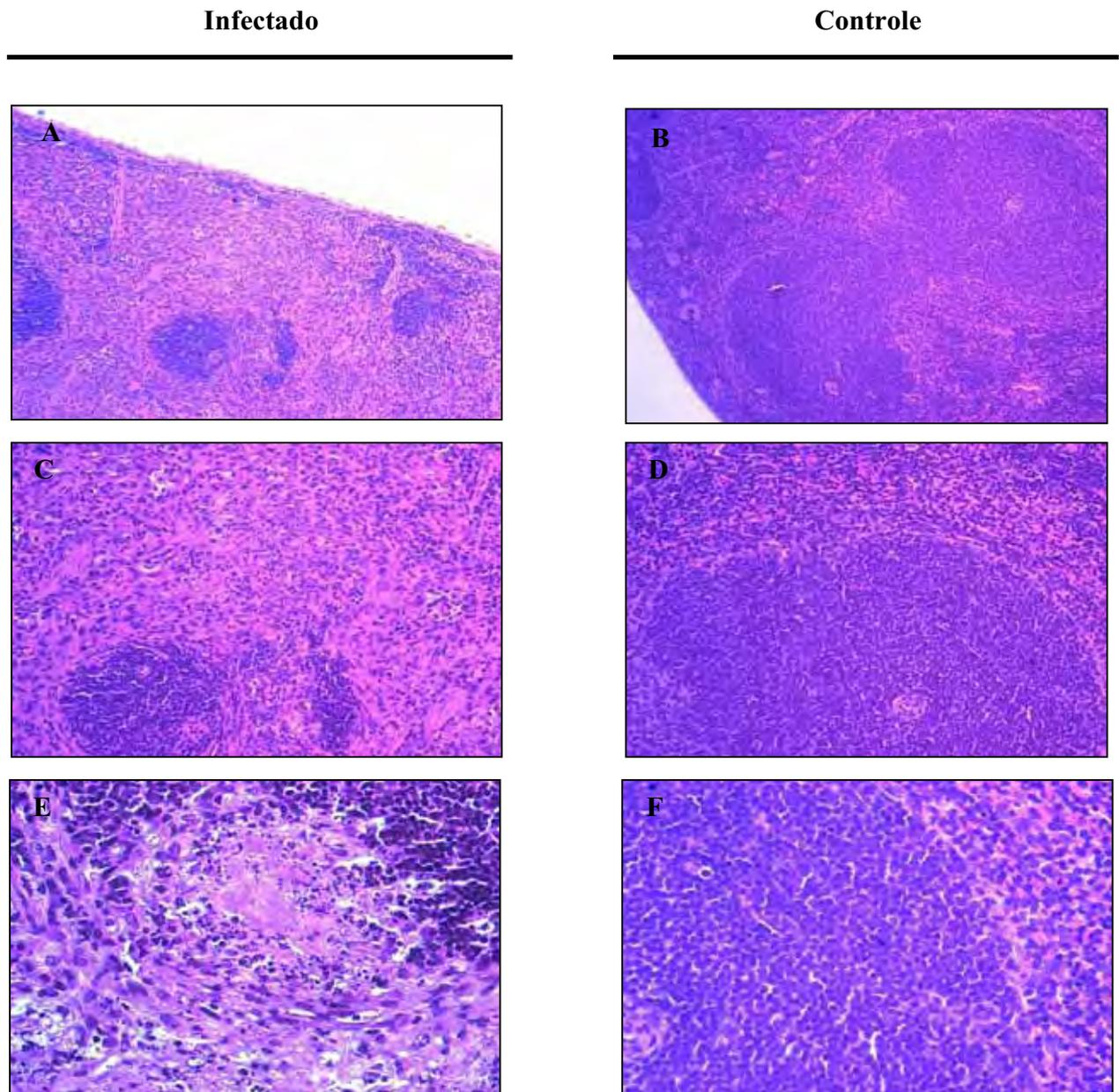


Figura 4 - Análise histológica de baço após infecção intravenosa com amostra selvagem (WT) de *Y. pseudotuberculosis*. Os órgãos foram retirados de camundongos BALB/c infectados e não infectados no 14º dia pós-infecção. Os cortes (5 µm) foram corados com hematoxilina e eosina (HE). As figuras mostradas representam os aumentos de 100x (A e B), 200x (C e D) e 400x (E e F).

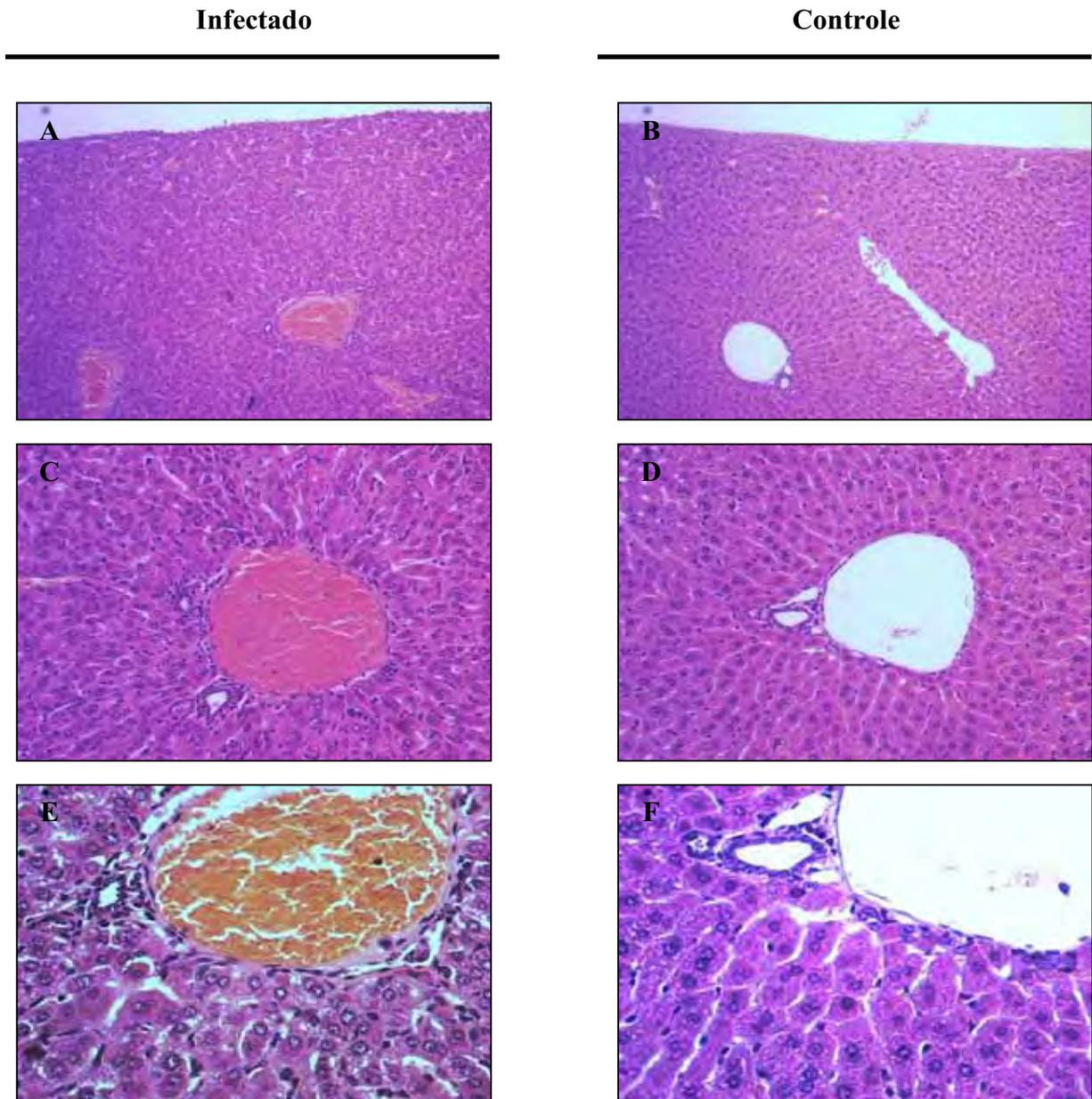


Figura 5 - Análise histológica de fígado após infecção intravenosa com amostra selvagem (WT) de *Y. pseudotuberculosis*. Os órgãos foram retirados de camundongos BALB/c infectados e não infectados no 14^o dia pós-infecção. Os cortes (5 μ m) foram corados com hematoxilina e eosina (HE). As figuras mostradas representam os aumentos de 100x (A e B), 200x (C e D) e 400x (E e F).

6 – Análise fenotípica das subpopulações de linfócitos T esplênicos:

As populações de LT, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, foram quantificadas no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dias após a infecção com a amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis* (WT), com as respectivas mutantes defectivas na secreção da YopE, YopH e YopM e com a amostra curada do plasmídeo de virulência. As mesmas populações de linfócitos, porém provenientes de animais não infectados, também foram quantificadas e os valores obtidos serviram como controles. Os resultados apresentados correspondem aos números absolutos de LT x 10⁶ por baço (Figura 6 / Tabela 5).

Todas as amostras, com exceção da YopH⁻, causaram diminuição de uma ou mais populações linfocitárias estudadas. A amostra YopH⁻ foi a única a promover aumento significativo no número de linfócitos.

Durante a infecção com a amostra WT observou-se uma diminuição no número dos LT-CD3⁺ em todos os dias estudados e esta diminuição se refletiu tanto na população CD3⁺CD4⁺ quanto na população CD3⁺CD8⁺. Os menores valores ocorreram no 14^o dia pi para ambas as populações (diminuição de 7,4 vezes na população CD3⁺CD4⁺ e de 7,1 vezes na população CD3⁺CD8⁺, em relação aos valores apresentados pelos animais não infectados).

A amostra YopE⁻ foi capaz de diminuir o número de LT-CD3⁺ apenas no 14^o e 21^o dia pi. A população de LT CD3⁺CD4⁺ sofreu redução significativa apenas no 14^o dia pi (13,4 vezes menor que os controles) enquanto que a população CD3⁺CD8⁺ foi reduzida tanto no 14^o quanto no 21^o dia pi, sendo novamente os menores valores observados no 14^o dia pi (12,6 vezes menor).

O número de LT-CD3⁺ dos animais infectados com a amostra YopM⁻ foi reduzindo gradativamente a partir do 7^o dia pi e, portanto, alcançou os menores valores no 21^o dia pi. Vale ressaltar que os valores obtidos neste dia foram os menores observados dentre todas as amostras estudadas e em todos os dias avaliados. A população CD3⁺CD4⁺ começou a reduzir logo no 7^o dia pi e a população CD3⁺CD8⁺ somente a partir do 14^o dia pi. No 21^o dia pi estas populações apresentavam, respectivamente, valores 50,3 e 56,5 vezes menores que os valores apresentados pelos animais controles.

A infecção com a amostra YopH⁻ revelou um resultado completamente oposto aos apresentados pelas outras amostras bacterianas. Durante a infecção com esta amostra houve um aumento no número dos LT-CD3⁺ em todos os dias do experimento. Este aumento se refletiu na população CD3⁺CD4⁺ apenas no 5^o (1,2 vezes maior) e no 7^o (1,3 vezes maior) dia pi, e na população CD3⁺CD8⁺ em todos os dias (maior aumento ocorreu no 5^o dia pi: 1,4 vezes em relação aos controles).

Os animais infectados com a amostra YpIII também apresentaram redução no número de LT-CD3⁺ esplênicos no 5^o, 7^o e 21^o dia pi, porém esta redução, além de mais branda, refletiu-se apenas na subpopulação CD3⁺CD4⁺.

A população de LT-CD4 foi predominante sobre a população de LT-CD8 durante todo período de infecção observado, com as cinco amostras estudadas. O mesmo ocorreu com as células dos animais não infectados.

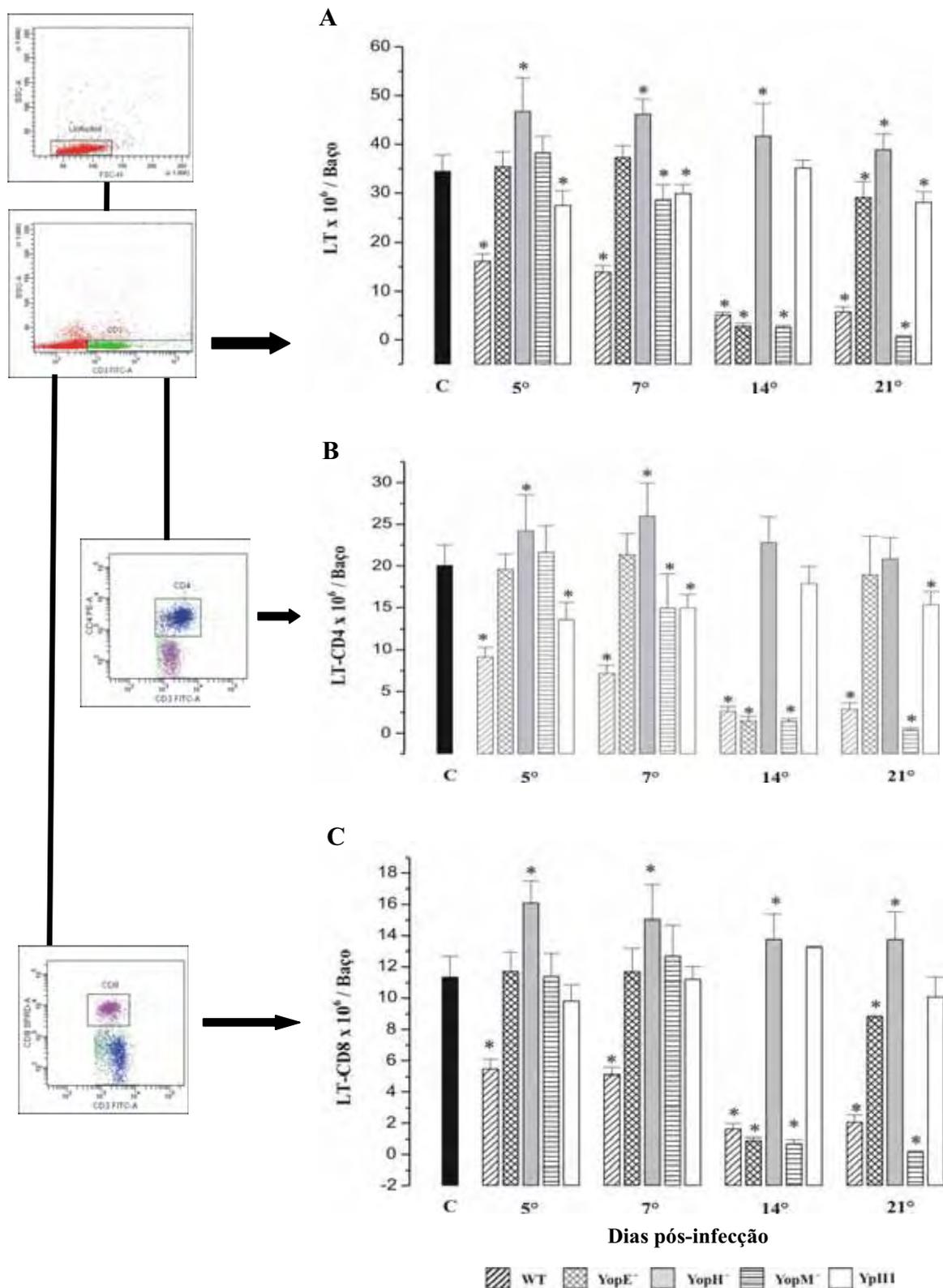


Figura 6 - Quantificação dos linfócitos T (LT) (A) e subpopulações, LT-CD4 (B) e LT-CD8 (C), durante infecção com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Camundongos BALB/c foram sacrificados no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia após a infecção e os LT esplênicos e suas subpopulações quantificadas através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados apresentados correspondem às médias \pm SD do número absoluto de linfócitos ($\times 10^6$) por baço ($n = 6$ animais por dia).

C - Média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento.

* Significativo em relação aos animais controles ($p < 0,05$)

Tabela 5 - Número absoluto de linfócitos T e das subpopulações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, por baço, no decorrer da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* (os valores mostrados representam médias \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia):

Amostra bacteriana	População linfocitária	Nº de linfócitos / baço (x 10 ⁶)				
		Dias pós-infecção				Controles
		5º	7º	14º	21º	
WT	CD3	16,2 \pm 1,4*	14,0 \pm 1,3*	5,2 \pm 0,5*	5,8 \pm 1,0*	34,5 \pm 3,4
	CD4	9,2 \pm 1,1*	7,2 \pm 0,9*	2,7 \pm 0,5*	2,9 \pm 0,7*	20,1 \pm 2,4
	CD8	5,5 \pm 0,6*	5,1 \pm 0,4*	1,6 \pm 0,3*	2,1 \pm 0,5*	11,3 \pm 1,3
YopE ⁻	CD3	35,4 \pm 3,0	37,4 \pm 2,3	2,9 \pm 0,5*	29,2 \pm 3,2*	
	CD4	19,6 \pm 1,8	21,4 \pm 2,5	1,5 \pm 0,5*	19,0 \pm 4,6	
	CD8	11,7 \pm 1,2	11,7 \pm 1,5	0,9 \pm 0,1*	8,8 \pm 0,05*	
YopH ⁻	CD3	46,8 \pm 6,8*	46,2 \pm 3,1*	41,7 \pm 6,6*	38,9 \pm 3,2*	
	CD4	24,2 \pm 4,3*	26,1 \pm 4,0*	22,9 \pm 3,0	20,9 \pm 2,5	
	CD8	16,1 \pm 1,4*	15,1 \pm 2,2*	13,8 \pm 1,6*	13,8 \pm 1,8*	
YopM ⁻	CD3	38,3 \pm 3,4	28,6 \pm 3,1*	2,6 \pm 0,3*	0,7 \pm 0,2*	
	CD4	21,7 \pm 3,2	15,0 \pm 4,1*	1,4 \pm 0,3*	0,4 \pm 0,2*	
	CD8	11,4 \pm 1,5	12,7 \pm 2,0	0,7 \pm 0,3*	0,2 \pm 0,05*	
YpIII	CD3	27,5 \pm 2,9*	29,9 \pm 1,8*	35,2 \pm 1,5	28,1 \pm 2,1*	
	CD4	13,6 \pm 2,0*	15,0 \pm 1,6*	17,9 \pm 2,0	15,4 \pm 1,5*	
	CD8	9,8 \pm 1,1	11,2 \pm 0,8	13,3 \pm 0,1	10,1 \pm 1,2	

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

7 - Detecção intracelular das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β :

Os resultados descritos a seguir referem-se às medianas das intensidades de fluorescência das respectivas citocinas obtidas a partir de linfócitos esplênicos dos animais infectados com as diferentes amostras bacterianas e dos animais não infectados (controles), ambos estimulados *in vitro* com PMA e ionomicina.

Durante a infecção com todas as amostras, a maioria quase absoluta das alterações significativas na produção das citocinas pelos LT-CD4 referiu-se à diminuição da produção e as alterações significativas na produção das citocinas pelos LT-CD8 referiram-se ao aumento da produção.

As quantidades de IL-2 produzidas pelos LT-CD4 não sofreram alterações durante a infecção com as amostras YopE⁻, YopM⁻ e YpIII. Durante a infecção com a amostra WT observou-se diminuição na produção desta citocina tanto no 14^o quanto no 21^o dia pi, sendo que a menor produção ocorreu no 14^o dia pi (1,3 vezes menor que a produção apresentada pelos animais não infectados). Já a infecção com a amostra YopH⁻ proporcionou uma redução na produção de IL-2 pelos LT-CD4 apenas no 7^o dia pi (1,2 vezes menor que os controles). Os LT-CD8 produziram quantidades aumentadas de IL-2 durante infecção com todas as amostras, exceto com a WT, cuja infecção não resultou em alterações significativas. Enquanto a infecção com a amostra YopH⁻ promoveu aumento na produção da IL-2 em todos os dias estudados, a amostra YopE⁻ o fez a partir do 7^o dia pi, a amostra YopM⁻ a partir do 14^o dia pi e a amostra YpIII somente no 21^o dia pi. Os maiores valores foram observados no 7^o dia pi com a amostra YopH⁻ e no 14^o dia pi com a amostra YopE⁻ (aumentos de, respectivamente, 3,5 e 2,7 vezes).

A produção de IL-4 pelos LT-CD4 provenientes dos animais infectados com as amostras WT, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII, foi semelhante àquela apresentada pelos animais não infectados. No entanto, aumentos significativos na produção de IL-4 pelos LT-CD4 aconteceram durante a infecção com a amostra YopE⁻ no 5^o e 21^o dia pi (maior aumento no 5^o dia pi: 1,4 vezes). Esta produção aumentada de IL-4 pelos LT-CD4 representa a única situação em que se observou LT-CD4 de animal infectado produzindo mais citocina do que os animais controles. Avaliando a produção de IL-4 pelos LT-CD8 verificou-se que enquanto a infecção com a amostra WT não ocasionou alteração alguma nos níveis desta citocina, quando comparado aos animais controles, a infecção com a amostra YopH⁻ levou a um aumento na produção da mesma desde o 5^o até o 21^o dia pi (com maior produção no 5^o dia pi: 3,3 vezes maior que os controles). As amostras YopE⁻ e YopM⁻ também induziram aumento na produção de IL-4 pelos LT-CD8

respectivamente a partir do 7° e do 14° dia pi. A amostra YpIII, por sua vez, alterou a produção da IL-4 apenas no 14° dia pi (aumento de 2 vezes em relação aos controles).

As infecções causadas por todas as amostras bacterianas estudadas foram capazes de reduzir significativamente a produção de IL-10 pelos LT-CD4. As amostras WT, YopM⁻ e YpIII suprimiram a produção em todos os dias avaliados. As amostras YopE⁻ e YopH⁻ também provocaram redução na produção de IL-10, porém somente no 7° e 21° dia pi no caso da amostra YopH⁻, e no 5°, 7° e 21° dia pi no caso da amostra YopE⁻. As menores produções de IL-10 pelos LT-CD4 foram observadas no 5° e 7° dias pi com a amostra WT e no 7° dia pi com a amostra YopH⁻ (valores 1,4 vezes menores que os apresentados pelos animais controles). A produção de IL-10 pelos LT-CD8 não sofreu alterações durante a infecção com as amostras WT, YopE⁻ e YpIII. Já durante a infecção com a amostra YopH⁻, a produção desta citocina apresentou-se aumentada em todos os dias do experimento e alcançou seu maior nível no 5° dia pi (aumento de 2,7 vezes). A infecção com a amostra YopM⁻ também propiciou o aumento na produção da IL-10 pelos LT-CD8, mas, neste caso, apenas no 14° e 21° dia pi.

Os resultados obtidos com a citocina IFN- γ reforçaram mais uma vez, e de maneira bastante evidente, que a infecção com todas as (cinco diferentes) amostras bacterianas ao mesmo tempo em que suprime a produção da citocina por parte dos LT-CD4, induz os LT-CD8 a produzi-la em maior quantidade. A produção de IFN- γ pelos LT-CD4 apresentou-se diminuída em todos os dias pi com todas as amostras estudadas. As reduções mais significativas aconteceram entre 5° e o 7° dia pi com as amostras portadoras do plasmídeo de virulência, e estes valores foram cerca de duas vezes menores do que aqueles apresentados pelos animais não infectados. Os LT-CD8 obtidos dos animais infectados com as amostras YopH⁻, YopM⁻ e YpIII produziram mais IFN- γ que os animais controles em todos os dias e, mais uma vez, a maior produção foi observada durante a infecção com a amostra YopH⁻, no 14° dia pi (2,2 vezes maior que os controles). A infecção causada pelas amostras WT e YopE⁻ resultou em aumentos significativos na produção de IFN- γ pelos LT-CD8 do 5° ao 14° dia pi (quando verificou-se praticamente o dobro da produção apresentada pelos animais controles).

Ao analisar os resultados da produção de TNF- α pelos LT-CD4 obtidos dos animais infectados com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻ e YopM⁻, foi possível constatar que todas elas induziram a uma supressão. E, embora esta supressão tenha sido observada nos mais variados dias, ficou claro que as mais relevantes se dão entre o 5° e 7° dia pi. A amostra YpIII não provocou alterações significativas na produção desta citocina pelos LT-CD4. Com relação à produção de TNF- α pelos LT-CD8, observou-se que a infecção com todas as amostras, com exceção da WT, cuja infecção não alterou a produção de TNF- α , resultou em produção

aumentada da citocina em questão. O aumento na produção de TNF- α provocado pela infecção com as amostras YopE⁻ e YopH⁻ pôde ser observado em todos os dias, sendo que os maiores valores, para ambas amostras, ocorreram no 14^o dia pi. A infecção com a amostra YopM⁻ aumentou significativamente os níveis de TNF- α , em relação ao grupo controle, apenas no 21^o dia pi e a infecção com a amostra YpIII o fez do 7^o dia pi em diante. A maior produção de TNF- α aconteceu no 14^o dia pi com a amostra YopH⁻ (2,6 vezes maior que a produção pelos LT-CD8 dos animais controles).

A produção da citocina TGF- β pelos LT-CD4 não se alterou significativamente durante a infecção com as amostras YopE⁻, YopM⁻ e YpIII. Enquanto a infecção com a amostra WT resultou em diminuição da produção do TGF- β pelos LT-CD4 no 7^o, 14^o e 21^o dia pi, a infecção com a amostra YopH⁻ suprimiu a produção da mesma apenas no 21^o dia pi. Embora significativas, as reduções nas quantidades de TGF- β produzidas pelos LT-CD4 foram bastante pequenas em relação à produção apresentada pelos animais não infectados (1,1 vezes menor). Ao avaliar a produção de TGF- β pelos LT-CD8 verificou-se a ocorrência de aumentos significativos durante as infecções com as amostras WT, YopH⁻ e YopM⁻. Os maiores valores nestes casos foram observados entre o 7^o e 14^o dia pi. A infecção com as amostras YopE⁻ e YpIII não acarretou alterações significativas na produção de TGF- β pelos LT-CD8

Os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de todas as citocinas analisadas, durante a infecção com as diferentes amostras bacterianas estudadas e produzidas pelas duas subpopulações linfocitárias de interesse estão apresentados nas Figuras 7 e 8, e Tabelas 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

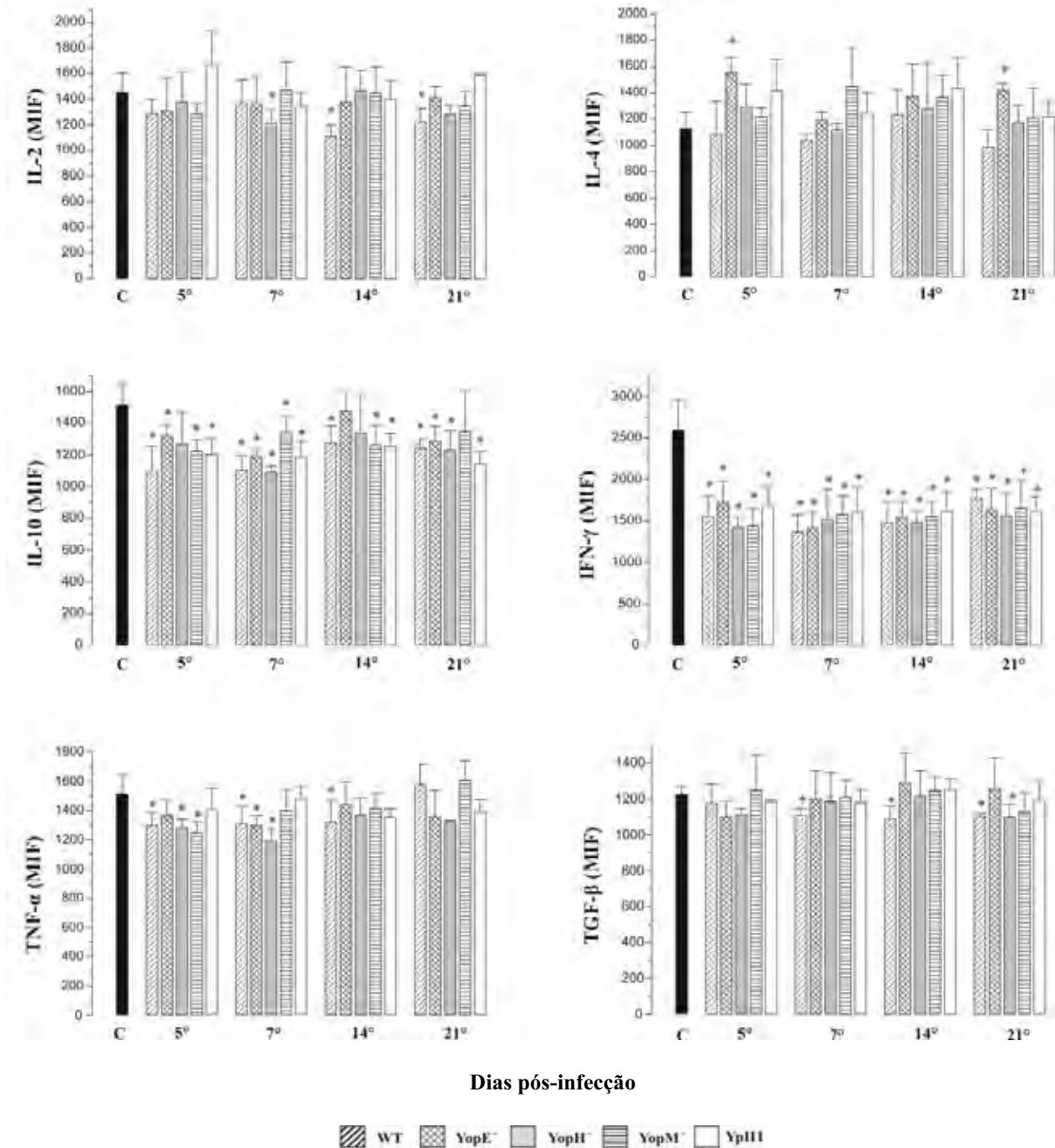


Figura 7 - Cinética da produção de citocinas pelos LT-CD4 esplênicos após infecção intravenosa com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Camundongos BALB/c foram sacrificados no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia após a infecção e as citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β detectadas e quantificadas intracelularmente através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) \pm SD obtidas com os linfócitos estimulados em cultura com PMA + Ionomicina (n = 6 animais por dia).

C - Média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento.

* Significativo em relação aos animais controles (p < 0,05)

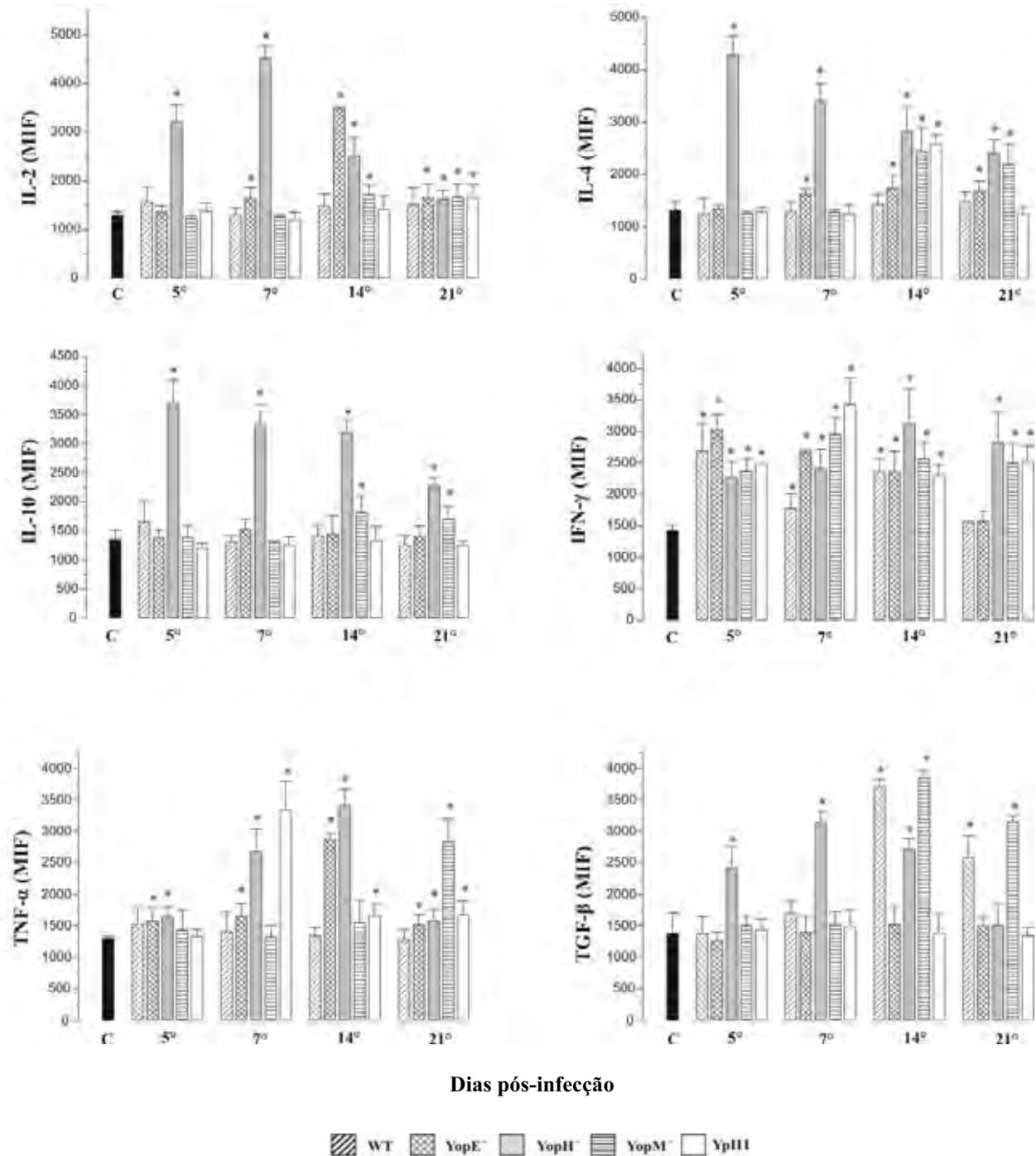


Figura 8 - Cinética da produção de citocinas pelos LT-CD8 esplênicos após infecção intravenosa com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Camundongos BALB/c foram sacrificados no 5^o, 7^o, 14^o e 21^o dia após a infecção e as citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β detectadas e quantificadas intracelularmente através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) \pm SD obtidas com os linfócitos estimulados em cultura com PMA + Ionomicina (n = 6 animais por dia).

C - Média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento.

* Significativo em relação aos animais controles ($p < 0,05$)

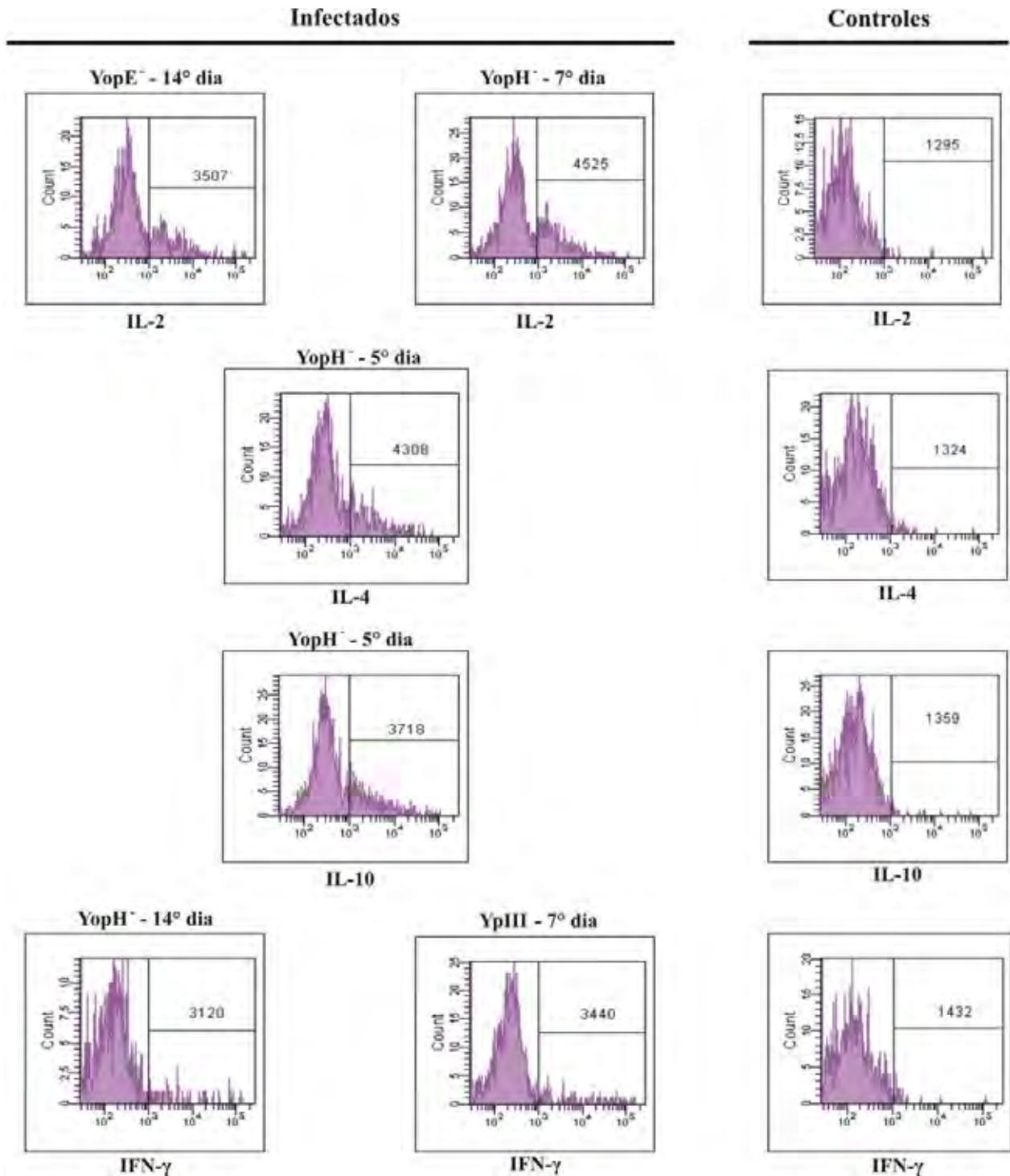


Figura 9 - Histogramas representativos dos aumentos mais significativos na produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ pelos LT-CD8, em relação aos animais controles, durante infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os valores apresentados nos quadrantes dos histogramas correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de seis animais por dia.

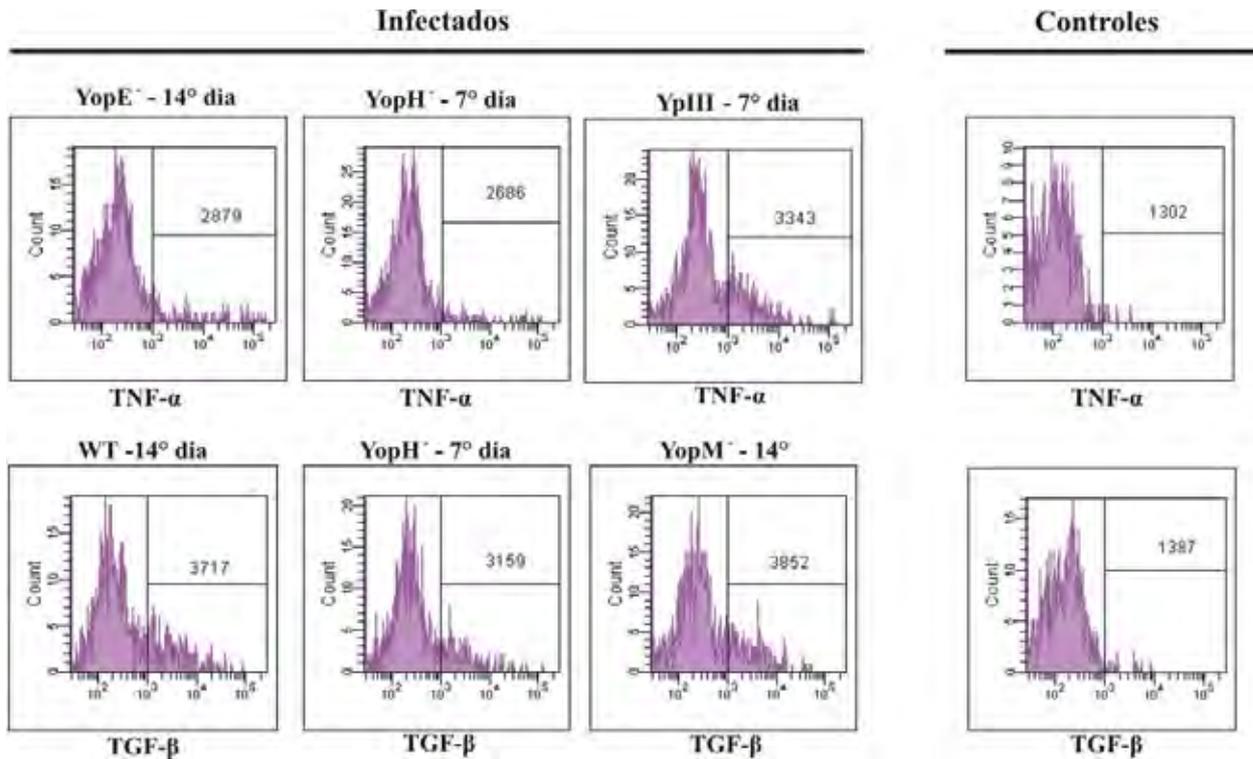


Figura 10 - Histogramas representativos dos aumentos mais significativos na produção das citocinas TNF- α e TGF- β pelos LT-CD8, em relação aos animais controles, durante infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os valores apresentados nos quadrantes dos histogramas correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de seis animais por dia.

Tabela 6 - Detecção intracelular da citocina IL-2 nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia:

Amostra	Linfócito	Dias pós-infecção				Controle
		5º Dia	7º Dia	14º Dia	21º Dia	
WT	CD4	1292 \pm 108	1375 \pm 179	1115 \pm 82*	1227 \pm 103*	1452 \pm 163
	CD8	1570 \pm 308	1305 \pm 146	1488 \pm 247	1520 \pm 338	1295 \pm 71
YopE ⁻	CD4	1314 \pm 253	1375 \pm 207	1381 \pm 274	1416 \pm 85	
	CD8	1370 \pm 119	1633 \pm 233*	3507 \pm 22*	1654 \pm 286*	
YopH ⁻	CD4	1380 \pm 234	1221 \pm 103*	1470 \pm 159	1288 \pm 70	
	CD8	3238 \pm 334*	4525 \pm 260*	2519 \pm 391*	1632 \pm 180*	
YopM ⁻	CD4	1290 \pm 82	1475 \pm 217	1455 \pm 197	1349 \pm 113	
	CD8	1225 \pm 50	1269 \pm 34	1716 \pm 211*	1670 \pm 269*	
YpIII	CD4	1669 \pm 269	1346 \pm 113	1402 \pm 143	1589 \pm 11	
	CD8	1386 \pm 163	1210 \pm 141	1424 \pm 277	1669 \pm 264*	

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Tabela 7 - Detecção intracelular da citocina IL-4 nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia:

Amostra	Linfócito	Dias pós-infecção				Controle
		5º Dia	7º Dia	14º Dia	21º Dia	
WT	CD4	1082 \pm 255	1044 \pm 47	1236 \pm 189	988 \pm 128	1131 \pm 122
	CD8	1258 \pm 288	1290 \pm 175	1428 \pm 200	1488 \pm 177	1324 \pm 174
YopE ⁻	CD4	1555 \pm 117*	1196 \pm 58	1376 \pm 240	1420 \pm 53*	
	CD8	1339 \pm 55	1634 \pm 94*	1743 \pm 244*	1690 \pm 181*	
YopH ⁻	CD4	1295 \pm 173	1122 \pm 44	1283 \pm 346	1178 \pm 129	
	CD8	4308 \pm 351*	3417 \pm 334*	2829 \pm 470*	2410 \pm 251*	
YopM ⁻	CD4	1219 \pm 68	1453 \pm 294	1367 \pm 167	1212 \pm 222	
	CD8	1257 \pm 39	1286 \pm 44	2439 \pm 454*	2199 \pm 390*	
YpIII	CD4	1420 \pm 233	1245 \pm 156	1435 \pm 237	1220 \pm 124	
	CD8	1291 \pm 75	1250 \pm 162	2594 \pm 156*	1238 \pm 142	

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Tabela 8 - Detecção intracelular da citocina IL-10 nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia:

Amostra	Linfócito	Dias pós-infecção				Controle
		5º Dia	7º Dia	14º Dia	21º Dia	
WT	CD4	1099 \pm 156*	1107 \pm 88*	1278 \pm 107*	1245 \pm 57*	1518 \pm 136
	CD8	1659 \pm 360	1315 \pm 106	1421 \pm 182	1263 \pm 158	1359 \pm 157
YopE ⁻	CD4	1324 \pm 66*	1197 \pm 38*	1480 \pm 120	1290 \pm 91*	
	CD8	1390 \pm 129	1533 \pm 174	1460 \pm 307	1414 \pm 171	
YopH ⁻	CD4	1270 \pm 203	1096 \pm 35*	1344 \pm 236	1238 \pm 119*	
	CD8	3718 \pm 381*	3334 \pm 340*	3199 \pm 215*	2282 \pm 136*	
YopM ⁻	CD4	1227 \pm 69*	1346 \pm 99*	1265 \pm 122*	1349 \pm 255	
	CD8	1391 \pm 207	1301 \pm 30	1820 \pm 287*	1707 \pm 222*	
YpIII	CD4	1206 \pm 99*	1191 \pm 100*	1258 \pm 80*	1145 \pm 79*	
	CD8	1205 \pm 86	1263 \pm 135	1336 \pm 247	1255 \pm 77	

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Tabela 9 - Detecção intracelular da citocina IFN- γ nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia:

Amostra	Linfócito	Dias pós-infecção				Controle
		5º Dia	7º Dia	14º Dia	21º Dia	
WT	CD4	1553 \pm 250*	1370 \pm 210*	1484 \pm 247*	1780 \pm 102*	2598 \pm 356
	CD8	2694 \pm 439*	1786 \pm 225*	2362 \pm 218*	1548 \pm 30	1432 \pm 84
YopE ⁻	CD4	1722 \pm 259*	1418 \pm 198*	1548 \pm 186*	1648 \pm 244*	
	CD8	3037 \pm 228*	2677 \pm 21*	2362 \pm 320*	1574 \pm 169	
YopH ⁻	CD4	1434 \pm 108*	1520 \pm 362*	1488 \pm 127*	1566 \pm 268*	
	CD8	2279 \pm 247*	2408 \pm 309*	3120 \pm 564*	2829 \pm 487*	
YopM ⁻	CD4	1441 \pm 207*	1579 \pm 218*	1555 \pm 180*	1652 \pm 335*	
	CD8	2376 \pm 187*	2954 \pm 283*	2566 \pm 270*	2501 \pm 306*	
YpIII	CD4	1678 \pm 254*	1600 \pm 312*	1619 \pm 237*	1620 \pm 167*	
	CD8	2492 \pm 10*	3440 \pm 413*	2308 \pm 169*	2524 \pm 257*	

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Tabela 10 - Detecção intracelular da citocina TNF- α nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia:

Amostra	Linfócito	Dias pós-infecção				Controle
		5º Dia	7º Dia	14º Dia	21º Dia	
WT	CD4	1302 \pm 86*	1310 \pm 119*	1321 \pm 146*	1580 \pm 137	1515 \pm 132
	CD8	1534 \pm 238	1418 \pm 312	1349 \pm 122	1286 \pm 150	1302 \pm 34
YopE ⁻	CD4	1372 \pm 98	1301 \pm 64*	1443 \pm 156	1360 \pm 177	
	CD8	1580 \pm 197*	1652 \pm 203*	2879 \pm 94*	1518 \pm 167*	
YopH ⁻	CD4	1288 \pm 53*	1197 \pm 77*	1374 \pm 112	1330 \pm 5,6	
	CD8	1651 \pm 153*	2686 \pm 354*	3416 \pm 250*	1584 \pm 184*	
YopM ⁻	CD4	1253 \pm 72*	1399 \pm 147	1414 \pm 109	1612 \pm 129	
	CD8	1436 \pm 310	1324 \pm 184	1550 \pm 360	2838 \pm 365*	
YpIII	CD4	1408 \pm 143	1481 \pm 90	1355 \pm 57	1395 \pm 80	
	CD8	1331 \pm 107	3343 \pm 452*	1668 \pm 181*	1677 \pm 220*	

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

Tabela 11 - Detecção intracelular da citocina TGF- β nos LT-CD4 e CD8 esplênicos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência \pm desvio padrão de 6 animais para cada dia:

Amostra	Linfócito	Dias pós-infecção				Controle
		5º Dia	7º Dia	14º Dia	21º Dia	
WT	CD4	1177 \pm 106	1110 \pm 37*	1091 \pm 68*	1104 \pm 16*	1225 \pm 46
	CD8	1382 \pm 266	1709 \pm 179	3717 \pm 107*	2589 \pm 340*	1387 \pm 322
YopE ⁻	CD4	1103 \pm 85	1202 \pm 154	1292 \pm 164	1254 \pm 173	
	CD8	1267 \pm 136	1403 \pm 267	1523 \pm 290	1503 \pm 125	
YopH ⁻	CD4	1114 \pm 31	1189 \pm 158	1218 \pm 138	1100 \pm 72*	
	CD8	2422 \pm 322*	3159 \pm 165*	2716 \pm 172*	1508 \pm 335	
YopM ⁻	CD4	1248 \pm 198	1213 \pm 93	1246 \pm 80	1127 \pm 109	
	CD8	1501 \pm 164	1510 \pm 218	3852 \pm 103*	3157 \pm 95*	
YpIII	CD4	1185 \pm 11	1183 \pm 70	1253 \pm 60	1193 \pm 107	
	CD8	1442 \pm 162	1497 \pm 248	1390 \pm 301	1347 \pm 132	

* Significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

8 – Avaliação da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) nos linfócitos esplênicos:

A ativação do NF- κ B foi avaliada nos extratos nucleares dos linfócitos esplênicos obtidos de animais infectados com as amostras WT, YopE⁻, YopH⁻, YopM⁻, YpIII e YopJ⁻. Extratos nucleares de animais não infectados também foram obtidos e os resultados conseguidos a partir deles serviram como controles (Figura 11).

Devido à já conhecida função inibitória da YopJ sobre o NF- κ B (SCHESSER et al, 1998), decidiu-se inocular um lote de animais com a amostra que não a secreta (YopJ⁻). Caso a YopJ fosse a única responsável pela inibição do NF- κ B, haveria ativação significativa deste fator nuclear durante a infecção com a amostra YopJ⁻ (a qual secreta todas as outras Yops). Mas não foi isso que aconteceu, ao contrário, a infecção com a amostra YopJ⁻ causou diminuição significativa na ativação do NF- κ B em todos os dias avaliados e de forma muito parecida com aquela causada pela infecção com a amostra WT (valores de ativação cerca de duas vezes menores que os valores apresentados pelos animais controles). De acordo com estes resultados ficou claro que, embora a Yop J sabidamente iniba a ativação do NF- κ B, provavelmente alguma das outras Yops também possui esta função inibidora.

Durante a infecção com as amostras YopE⁻, YopH⁻ e YopM⁻ também verificou-se diminuição significativa na ativação do NF- κ B em todos os dias do experimento. Porém, as menores inibições observadas durante as infecções com estas amostras se deram no 7^o dia pi com a amostra YopE⁻ e no 21^o dia pi com a amostra YopH⁻. Isto pode sugerir que estas Yops atuem de forma sinérgica entre si e com a YopJ⁻ no sentido de inibir a ativação do NF- κ B.

Curiosamente, a infecção com a amostra que não secreta Yops (YpIII) também inibiu a ativação do NF- κ B no 5^o dia pi e a tornou praticamente nula do 7^o dia pi em diante. Este resultado evidenciou que não apenas os fatores de virulência codificados pelo plasmídeo, mas também fatores cromossomais contribuem para a inibição do NF- κ B.

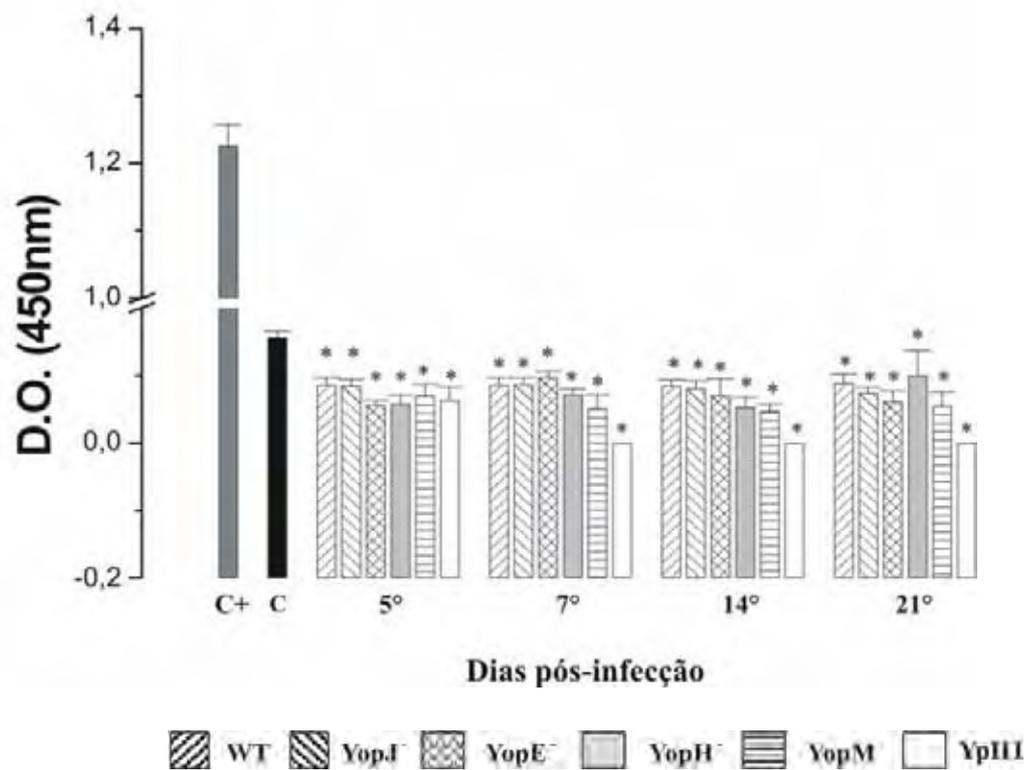


Figura 11 – Influência da infecção com a amostra selvagem (WT), com a amostra curada do plasmídeo de virulência e com as amostras mutantes YopJ⁻, YopE⁻, YopH⁻ e YopM⁻ de *Y. pseudotuberculosis* na ativação do fator de transcrição nuclear κ B. Quatro grupos de seis camundongos BALB/c foram infectados via intravenosa com as amostras acima citadas. Extratos nucleares dos linfócitos destes animais foram obtidos no 5°, 7°, 14° e 21° dias após a infecção com as respectivas amostras e o estado de ativação do NF- κ B foi avaliado usando-se o kit TransAM. Os resultados mostrados representam as médias de dois experimentos feitos em triplicata \pm desvio padrão.

C - Média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento.

C+ - Controle positivo da reação (extratos nucleares de células Jurkat estimuladas com TNF- α).

* Significativo em relação aos animais controles ($p < 0,05$).

9 - Avaliação da atividade citotóxica dos LT-CD8:

A citotoxicidade dos LT-CD8 foi avaliada no 5º, 7º, 14º e 21º dia pi com a amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis*, com a amostra curada do plasmídeo de virulência e com as amostras mutantes defectivas na secreção das Yops E, H e M.

Os LT-CD8 provenientes dos animais infectados com as amostras WT, YopE⁻ e YopM⁻ apresentaram atividade citotóxica muito baixa e, praticamente, apenas no 5º dia pi. Os LT-CD8 obtidos dos animais infectados com a amostra YopH⁻ e YpIII diferiram dos demais uma vez que, logo no 5º dia pós infecção, apresentaram uma atividade citotóxica relativamente alta em comparação com as demais amostras (respectivamente 3,7 e 4,6 vezes maior que a citotoxicidade apresentada pelos LT-CD8 obtidos dos animais infectados com a amostra WT).

Comparando os resultados obtidos no 5º dia pi, já que neste dia todas as amostras apresentaram valores de citotoxicidade, fica evidente a participação da YopH na supressão da atividade citotóxica, pois na sua ausência esta atividade foi bem maior. O fato da amostra que não secreta Yops (YpIII) ter apresentado uma resposta citotóxica muito parecida com a resposta da amostra YopH⁻ reforça ainda mais a hipótese de uma possível ação supressora exercida pelas Yops, em especial pela YopH, sobre a citotoxicidade dos LT-CD8. No entanto, os valores de citotoxicidade observados no 5º dia pi com a amostra WT foram menores do que aqueles observados, neste mesmo dia, com a amostra YopM⁻; que também secreta a YopH. Isto sugere que alguma das outras Yops, talvez a YopM, atue de forma conjunta com a YopH no que diz respeito à supressão da atividade citotóxica dos LT-CD8.

Os LT-CD8 obtidos dos animais controles não apresentaram atividade citotóxica alguma, como já era de se esperar.

As médias das porcentagens de citotoxicidade, obtidas a partir de dois ensaios feitos em triplicata, estão apresentadas na Figura 12 e Tabela 12.

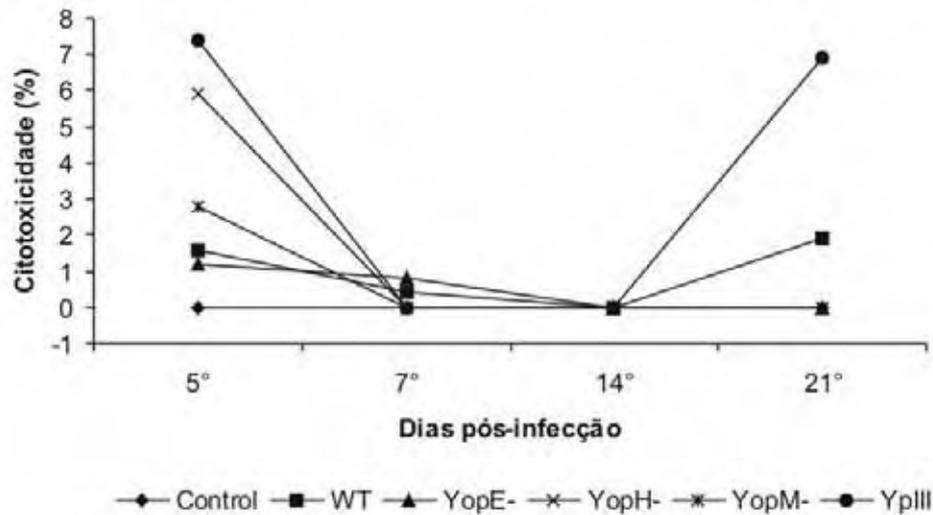


Figura 12 - Ensaio de citotoxicidade: LT-CD8 esplênicos foram obtidos de camundongos BALB/c no 5°, 7°, 14° e 21° dia pós-infecção intravenosa com a amostra selvagem (WT), com a curada do plasmídeo de virulência (YpIII) e com as amostras mutantes de *Y. pseudotuberculosis*. Os LT-CD8 (10^6 células) foram cocultivados por 4 horas com os macrófagos (10^5 células) infectados com a amostra WT (MOI de 10). A citotoxicidade foi determinada através da detecção da enzima LDH no sobrenadante da cocultura usando o kit CytoTox 96 (Promega). Camundongos não infectados serviram como controles. Para cada dia do experimento foram usados “pools” de LT-CD8 obtidos de três animais. Os resultados representam a média de dois ensaios feitos em triplicata.

Tabela 12 – Valores de citotoxicidade (%) apresentados pelos linfócitos T CD8⁺ obtidos de animais infectados com a amostra selvagem, com a amostra curada do plasmídeo de virulência e com as mutantes de *Y. pseudotuberculosis*, nos diferentes dias após a infecção:

Amostra bacteriana	% Citotoxicidade (dias pós-infecção)				Controle
	5°	7°	14°	21°	
WT	1,6	0,4	0,0	1,9	0,0
YopE ⁻	1,2	0,8	0,0	0,0	
YopH ⁻	5,9	0,0	0,0	0,0	
YopM ⁻	2,8	0,0	0,0	0,0	
YpIII	7,4	0,0	0,0	6,9	

V - DISCUSSÃO

Bactérias enteropatogênicas possuem múltiplas estratégias para iniciar sua disseminação e isto independe da rota de infecção utilizada (BARNES et al., 2006). A bactéria gram-negativa *Yersinia* constitui um protótipo para estudar a interação entre bactéria e célula do hospedeiro (HENTSCHKE et al., 2007). As Yops de *Yersinia* estão envolvidas em vários processos bioquímicos que prejudicam a resposta imune celular do hospedeiro, e por isso são importantes para o estabelecimento de uma doença sistêmica (CORNELIS et al., 1998). A importância destas Yops para a virulência das espécies patogênicas de *Yersinia* tem sido estudada em diferentes modelos animais e por diferentes vias de infecção (GRABENSTEIN et al., 2004; GROSDENT et al., 2002). Cepas mutantes de *Yersinia* incapazes de secretar Yops, principalmente a YopE, YopO, YopM e YopJ, apresentam-se atenuadas em pelo menos uma rota de infecção com as várias espécies de *Yersinia* (LEUNG et al., 1990; MONACK et al., 1998; LOGSDON & MECSAS, 2003; TRULZSCH et al., 2004). Tendo conhecimento da capacidade imunomoduladora das Yops sobre a resposta imune do hospedeiro, objetivou-se no presente trabalho avaliar o papel das Yops E, H e M sobre a resposta imune celular de camundongos BALB/c inoculados pela via intravenosa. Para tanto, verificou-se a influência destas Yops sobre as quantidades de LT (CD4 e CD8) no decorrer da infecção e sobre a produção das principais citocinas dos perfis Th1/Th2, e do TGF- β , por estas mesmas células. Além disso, avaliou-se também o papel das Yops E, H e M sobre a ativação do fator nuclear NF- κ B e sobre a atividade citotóxica dos LT-CD8.

O primeiro experimento realizado destinou-se a determinar qual seria a dose sub-letal de cada amostra bacteriana necessária para infectar camundongos BALB/c, pela via intravenosa. Sabe-se que tanto *Y. pseudotuberculosis* quanto *Y. enterocolitica* são capazes de causar doenças altamente infecciosas após introdução no baço e fígado de camundongos pela via intravenosa (BRUBAKER, 2003). Os nossos resultados deixaram claro que a amostra YopH é a amostra menos virulenta, uma vez que a dose infectante para esta amostra foi 20.000 vezes maior que a dose infectante da amostra WT. Estudos de dose letal mediana (DL₅₀) com amostras de *Y. pestis* que não secretam a YopH, inoculadas em camundongos pela via intravenosa, mostraram que estas podiam ser inoculadas em concentrações 3.400.000 vezes maiores do que as amostras que secretam a YopH (KERSCHEN et al., 2004). Já amostras de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* mutantes para o gene *yopH* apresentaram resultados de DL₅₀, após infecção intraperitoneal, 1000 vezes maiores que as amostras secretoras de YopH (GREEN et al., 1995; PERSSON et al., 1999). Fisher et al. (2007) mostraram que a inoculação intranasal da amostra

mutante YopH de *Y. pseudotuberculosis* elevou a DL₅₀ 20 a 30 vezes em relação à amostra WT. Por outro lado, a amostra mutante que consideramos mais virulenta foi a YopM⁻, cuja dose infectante foi 200 vezes maior que a dose da WT. É bastante compreensível que esta amostra seja mais virulenta que as demais, pois ela secreta a YopH e também a YopE que, de acordo com os resultados obtidos nos outros ensaios e com dados apresentados na literatura, atua sinergicamente com a YopH em vários aspectos, potencializando sua virulência. A YopM e a YopE também foram consideradas importantes durante infecção intravenosa de camundongos com *Y. pestis* (LEUNG et al., 1990). Amostras de *Y. pestis* defectivas na secreção da YopE ou da YopM apresentaram-se, respectivamente, 10.625 e 100.000 vezes menos virulentas do que a amostra selvagem, após inoculação intravenosa em camundongos (PERRY & FETHERSTON, 1997; KERSCHEN et al., 2004). Não podemos esquecer também que outros fatores de virulência presentes nas amostras por nós estudadas, assim como outras Yops que não fizeram parte do objetivo deste estudo, podem ter influenciado estes nossos resultados. Além das Yops e do sistema de secreção do tipo III, *Yersinia* possui outros fatores de virulência como PhoP, invasina e YadA, os quais são considerados importantes durante a infecção de camundongos (HERMANN et al., 1993). PhoP desenvolve um papel crucial na replicação da *Y. pseudotuberculosis* dentro dos macrófagos e experimentos com amostras mutantes para o gene *phopP* mostraram que a DL₅₀ destas amostras aumentava 75 vezes em camundongos inoculados pela via intravenosa (GRABENSTEIN et al., 2004). A deleção no gene *yadA* resultou em aumento de cerca de 10 vezes na DL₅₀ de camundongos infectados intraperitonealmente (HAN & MILLER, 1997). Amostras de *Y. pseudotuberculosis* incapazes de secretar YopJ, quando inoculadas pela via intragástrica, apresentaram-se cerca de 64 vezes menos virulentas que a amostra selvagem, e esta diminuição foi atribuída à reduzida capacidade de causar infecção sistêmica (MONACK et al., 1998). A atividade serina-treonina quinase da YpkA é importante para que *Y. pseudotuberculosis* estabeleça uma infecção sistêmica em camundongos (WILEY et al., 2006).

Contudo, comparar os resultados de virulência das diferentes amostras de *Yersinia*, obtidos por diferentes grupos de pesquisa, através de modelos murinos de infecção, é muito difícil, uma vez que os experimentos são realizados com diferentes espécies de *Yersinia*, diferentes linhagens de camundongos, diferentes doses e vias de administração.

Estando padronizadas as doses infectantes das amostras de interesse, realizou-se o experimento de cinética de infecção, a fim de avaliar a capacidade de colonização e persistência destas amostras no baço e fígado dos animais. Para isto, o número de unidades formadoras de colônias nos respectivos órgãos foi determinado no 2º, 5º, 7º, 14º e 21º dia pós-infecção (pi). A

princípio nosso objetivo era avaliar até o 28° dia pi, mas isto tornou-se inviável devido ao fato de que a maioria dos animais infectados com as amostras mais virulentas não sobrevivia até este dia e naqueles infectados com as amostras menos virulentas não era possível recuperar a bactéria dos órgãos a partir do 21° dia pi. Os resultados deste experimento também foram importantes para nos ajudar a escolher quais seriam os melhores dias para realização dos ensaios de avaliação da resposta imune celular. Estudos anteriores revelaram que amostras de *Yersinia pseudotuberculosis* mutantes para o gene *yop* possuem a virulência atenuada após inoculação pelas vias intragástrica, intraperitoneal ou intravenosa (LEUNG et al., 1990; GALYOV et al., 1994; MONACK et al., 1998), e que muitas delas são deficientes no que diz respeito à colonização do intestino e tecidos linfóides de camundongos (LOGSDON & MECSAS, 2003; MONACK et al., 1998). Porém, na maioria dos estudos já realizados, os camundongos foram observados por um período curto e, para atribuir um papel para as Yops na colonização dos órgãos linfóides após infecção pela via hematogênica, é necessário realizar infecções por períodos mais longos. No presente trabalho, a influência das Yops E, H e M na capacidade de colonização e persistência da *Y. pseudotuberculosis* no baço e fígado de camundongos BALB/c, inoculados pela via intravenosa, foi avaliada por um período de três semanas.

A colonização do baço e do fígado dos animais infectados com a amostra WT aumentou gradativamente desde o 2° até o 14° dia pi. Diferentemente do que aconteceu durante a infecção com as outras amostras, com a WT, já no 2° dia pi o número de UFC no baço e no fígado foi bastante elevado. Eram muito poucos os animais infectados com a amostra WT que conseguiam sobreviver até o 21° dia pi, e daqueles que conseguiam não foi possível recuperar a bactéria de nenhum dos órgãos estudados. Neste dia os órgãos destes animais apresentavam características morfológicas muito distintas das características dos órgãos dos animais normais, estando bastante atrofiados (o que ficou bem evidente com os resultados da pesagem dos órgãos) e apresentavam alterações de coloração. Isto pode sugerir que a bactéria WT, após extensa multiplicação e considerável destruição destes órgãos, não mais os consideraram como locais favoráveis à sua permanência. A amostra YopE⁻ colonizou os órgãos principalmente do 5° ao 14° dia pi e a amostra YopH⁻ os colonizou somente do 5° ao 14° dia pi. Esta maior demora para iniciar a colonização e maior rapidez na eliminação das bactérias que não secretam a YopE ou a YopH nos permite sugerir que ambas são importantes no que diz respeito à capacidade de colonizar e persistir no baço e no fígado de camundongos BALB/c após inoculação intravenosa. Esta hipótese foi ainda mais reforçada ao verificarmos que durante a infecção com a amostra YopM⁻, que secreta a YopE e a YopH, a bactéria foi capaz de persistir em ambos os órgãos até o 21° dia pi. A YopE é um importante fator de virulência das espécies patogênicas de *Yersinia* em

modelos de infecção murina (VIBOUD & BLISKA, 2005). Foi recentemente descrito que a YopE é importante na colonização do baço de camundongos após quatro dias de infecção oral, e que a YopT pode assumir este papel na ausência da YopE. As Yops E e T possuem funções redundantes durante a infecção com *Y. pseudotuberculosis*, por isso a YopT torna-se dispensável quando da utilização de modelo murino (VIBOUD et al., 2006). No entanto, vale ressaltar que as cepas de *Y. pseudotuberculosis* do sorotipo O:3 (usadas no presente trabalho), não expressam YopT (VIBOUD & BLISKA, 2005). De qualquer forma é interessante observar a redundância nas funções de diferentes Yops e como isto pode favorecer o sucesso da infecção causada por *Yersinia*. Estudo com *Y. enterocolitica* sorotipo O:8 mostrou que a YopE é importante na colonização do baço e fígado de camundongos (TRULZSCH et al., 2004). Logsdon & Mecsas (2003) sugeriram que duas ou mais Yops possuem funções redundantes na colonização de órgãos. Eles demonstraram que deleções dos genes *yopH* e *yopE* geralmente causam índices menores de colonização no intestino e tecidos linfóides no 2º dia pi e maiores no 5º dia pi. Isto está de acordo com os resultados que obtivemos com as amostras YopE⁻ e YopH⁻, porém no baço e no fígado. Estudos com linfonodos mesentéricos mostraram que cepas defectivas na secreção de apenas YopH, YopJ ou YopE têm capacidade 5 a 10 vezes menor de colonizá-los (LOGSDON & MECSAS, 2003; MONACK et al., 1998). A YopH é necessária para causar infecção após a inoculação da bactéria por diferentes vias (IVANOV et al., 2005; LOGSDON & MECSAS, 2003 ; TRULZSCH et al., 2004) e para a sobrevivência da mesma em vários tecidos (FISHER et al., 2007). A infecção orogástrica com *Y. pseudotuberculosis* deficiente na secreção da tirosina fosfatase YopH resulta em menores índices de colonização dos linfonodos mesentéricos e baço comparado àqueles apresentados pela amostra WT (LOGSDON & MECSAS, 2003). Resultados similares também foram descritos com amostra de *Y. enterocolitica* mutante para a secreção da YopH (TRULZSCH et al., 2004). Pouco se sabe a respeito do papel da YopM na colonização dos tecidos linfóides, no entanto vários estudos têm elucidado a importância dessa Yop quando em sinergia com outra ou como uma Yop com funções redundantes. A influência de outras Yops não avaliadas em nosso trabalho devem ser consideradas ao discutir o papel destas proteínas na capacidade de colonização da *Y. pseudotuberculosis*. A contribuição da YopJ para a virulência parece depender da espécie de *Yersinia* e rota de entrada. O papel da YopJ na infecção por *Y. pseudotuberculosis* tem sido muito estudado pela via oral, mas os resultados publicados são conflitantes (GALYOV et al., 1994 ; MONACK et al., 1998). Amostras de *Y. pseudotuberculosis* que não secretam YopJ não apresentaram diferenças significativas nos índices de colonização do baço e fígado de camundongos C57BL/6 após inoculação pela via intraperitoneal (AUERBUCH & ISBERG,

2007). Estudos da colonização dos pulmões revelaram um importante papel para a YopJ, quando as Yops E, H, O e M estão ausentes, e também para as Yops B e H (FISHER et al., 2007). Por outro lado, YopJ e YopM não influenciaram a colonização do intestino após infecção oral de camundongos BALB/c. Amostras mutantes de *Y. pseudotuberculosis* que não secretam a YpkA são deficientes na colonização do baço durante infecção orogástrica (LOGSDON & MECSAS, 2003).

A eficiente capacidade de colonização que nós observamos com a amostra WT já era esperada, uma vez que ela expressa todos os fatores de virulência tanto cromossomais quanto plasmideais. Trabalhos com camundongos C57BL/6, infectados intraperitonealmente com a amostra WT de *Y. pseudotuberculosis*, mostraram um rápido e expressivo aumento no número de UFC no baço entre 48 e 72 horas após a inoculação (AUERBUCH & ISBERG, 2007).

Os resultados que obtivemos com a amostra YpIII evidenciaram a importância de outros fatores de virulência, que não as Yops, na capacidade de colonização e persistência da *Y. pseudotuberculosis*, principalmente no baço. Talvez os fatores de virulência cromossomais, na ausência total das Yops, possam, por si só, garantir a colonização e persistência da bactéria no baço e fígado dos animais; embora no 21º dia pi esta amostra tenha sido completamente eliminada de ambos os órgãos (o que não se observa na presença concomitante da YopE e YopH). Trabalhos que avaliaram a influência do plasmídeo na colonização do baço ou na sobrevivência no soro após inoculação intravenosa, mostraram que a amostra de *Y. pseudotuberculosis* sem plasmídeo demorou mais para ser eliminada destes locais do que amostras de *Y. pestis* e *Y. enterocolitica* (UNE & BRUBAKER, 1984). Amostras de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* curadas do plasmídeo de virulência conseguiram se replicar nos tecidos murinos apenas transitoriamente, pois logo foram contidas dentro de granulomas e eliminadas pelo hospedeiro (ZHANG & BLISKA, 2005). Balada-Llsat & Mecsas (2006) relataram que fatores de virulência cromossomais são suficientes para promover a colonização de linfonodos mesentéricos após inoculação intragástrica.

A idéia de verificar o peso do baço e do fígado dos animais infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* em estudo surgiu ao percebermos que os tamanhos, assim como as características morfológicas destes órgãos, alteravam-se visivelmente no decorrer da infecção. Desta forma, os resultados obtidos nos serviram como mais um indicador da severidade e progressão da doença. Durante a infecção com as amostras WT, YopE⁻ e YopM⁻ observou-se diminuição no peso dos órgãos no decorrer da infecção. A infecção com a amostra YopM⁻ foi responsável pela maior diminuição no peso do baço dos animais, a qual pôde ser observada no 21º dia pi. Já no caso do fígado, foi durante a infecção com a amostra YopE⁻ que o seu menor

peso foi alcançado (no 14° dia pi). A amostra YopH⁻ não causou diminuição no peso dos órgãos, ao contrário, promoveu um aumento no peso do baço logo no 2° e 5° dia pi. Comparando estes resultados com os resultados do experimento de determinação da dose infectante, que tornou evidente que a amostra YopH⁻ é a menos virulenta, e com o experimento de cinética de infecção, que mostrou que a YopH⁻ não foi capaz de colonizar os órgãos no 2° dia pi e que no 21° dia pi já havia sido completamente eliminada, pode-se deduzir que este aumento seja resultado de uma proliferação das células esplênicas (especialmente dos linfócitos) com o intuito de conter e eliminar esta infecção (dedução que mais tarde seria confirmada com o experimento de quantificação dos LT e suas subpopulações). O peso do fígado dos animais infectados com a amostra YpIII não sofreu alterações em relação ao peso deste mesmo órgão dos animais controles, mas o peso do baço diminuiu no decorrer da infecção. Estes resultados também parecem coerentes se relacionados com o fato desta amostra ter sido mais eficiente na colonização do baço do que do fígado. De uma maneira geral, pudemos observar que a diminuição no peso dos órgãos está diretamente relacionada com a severidade da infecção e por isso foi mais significativa durante a infecção com as amostras mais virulentas (WT, YopE⁻ e YopM⁻). Ao contrário do que observamos com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*, estudos realizados com amostras de *Y. enterocolitica* revelaram que o peso de vários órgãos linfóides, obtidos de diferentes linhagens de camundongos, aumentam após a infecção (AUTENRIETH et al., 1994; HANDLEY et al., 2004). Auerbuch & Isberg (2007) também relataram diminuição no peso do baço e fígado de camundongos infectados intraperitonealmente com *Y. pseudotuberculosis* e aumento no peso destes órgãos em camundongos infectados pela mesma via com *Y. enterocolitica*.

Alterações macroscópicas, principalmente na forma de lesões granulomatosas e coloração desbotada dos órgãos, puderam ser observadas nos órgãos dos animais infectados com as amostras WT, YopE⁻ e YopM⁻. Porém, foi durante a infecção com a amostra WT que estas alterações apareceram mais precocemente (desde o 5° dia pi). Na ausência do plasmídeo de virulência e da YopH os órgãos não apresentaram estas lesões nem alteração na sua coloração característica. A presença e o grau destas alterações estão intimamente relacionados com a virulência da amostra.

A análise histológica do baço e do fígado dos animais nos permitiu visualizar microscopicamente as alterações provocadas pela infecção intravenosa com *Yersinia*, assim como as principais células envolvidas. Os órgãos dos animais infectados com a amostra WT apresentaram diferenças bastante evidentes e significativas em relação aos órgãos dos animais não infectados. Tanto o baço quanto o fígado apresentaram desestruturação em seu arcabouço

normal e presença de infiltrados inflamatórios. No caso do baço, observou-se desestruturação tanto da polpa branca quanto da polpa vermelha, formação de áreas necróticas e aspecto mais fibroso. O fígado apresentou intenso desarranjo lobular com presença de aglomerados celulares sem orientação definida e pequenos abscessos próximos ao sistema portal. Além disso, os vasos sanguíneos se apresentaram extremamente dilatados e congestionados. Análises histológicas de linfonodos mesentéricos, após infecção intragástrica de camundongos BALB/c com uma amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis* sorotipo O:3, revelaram várias áreas de necrose na borda, próximo aos centros germinativos e no paracortex (BALADA-LLASAT & MECASAS, 2006). Logsdon & Mecsas (2003) realizaram análises histológicas de placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c infectados oralmente com uma amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis* ou com amostras mutantes para os genes *yopH*, *yopE* e *yopO*. Os resultados que eles obtiveram, tanto com amostra selvagem quanto com as mutantes, evidenciaram comprometimento da estrutura e influxo de macrófagos e neutrófilos nas placas de Peyer, e presença de abscessos e células apoptóticas nos linfonodos mesentéricos. Zhang & Bliska (2005) também evidenciaram apoptose de macrófagos nos órgãos linfóides de camundongos infectados com *Y. pseudotuberculosis*. Infecção intragástrica com *Y. enterocolitica* causou alterações histológicas nas placas de Peyer, nos linfonodos mesentéricos e no baço. Nas placas de Peyer estas alterações foram caracterizadas pela presença de células mortas, colônias bacterianas, granulócitos e macrófagos, e nos linfonodos mesentéricos e baço pela presença de lesões semelhantes aos granulomas (HANDLEY et al., 2004). Macrófagos e neutrófilos que são recrutados aos órgãos infectados parecem ser importantes na diminuição do número de bactérias, nos estágios iniciais da doença, após infecção intravenosa (BURNETT et al., 2004; CONLAN, 1997). Outro grupo de pesquisa verificou que cerca de quatro dias após inoculação intranasal com *Y. pseudotuberculosis*, os pulmões de camundongos BALB/c apresentavam arquitetura bastante comprometida, além de várias lesões supurativas e necróticas e espaços alveolares fibrinados (FISHER et al., 2007).

Para que um patógeno consiga estabelecer uma infecção ele precisa ser capaz de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Embora existam muitas informações a respeito dos mecanismos usados pelas bactérias patogênicas para evadir das defesas do sistema imune inato dos hospedeiros, pouco se sabe sobre como elas atuam sobre a resposta imune adaptativa. No entanto, é claro que as respostas desenvolvidas pelas células T são essenciais para eliminar patógenos bacterianos, inclusive os do gênero *Yersinia*. Nosso trabalho, ao avaliar o papel das Yops E, H e M de *Y. pseudotuberculosis* sobre as populações de linfócitos T esplênicos, constatou que as quantidades destas células diminuiram durante a infecção com todas as

amostras estudadas, exceto durante a infecção com a amostra YopH⁻. A infecção com a amostra WT causou diminuição tanto da população de CD3⁺CD4⁺ quanto de CD3⁺CD8⁺ em todos os dias do experimento. A amostra YopE⁻ suprimiu a produção de LT CD3⁺CD4⁺ apenas no 14^o dia pi e de CD3⁺CD8⁺ no 14^o e 21^o dia pi. A amostra que não secreta a YopM, mas que secreta a YopE e a YopH, também provocou diminuição de ambas populações de linfócitos a partir do 7^o dia pi. Os animais infectados com a amostra YpIII apresentaram redução apenas no número dos LT CD3⁺CD4⁺. Se levarmos em conta que os LT-CD4 possuem um papel central na ativação de células B, células T e outras células que participam da resposta imune e, portanto, possuem um papel primordial na resposta imune como um todo, fica mais fácil compreender que a *Yersinia* se valha de outros fatores de virulência, que não os plasmídeos, para tentar contê-los. Diferentemente do observado com as demais amostras, durante a infecção com a amostra YopH⁻ ocorreu um aumento no número de ambas as subpopulações de linfócitos e em todos os dias analisados. Frente aos resultados obtidos com os animais infectados com a amostra YopH⁻ tornou-se claro que a YopH é responsável pela diminuição no número dos LT esplênicos, em resposta à infecção intravenosa por *Y. pseudotuberculosis*. O efeito inibitório *in vitro* da YopH sobre a ativação de LT, mediado através do receptor de células T (TCR), já foi descrito anteriormente (YAO et al., 1999). Sauvonnnet et al. (2002a) também atribuíram à YopH papel inibidor sobre a proliferação de LT induzida pela IL-2, e relacionaram este papel da YopH com sua capacidade de inativar a via do fosfatidilinositol-3 quinase. Não podemos excluir a possibilidade da YopH afetar a proliferação de LT devido sua ação sobre o citoesqueleto, uma vez que o citoesqueleto tem sido implicado em vários passos da ativação e proliferação dos LT (ACUTO & CANTRELL, 2000). Lembrando também que os maiores índices de supressão nas subpopulações de LT ocorreram na presença da YopE e da YopH (durante infecção com a amostra YopM⁻), deve-se considerar que a YopE atue em conjunto e de forma importante com a YopH no que diz respeito à inibição da resposta proliferativa dos LT esplênicos. A possibilidade da *Yersinia* atuar inibindo as células apresentadoras de antígenos e, conseqüentemente, prejudicar a ativação dos LT também está sendo estudada, principalmente porque já se sabe que muitas outras bactérias e vírus patogênicos atuam desta forma (HORNEF et al., 2002). Kramer & Wiedig (2005) demonstraram que a interação da *Y. enterocolitica* com células dendríticas teve um efeito negativo sobre a habilidade destas células em estimular a proliferação de LT, e que a YopP (que é análoga à YopJ da *Y. pseudotuberculosis*) pode estar envolvida neste processo. Outros experimentos também mostraram que a incubação de células dendríticas com *Yersinia*, viva ou morta, causa diminuição da expressão de moléculas do MHC de classe II e, portanto, reduzem a habilidade

destas células em estimular a proliferação de LT-CD4 e LT-CD8 (SCHOPPET et al., 2000; SCHOPPET & HUPPERTZ, 2001). Como este efeito pode ser causado por bactéria morta, talvez não haja conexão entre eles e os resultados descritos em nosso trabalho. Recentemente atribuiu-se às Yops E e H importantes propriedades anti-fagocíticas sobre as células dendríticas, e isto pode, conseqüentemente, afetar a capacidade destas células de estimular os LT (ADKINS et al., 2007). Durante infecção com *Yersinia*, uma grande variedade de respostas mediadas por células T pode ser afetada. Um experimento *in vitro* revelou que mesmo quando a proporção de *Y. pseudotuberculosis* por LT é pequena (MOI baixo) a YopH secretada é suficiente para atuar sobre moléculas adaptadoras dos LT (LAT e SLP-76), as quais são fosforiladas em resposta à estimulação do TCR e por isso essenciais à ativação destas células. Além disso, este mesmo trabalho descreveu que quando os LT estão expostos a MOIs mais altos, a YopH atua sobre outras proteínas como, por exemplo, Lck. Desta forma, sugeriu-se que a especificidade da YopH é influenciada por sua concentração (GERKE et al., 2005). Outro experimento *in vitro*, porém usando YopH de *Y. pestis*, mostrou que esta Yop é capaz de paralisar completamente os LT através da desfosforilação de Lck na posição Tyr-394, e portanto, é capaz de prevenir o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa (ALONSO et al., 2004).

Os nossos resultados referentes à imunofenotipagem das subpopulações de LT revelaram um predomínio de LT-CD4 sobre os LT-CD8 durante a infecção com todas as amostras analisadas. Handley et al. (2004) também observaram predomínio de LT-CD4 ao imunofenotipar LT de camundongos BALB/cj, e o oposto, ou seja, predomínio de LT-CD8, em camundongos C57BL/6j, ambos infectados com *Y. enterocolitica*.

Atualmente já é sabido que as Yops interferem na produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção com *Yersinia*. Este conceito foi ainda mais fundamentado a partir de um trabalho de Brubaker (2003) que demonstrou que os níveis de IFN- γ e TNF- α nos órgãos linfóides de camundongos infectados com uma amostra de *Y. pestis* portadora do plasmídeo de virulência eram bem menores do que os níveis apresentados pelos órgãos dos animais infectados com a amostra curada do plasmídeo. No entanto, o mecanismo usado pelas Yops para interferir com a produção das citocinas é multifatorial e complexo.

A análise da produção das principais citocinas do perfil Th1, Th2 e TGF- β , ainda no compartimento intracelular, pelos LT-CD4 e LT-CD8, nos permitiu concluir que, em geral, as Yops E, H e M de *Y. pseudotuberculosis* suprimem a produção das citocinas pelos LT-CD4 e impedem que os LT-CD8 as produzam em quantidades elevadas. Talvez este efeito sobre os LT-CD8 seja uma conseqüência da ação supressora das Yops sobre os LT-CD4, que, uma vez não

sendo capazes de desenvolver suas habilidades eficientemente, também falhariam na ativação dos LT-CD8. Agindo desta forma as Yops impedem que uma resposta imune mais eficiente seja elaborada e, portanto, favorecem a permanência da bactéria no interior do hospedeiro. Wiedig et al. (2005) sugeriram que *Y. enterocolitica* inibe as respostas por LT-CD4.

A supressão na produção de IL-2 pelos LT-CD4 se deve provavelmente à ação das Yops, uma vez que durante a infecção com a amostra YpIII não se observou alteração na sua produção. As Yops que devem estar envolvidas nesta ação supressora são a YopE e a YopM, pois na ausência delas a produção de IL-2 foi igual à apresentada pela amostra YpIII e pelos animais controles. No caso da produção de IL-2 pelos LT-CD8, a presença das Yops parece manter seus níveis iguais aos dos animais controles e isto ficou claro ao observar que apenas durante a infecção com a amostra WT, que secreta todas as Yops, não houve aumento na sua produção. Não é possível atribuir a uma única Yop esta ação, já que na ausência de qualquer uma delas ocorreu aumento na produção de IL-2, porém se considerarmos que foi na ausência da YopH e da YopE que estes aumentos foram detectados com maior frequência e em maior intensidade, podemos sugerir que a ação conjunta de ambas seja relevante para impedir o aumento da produção de IL-2. A atividade GAP da YopE foi descrita como importante, quando em conjunto com outras Yops, na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por células epiteliais infectadas com *Y. pseudotuberculosis* (VIBOUD et al., 2003). A YopH de *Y. pestis* diminuiu dramaticamente a atividade de ERK e a produção de IL-2 induzida pela estimulação do TCR (LIANG et al., 2003).

A produção de IL-4 pelos LT-CD4 não sofreu alterações em função da infecção com as amostras WT, YopH⁻, YopM⁻ e YpIII. Mas, curiosamente, a infecção com a amostra YopE⁻ resultou em aumento na produção da IL-4 por esta subpopulação linfocitária, e isto nos leva a atribuir à YopE um importante papel na regulação da produção de IL-4 pelos LT-CD4. Este foi o único caso em que se observou aumento na produção de citocina pelos LT-CD4. Já foi descrito que LT-CD4 de camundongos BALB/c produzem quantidades maiores de IL-4 do que os LT-CD4 de camundongos C57BL6, e que esta habilidade é genética e não está sob controle dos genes do MHC (NISHIMURA et al., 1997). Da mesma forma que a produção de IL-2, a produção de IL-4 pelos LT-CD8 só não aumentou durante a infecção com a amostra WT, ou seja, todas as Yops devem ser responsáveis pela manutenção dos níveis basais de IL-4. Também neste caso merecem destaque as Yops E e H, pois foi na ausência delas que o aumento na produção de IL-4 aconteceu com maior frequência (em três dos quatro dias analisados no caso da YopE⁻ e em todos os dias no caso da YopH⁻). A YopE tem tanto funções individuais como redundantes e atua sinergicamente com outras Yops durante o complexo ciclo de infecção da

Yersinia (AEPFELBACHER, 2004). Considerando que a IL-4 é responsável pela mudança de classe para IgG1, a produção aumentada que observamos durante infecção com a amostra YopH está de acordo com os valores aumentados de células secretoras de IgG1 observados anteriormente pelo nosso grupo, após infecção intravenosa de camundongos Swiss com esta mesma amostra (MAIA, 2004). Fatores de virulência não plasmídeos também devem atuar, impedindo a produção aumentada de IL-2 e IL-4 pelos LT-CD8, mas de forma muito menos relevante, já que durante a infecção com a amostra YpIII só foram observadas alterações significativas na produção destas citocinas em um dos dias avaliados.

Ao quantificar a produção de IL-10 pelos LT-CD4 pudemos constatar uma supressão durante a infecção com todas as amostras estudadas e em todos os dias pi com as amostras WT, YopM e YpIII. O fato da amostra curada do plasmídeo também ter suprimido a produção de IL-10 pelos LT-CD4 em todos os dias, torna evidente que esta supressão não se deve apenas à ação das Yops. No entanto, como durante a infecção com a amostra YopH esta supressão só foi observada em dois dias de experimento, pode-se dizer que, dentre as Yops estudadas, a YopH seja a mais envolvida neste processo. Recentemente foi descrito que a YopJ contribui para inibir a expressão de IL-10 por macrófagos infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e que esta função deve estar relacionada com a capacidade que a YopJ tem de inibir a via das MAPKs (AUERBUCH & ISBERG, 2007). Com respeito à produção de IL-10 pelos LT-CD8 não se verificou alterações significativas durante a infecção com as amostras WT, YopE e YpIII. Na ausência da YopH e da YopM observou-se aumento na produção de IL-10, o que confere a ambas um importante papel controlador da produção desta citocina pelos LT-CD8. Mais uma vez a YopH parece ser mais atuante, pois na sua ausência houve aumento da produção de IL-10 em todos os dias analisados. O antígeno LcrV, que, assim como as Yops, é secretado pelo sistema de secreção do tipo III, pode estar envolvido neste aumento da produção de IL-10, pois já foi demonstrado que ele atua através do receptor “toll-like” 2 (TLR2), estimulando a produção de IL-10 pelos macrófagos (BRUBAKER, 2003). O aumento dos níveis de IL-10 pode ser favorável à permanência da bactéria no hospedeiro devido às suas propriedades antiinflamatórias.

Avaliando a produção da citocina mais importante do perfil Th1, o IFN- γ , pode-se dizer que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* ao mesmo tempo em que suprime sua produção pelos LT-CD4, não é capaz de impedir que os LT-CD8 o produzam em quantidades aumentadas. Tanto a ação supressora sobre os LT-CD4 quanto a produção aumentada de IFN- γ pelos LT-CD8 não puderam ser atribuídas à presença ou ausência de nenhuma Yop, uma vez que estas alterações foram observadas durante a infecção com todas as amostras em questão e, inclusive,

com a amostra que não secreta Yops. Conhecendo a importância do IFN- γ na ativação das mais diversas células do sistema imune e sabendo que camundongos BALB/c são maus produtores do mesmo, fica mais fácil compreender que a bactéria *Y. pseudotuberculosis* se empenhe em impedir que os LT-CD4 o produzam e que, talvez, as quantidades aumentadas produzidas pelos LT-CD8 ainda sejam pequenas e insuficientes para eliminar a infecção. Kerschen et al. (2004) mostraram que a YopM de *Y. pestis* causa depleção de células NK após infecção intravenosa, e que a depleção destas células estava associada com a produção diminuída de várias citocinas pró-inflamatórias, inclusive IFN- γ . Variação na suscetibilidade de camundongos à infecção por *Yersinia* parece ser dependente da produção de IFN- γ (AUTENRIETH et al., 1994). Camundongos BALB/c infectados com amostra de *Y. pseudotuberculosis* mutante para o gene *yopE* são mais suscetíveis às respostas reguladas por IFN- γ , isto quer dizer que a YopE protege a *Y. pseudotuberculosis* das respostas mediadas por IFN- γ (LOGSDON & MECSAS, 2006).

A supressão que observamos na produção da citocina TNF- α pelos LT-CD4 provavelmente se deve a fatores de virulência plasmidiais (Yops), pois durante a infecção com a amostra YpIII não se observou alterações significativas na produção desta citocina. Como na ausência da YopE e da YopM a supressão na produção de TNF- α pelos LT-CD4 aconteceu em apenas um dos dias analisados, pode-se deduzir que elas estejam envolvidas neste processo. Outra observação interessante foi que a supressão causada pelas diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* sobre a produção de TNF- α pelos LT-CD4 ocorreu principalmente entre o 5^o e o 7^o dia pi. Sabendo que o TNF- α é uma citocina que participa desde a resposta imune inata até a adaptativa, é coerente que a *Y. pseudotuberculosis* atue impedindo sua produção o quanto antes. O fato da infecção com a amostra WT não ter alterado os níveis de produção do TNF- α pelos LT-CD8 aliado ao aumento na produção do mesmo observado durante a infecção com todas as outras amostras, inclusive com a YpIII, significa que a manutenção dos níveis basais desta citocina depende da ação das Yops. Embora não seja possível assegurar ao certo qual das Yops é responsável por isso, é claro que as Yops E e H atuam em conjunto, uma vez que na ausência de uma delas pôde-se observar aumento na produção do TNF- α em todos os dias do experimento, e na presença de ambas (durante infecção com YopM), em apenas um. Já se sabe a algum tempo que a YopJ suprime a produção de TNF- α por macrófagos (BOLAND & CORNELIS, 1998; PALMER et al., 1998; RUCKDESCHEL et al., 1998). O papel inibidor que a YopP de *Y. enterocolitica* tem sobre o NF- κ B pode contribuir para a produção diminuída de TNF- α (RUCKDESCHEL et al., 2001b; ERFURTH, et al., 2004). Sing et al. (2002) descreveram que macrófagos de camundongos infectados com *Y. enterocolitica* produzem quantidades menores de TNF- α e que isto está correlacionado com o aumento na produção de IL-10 induzido

pelo LcrV. O uso de YopB recombinante inibiu significativamente a produção de TNF- α por macrófagos estimulados com LPS (SHARMA et al., 2004).

O TNF- α e o IFN- γ são cruciais em limitar a severidade da infecção por *Yersinia*, sendo que a inibição delas aumenta a habilidade da *Yersinia* em se multiplicar no hospedeiro (AUTENRIETH & HEESEMANN, 1992; NAKAJIMA & BRUBAKER, 1993). Handley et al. (2004) confirmaram que um ambiente Th1, com altos níveis de IFN- γ , predomina durante infecção com *Y. enterocolitica*. O antígeno LcrV inibe, direta ou indiretamente, a expressão de IFN- γ e TNF- α (NAKAJIMA & BRUBAKER, 1993; NAKAJIMA et al., 1995).

O TGF- β é uma citocina que está envolvida na regulação da resposta inflamatória. Há relatos de que a administração de altas concentrações de TGF- β 1 fornece proteção limitada para camundongos C57BL/6 infectados com *Y. enterocolitica* (AUTENRIETH et al., 1996). Nossos resultados mostraram que a produção do TGF- β pelos LT-CD4 foi alterada apenas durante a infecção com a amostra WT, quando se observou supressão na sua produção do 7º dia pi em diante. Embora significativas, as reduções nas quantidades de TGF- β produzido pelos LT-CD4 foram bastante pequenas em relação à produção apresentada por estas mesmas células obtidas dos animais não infectados. As Yops provavelmente atuam nesta supressão, visto que a amostra que não as secreta não alterou a produção de TGF- β , porém qual ou quais delas seriam mais importantes não se pode deduzir, pois na ausência de qualquer uma das três praticamente não houve alteração. A produção aumentada de TGF- β pelos LT-CD8 obtidos dos animais infectados com a amostra WT, que secreta todas as Yops, não nos permite atribuir a estas proteínas um papel modulador da produção da citocina em questão por esta subpopulação linfocitária. Comparando os resultados obtidos com os LT-CD4, os quais apresentaram, embora significativa, uma redução muito pequena na produção do TGF- β em relação aos animais controles, com os resultados obtidos com os LT-CD8, que mostraram que mesmo na presença de todas as Yops a produção de TGF- β aumentou, podemos vislumbrar que esta citocina seja talvez a única, dentre as analisadas, cuja produção não é afetada pela infecção intravenosa por *Y. pseudotuberculosis*. Esta hipótese está de acordo com os resultados do Bohn et al. (1998) que constataram que a administração de TGF- β não causou qualquer diferença na infecção de camundongos BALB/c com *Yersinia*.

O estudo da invasão de *Y. enterocolitica* como adjuvante na vacinação mostrou que esta proteína é capaz de promover a diferenciação dos LT-CD4 Th0 em ambos os subtipos: Th1 e Th2 (BÜHLER et al., 2006). Dados como este ajudam a fundamentar os resultados que observamos com a amostra YpIII durante a dosagem das citocinas (pois mostram que outros fatores de virulência, além das Yops, interferem na produção e secreção das citocinas), além de

evidenciar a não polarização da resposta para nenhum dos perfis (Th1 ou Th2) durante infecção com *Yersinia*; o que nós também observamos.

A ativação do NF- κ B em resposta a estímulos microbianos está normalmente associada com o início da resposta imune, uma vez que ele controla a síntese de citocinas, proteínas de fase aguda e moléculas de adesão (HATADA et al., 2000). No entanto, alguns patógenos tiram proveito do NF- κ B a fim de melhorar sua replicação, sobrevivência e disseminação dentro do hospedeiro. A YopJ de *Y. pseudotuberculosis* inibe a ativação do NF- κ B, prejudicando a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-8 (SCHESSER et al, 1998). Os nossos resultados nos permitem afirmar que outra Yop, além da YopJ, também é capaz de inibir a ativação do NF- κ B. Isto ficou claro a partir dos resultados apresentados pelos animais infectados com a amostra que não secreta a YopJ (YopJ⁻). No entanto, o fato das amostras usadas neste trabalho constituírem mutantes “single”, ou seja, mutantes incapazes de secretar apenas uma Yop, não nos possibilitou eliminar a influência da YopJ durante a infecção com as amostras YopE⁻, YopH⁻ e YopM⁻; o que talvez justifique os baixos valores de ativação apresentados por todas elas. Mas, se considerarmos que as menores inibições foram observadas durante a infecção com a amostra YopE⁻ (no 7^o dia pi) e com a amostra YopH⁻ (no 21^o dia pi), podemos indicar que a YopE, ou a YopH, ou ambas inibam o NF- κ B na ausência da YopJ ou até mesmo sinergizem com esta, caso todas estejam presentes (como, por exemplo, durante a infecção com a amostra WT). Uma publicação recente de Viboud et al. (2006) relata o papel da YopE na inibição da ativação de JNK, ERK e NF- κ B. Antes disso já havia sido descrito o papel inibitório da YopE sobre a produção de IL-1 β por macrófagos infectados com *Y. enterocolitica* (SCHOTTE et al., 2004). Considerando que a expressão do gene desta citocina é dependente da via do NF- κ B, pode-se considerar que estes resultados já constituíam indícios da provável ação inibitória da YopE sobre o NF- κ B. Dados também atuais indicam que a YopJ pode inibir a sinalização pelo NF- κ B em resposta a diversos estímulos e que esta inibição depende de sua atividade de protease desubiquitinizante (ZHOU et al., 2005).

A inibição na ativação do NF- κ B observada durante a infecção com a amostra YpIII revelou que outros fatores de virulência, além das Yops, também são capazes de inibi-lo. Várias observações sugerem que os fatores de *Yersinia* que podem induzir resposta inflamatória dependente da ativação do NF- κ B são muito redundantes. Viboud et al. (2003) demonstraram que a YopB de *Y. pseudotuberculosis* pode induzir a produção de IL-8 graças à ativação do NF- κ B. Schmid et al. (2004) indicaram que a YadA também é capaz de fazer o mesmo que a YopB. Se levarmos em conta que para ativar o NF- κ B *Yersinia* se vale de vários fatores de virulência com funções redundantes, podemos imaginar que para inibi-lo ela faça o mesmo.

A fim de confirmar o papel inibitório da YopE e da YopH e analisar o possível papel da YopM, iremos realizar este mesmo ensaio, porém utilizando extratos nucleares provenientes de animais infectados com as amostras duplos mutantes YopE⁻J, YopH⁻J e YopM⁻J. Desta forma eliminaremos a influência da YopJ de nossos resultados.

A eliminação da infecção por *Yersinia* envolve a ativação da resposta imune adaptativa incluindo os linfócitos T CD4 e CD8 do perfil Th1 (AUTENRIETH et al., 1992; AUTENRIETH et al., 1993a; BOHN & AUTENRIETH, 1996; FALGARONE et al., 1999). A liberação de antígenos heterólogos através do sistema de secreção do tipo III pode induzir tanto a resposta de linfócitos T CD4 quanto de LT-CD8 em camundongos (IGWE et al., 1999). O sistema de secreção do tipo III de amostras atenuadas de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* (criadas através do rompimento de genes associados à virulência) pode ser responsável por fazer com que antígenos sejam apresentados pela molécula MHC de classe-I (MHC-I) e, conseqüentemente, induzam resposta de LT-CD8 (WIEDIG et al., 2005). Recentemente foi descrita a participação do proteassomo na degradação da YopE e na apresentação desta proteína pelo MHC-I; uma vez que o proteassomo é responsável pela geração de peptídeos bacterianos que são apresentados pelo MHC-I. A YopE degradada e apresentada pelo MHC-I seria então reconhecida pelos LT-CD8 e mediará a resposta protetora contra *Yersinia* desenvolvida por esta subpopulação linfocitária (RUCKDESCHEL et al., 2006). Embora as Yops que tenham acesso ao citoplasma possam ser apresentadas aos LT-CD8 pelo MHC-I (STARNBACH & BEVAN, 1994), pouco se sabe a respeito do papel destas proteínas durante a resposta citotóxica dos LT-CD8. Nosso trabalho teve como um dos objetivos verificar a influência das Yops E, H e M de *Y. pseudotuberculosis* sobre a citotoxicidade dos LT-CD8. De acordo com o modelo experimental utilizado (LT-CD8 obtidos de camundongos BALB/c infectados pela via intravenosa e cocultivados com macrófagos infectados *in vitro*, os quais serviram como células apresentadoras de antígenos), detectou-se uma atividade citotóxica muito baixa e até mesmo nula em alguns dias pi. No entanto, comparando os resultados obtidos no 5º dia pi, que foram os mais expressivos, pudemos conferir às Yops função inibidora da atividade citotóxica dos LT-CD8, uma vez que durante a infecção com a amostra YpIII esta atividade foi alta em relação às observadas com as amostras WT, YopE⁻ e YopM⁻. Como durante a infecção com a amostra YopH⁻ observou-se valores de citotoxicidade muito parecidos com aqueles obtidos durante infecção com a amostra YpIII, pode-se pensar que a YopH seja responsável pela inibição da atividade citotóxica dos LT-CD8 de camundongos BALB/c, após inoculação intravenosa de *Y. pseudotuberculosis*. Outros trabalhos também relacionaram as Yops com supressão dos LT-CD8. Já foi mostrado que a YopP de *Y. enterocolitica* inibe o desenvolvimento de uma resposta efetiva por parte dos LT-

CD8 em camundongos oralmente infectados, e que esta inibição deve estar relacionada com a ação da YopP sobre as células dendríticas (ERFURTH et al., 2004). Um estudo *in vitro* demonstrou que a YopP inibe a apresentação de antígeno pelo MHC-I por induzir morte celular programada e inibir a maturação de células dendríticas (TRULZSCH et al., 2005). Mais recentemente relacionou-se esta ação da YopP sobre os LT-CD8 com sua capacidade de induzir morte celular semelhante a necrose em células dendríticas (GRÖBNER et al., 2006). Amostras atenuadas de *Y. enterocolitica*, mutantes para a secreção das Yops H, E, M e O, não foram capazes de induzir uma resposta de LT-CD8 contra o antígeno listeriolisina O, *in vivo* (TRULZSCH et al., 2005). Starnbach & Bevan (1994) descreveram que células infectadas com *Yersinia* apresentam um epítipo da YopH aos LT-CD8 de maneira restrita ao MHC de classe I, e que o fazem independentemente do fato de que estes microrganismos sejam, na maioria das vezes, encontrados extracelularmente e quando no compartimento intracelular, permaneçam totalmente dentro de vacúolos. Algum tempo depois, Falgarone et al. (1999), ao estudarem ratos infectados com *Y. pseudotuberculosis*, mostraram que nem a YopH, nem a YpkA ou a YopJ estão implicadas nesta apresentação, e que os antígenos apresentados aos LT-CD8 no contexto da classe I são desconhecidos. Células T CD8 citotóxicas que reconhecem antígenos derivados de *Yersinia* apresentados de forma restrita ao MHC-I foram obtidas a partir das articulações de pacientes com artrite reativa. No entanto, não há evidências diretas de que estas células T tenham sido exatamente geradas em resposta à infecção por *Yersinia* (HERMANN et al., 1993; UGRINOVIC et al., 1997). Talvez o papel supressivo da YopH sugerido em nosso trabalho possa também ser atribuído à já conhecida função inibidora da YopH sobre a ativação dos LT e LB (YAO et al., 1999).

Muitas questões permanecem sobre a razão pela qual *Yersinia*, que é um patógeno predominantemente extracelular, inibiria o desenvolvimento dos LT-CD8 do hospedeiro. Considerando que os LT-CD8 produzem IFN- γ , e que esta citocina aumenta a capacidade bactericida dos macrófagos, que são células importantes no combate às infecções por *Yersinia*, os LT-CD8 teriam atividade bactericida indireta contra *Yersinia* (TRULZSCH et al., 2005), e por isso também seriam alvos de seus fatores de virulência. Porém, sabe-se que alguns sorotipos de *Y. pseudotuberculosis* são capazes de se replicar no interior dos macrófagos nos estágios iniciais da infecção (PUJOL & BLISKA, 2003).

Os mecanismos de virulência da *Yersinia*, a forma como eles atuam e interferem com os mecanismos de defesa do hospedeiro e também como o hospedeiro responde no sentido de eliminar a infecção constituem alvos de muitos estudos. As ferramentas que *Yersinia* dispõe e que permitem que ela module desde a resposta imune inata até a resposta imune adaptativa,

incluindo até mesmo a expressão de genes, a tornam um excelente modelo de estudo. Considerando que bactérias enteropatogênicas compartilham muitas propriedades, inclusive no que diz respeito a mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, descobertas feitas com as espécies enteropatogênicas de *Yersinia* podem, muitas vezes, contribuir para o estudo das outras enterobactérias. O uso de amostras atenuadas de *Yersinia* como vacinas vivas tem sido muito estudado graças à capacidade que elas têm, através da secreção de antígenos heterólogos pelo sistema de secreção do tipo III, de induzir resposta tanto de LT quanto de LB em camundongos. Aplicações como estas revelam a importância do estudo com *Yersinia*, e do modelo que ela representa, também com enfoque terapêutico.

Fazendo uma análise geral de todos os resultados do nosso trabalho, podemos dizer que as amostras de *Y. pseudotuberculosis* estudadas suprimem a resposta imune celular de camundongos BALB/c, infectados pela via intravenosa. É importante sempre ressaltar a linhagem de camundongos utilizada e a via de inoculação do antígeno, pois há muitas evidências de que as respostas imunes se alteram em função destes fatores. Dentre as Yops estudadas, a YopH, muitas vezes atuando só e em outras em conjunto com a YopE, foi a que esteve mais diretamente envolvida nas alterações observadas. A relevância da YopH para a virulência da bactéria ficou bem evidente logo no primeiro experimento realizado para determinar a dose infectante, quando percebeu-se que na ausência da YopH, a bactéria devia ser inoculada em concentrações muito mais altas para promover infecção. No experimento da cinética de infecção e pesagem dos órgãos foi possível perceber que na ausência da YopH a bactéria demorou mais para colonizar o fígado e o baço, foi mais rapidamente eliminada de ambos, não provocou alterações patológicas macroscópicas nos órgãos nem sintomas físicos de doença e tampouco promoveu redução significativa no peso dos órgãos. O experimento feito para quantificar as subpopulações de LT esplênicos mostrou que a única infecção que não resultou em supressão da produção dos LT CD4 e CD8 foi a provocada pela amostra YopH, e que as maiores reduções nos números destas células se deu quando YopH e YopE estavam presentes. Já a quantificação das citocinas não nos possibilitou diferenciar qual dos padrões, Th1 ou Th2, seria predominante durante a infecção intravenosa de camundongos BALB/c com as respectivas amostras de *Y. pseudotuberculosis*, nem atribuir a exatamente uma Yop, mas sim à ação conjunta das três, o papel supressor ou controlador da produção das citocinas. No entanto, pudemos notar que as maiores quantidades de citocinas produzidas por LT-CD8 ocorreram sempre durante a infecção com amostra YopH. A avaliação da ativação do NF- κ B, embora suscitando dúvidas devido à utilização de amostras mutantes que sempre secretavam YopJ, também nos permitiu sugerir as Yops E e H como potenciais inibidoras do mesmo. Ao avaliar a atividade citotóxica dos LT-CD8

pudemos, mais uma vez, verificar que foi durante a infecção com a amostra YopH⁻ que se observou a maior atividade citotóxica.

Certamente as outras Yops não estudadas neste trabalho e os fatores de virulência não plasmideais, ambos presentes nas amostras avaliadas, também influenciam em todos os resultados acima discutidos e a atuação concomitante de todas elas, como acontece na infecção com a amostra selvagem, constitui a forma mais eficiente de evasão da bactéria da resposta imune do hospedeiro.

Mais experimentos *in vivo* focados em decifrar o papel das Yops e as ações redundantes entre elas irão ajudar a responder muitas questões sobre a virulência da *Yersinia* e permitir o promissor uso terapêutico destas proteínas.

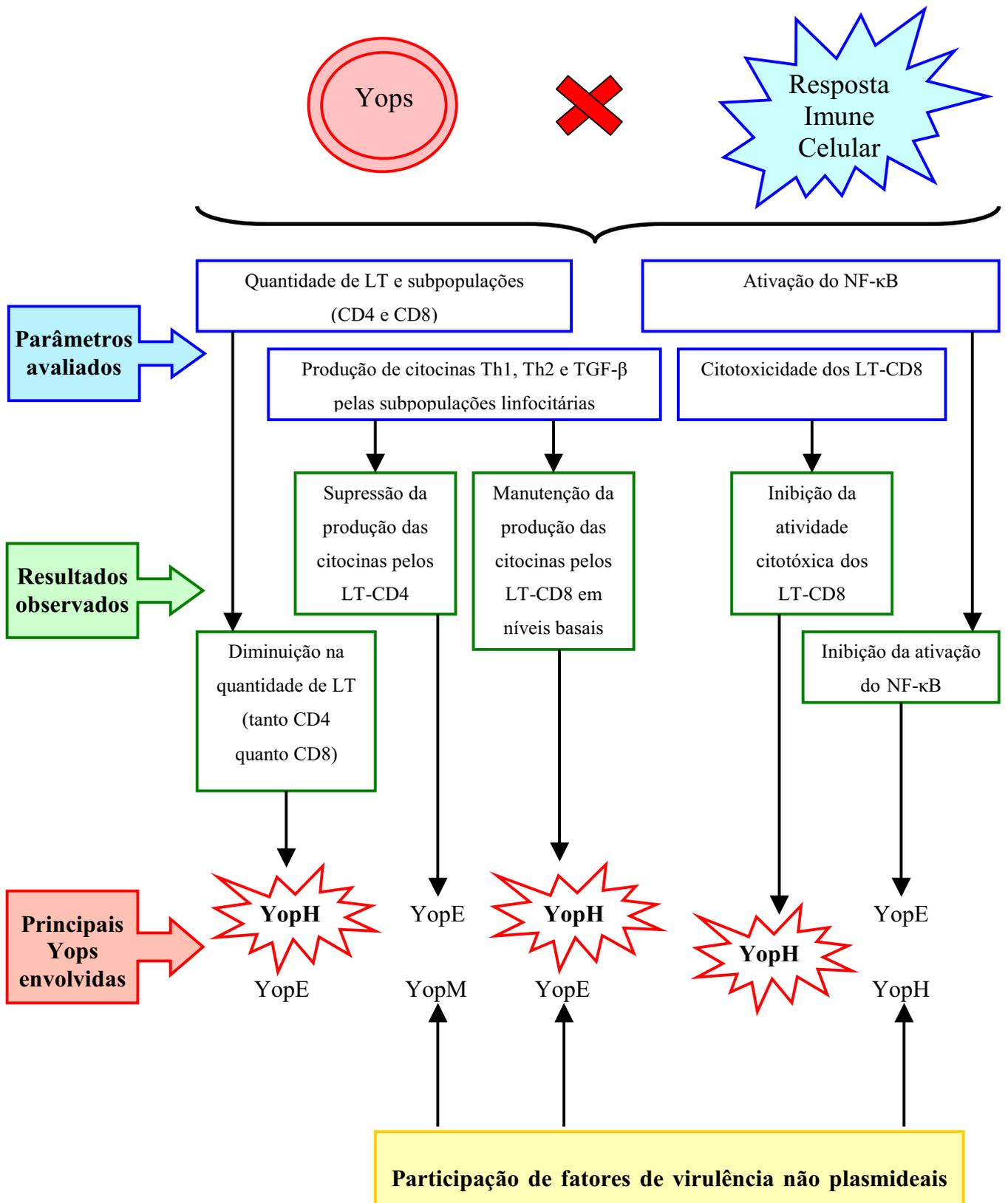


Figura 13 – Esquema representativo dos parâmetros avaliados no presente trabalho, dos respectivos resultados obtidos e das principais Yops envolvidas em cada uma das alterações decorrentes da infecção intravenosa de camundongos BALB/c com *Y. pseudotuberculosis*.

VI - CONCLUSÕES:

- A YopH é o fator de virulência mais importante entre as proteínas efetoras analisadas.
- A presença da YopH contribui para a colonização e persistência da bactéria no baço e fígado dos animais, quando infectados pela via intravenosa.
- A YopE e a YopH são as principais responsáveis pela diminuição na quantidade de linfócitos T no decorrer da infecção.
- As Yops E, H e M são responsáveis pela supressão da produção de citocinas pelos LT-CD4.
- A YopH é importante na modulação da produção de citocinas pelos LT-CD8.
- Não ocorre uma polarização para o perfil Th1 nem Th2 durante infecção intravenosa de camundongos BALB/c com as amostras de *Y. pseudotuberculosis* estudadas.
- As Yops E e H parecem estar envolvidas na inibição do fator nuclear NF- κ B.
- A YopH suprime a atividade citotóxica dos LT-CD8.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003. 553p.

ACUTO, O.; CANTRELL, D. T cell activation and the cytoskeleton. **Annu. Rev. Immunol.**, v.18, p.165-184, 2000.

ADKINS, I.; KÖBERLE, M.; GRÖBNER, S.; BOHN, E.; AUTENRIETH, I.B.; BORGMANN, S. *Yersinia* outer proteins E, H, P and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.297, p.235-244, 2007.

AEPFELBACHER, M. Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of *Yersinia*. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v.152, p.65-77, 2004.

AKARI, H.; BOUR, S.; KAO, S.; ADACHI, A.; STREBEL, K. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappa B-dependent expression of antiapoptotic factors. **J. Exp. Med.**, v.194, p.1299-1311, 2001.

ALIPRANTIS, A.O.; YANG, R.B.; WEISS, D.S.; GODOWSKI, P.; ZYCHLINSKY, A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. **EMBO J.** v.19, p.3325-3336, 2000.

ALONSO, A.; BOTTINI, N.; BRUCKNER, S.; RAHMOUNI, S.; WILLIAMS, S.; SCHOENBERGER, S.P.; MUSTELIN, T. Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by *Yersinia* phosphatase YopH. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.4922-4928, 2004.

ARENCIBIA, I.; SUAREZ, N.C.; WOLF-WATZ, H.; SUNDQVIST, K.G. *Yersinia* invasin, a bacterial beta 1- integrin ligand, is a potent inducer of lymphocyte motility and migration to collagen type IV and fibronectin. **J. Immunol.**, v.159, p.1853-1859, 1997.

AUERBUCH, V.; ISBERG, R.R. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice occurs independently of Toll-like receptor 2 expression and induction of interleukin-10. **Infect. Immun.**, v.75, p.3561-3570, 2007.

AUTENRIETH, I.B.; FIRSCHING, R. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. **J. Med. Microbiol.**, v.44, p.285-294, 1996.

AUTENRIETH, I.B.; TINGLE, A.; RESKE-KUNZ, A.; HEESEMANN, J. T lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cell clones specific for *Y. enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.60, p.1140-1149, 1992.

AUTENRIETH, I.B.; HEESEMAN, J. In vivo neutralization of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.181, p.333-338, 1992.

AUTENRIETH, I.B.; HANTSCHMANN, P.; HEYMER, B.; HEESEMANN, J. Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. **Immunobiology**, v.187, p.1-16, 1993a.

AUTENRIETH, I. B.; BEER, M.; BOHN, E.; KAUFMANN, S. H. E.; HEESEMAN, J. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2590-2599, 1994.

AUTENRIETH, I.B.; VOGEL, U.; PREGER, S.; HEYMER, B.; HEESEMANN, J. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. **Infect. Immun.**, v.61, p.2585-2595, 1993b.

AUTENRIETH, I.B.; KEMPF, V.; SPRINZ, T.; PREGER, S.; SCHNELL, A. Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. **Infect. Immun.**, v.64, p.1357-1368, 1996.

BAICHWAL, V.R.; BAEUERLE, P.A. Activate NF-kappa B or die? **Curr. Biol.**, v.7, p.94-96, 1997.

BALADA-LLSAT, J.Q.; MECSAS, J. *Yersinia* has a tropism for B and T cell zones of lymph nodes that is independent of the type III secretion system. **Plos Pathog.**, v.2, p.816-828, 2006.

BARNES, P.D.; BERGMAN, M.A.; MECSAS, J.; ISBERG, R.R. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. **J. Exp. Med.**, v.203, p.1591-1601, 2006.

BARRAL, A.; BARRAL NETTO, M.; YONG, E. C.; BROWNELL, E. C.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 3442-3446, 1993.

BARZ, C.; ABAHJI, T.N.; TRULZSCH, K.; HEESEMANN, J. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. **FEBS Lett.** v.482, p.139-143, 2000.

BLACK, D.S.; BLISKA, J.B. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. **EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.**, v.16, p.2730-2744, 1997.

BLACK, D.S.; BLISKA, J.B. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. **Mol. Microbiol.**, v.37, p.515-27, 2000.

BLACK, D.S.; MONTAGNA, L.G.; ZITSMANN, S.;BLISKA, J.B. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. **Mol. Microbiol.**, v.29, p.1263-1274, 1998.

BOHN, E.; AUTENRIETH, I. B. IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN- γ production in NK cells and CD4⁺ T cells. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1458-1468, 1996.

BOHN, E.; HEESEMANN, J.; EHLERS, S.; AUTENRIETH, I. B. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3027-3032, 1994.

BOHN, E.; SCHMITT, E.; BIELFELDT, C.; NOLL, A. ; SCHULTE, R.; AUTENRIETH, I. B. Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. **Infect. Immun.**, v.66, n.5, p.2213-2320, 1998.

BOLAND, A.; CORNELIS, G.R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. **Infect. Immun.**, v.66, p.1878-1884, 1998.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. **Clin. Microbiol. Rev.** , v.10, p.257-276, 1997.

BOUR, S.; PERRIN, C.; AKARI, H.; STREBEL, K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.15920-15928, 2001.

BRUBAKER, R.R. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersiniae*: roles of Yops and LcrV (V antigen). **Infect. Immun.**, v.71, p.3673-3681, 2003.

BUHLER, O.T.; WIEDIG, C.A.; SCHMID, Y.; GRASSL, G.A.; BOHN, E.; AUTENRIETH, I.B. The *Yersinia enterocolitica* invasin protein promotes major histocompatibility complex class I- and class II-restricted T-cell responses. **Infect. Immun.**, v.74, p.4322-4329, 2006.

BURNETT, S.H.; KERSHEN, E.J.; ZHANG, J.; ZENG, L.; STRALEY, S.C. Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. **J. Leukoc. Biol.**, v.75, p.612-623, 2004.

CARLOS I.Z.; MONNAZZI, L.G.S.; FALCÃO, D.P.; MEDEIROS, B.M.M. TNF-alpha, H₂O₂ and NO response of peritoneal macrophages to *Yersinia enterocolitica* 0:3 derivatives. **Microbes Infect.**, v.6, p.207-212, 2004.

CONLAN, J.W. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.65, p.630-635, 1997.

CORNELIS, G.R. The *Yersinia* Ysc-Yop “type III” weaponry. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.3, p.742-752, 2002.

CORNELIS, G.R.; WOLF-WATZ, H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukariotic cells. **Mol. Microbiol.**, v.23, p.861-867, 1997.

CORNELIS, G.R.; BOLAND, A.; BOYD, A.P.; GEUIJEN, C.; IRIARTE, M.; NEYT, C.; SORY, M.P.; STAINIER, I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p.1315-1352, 1998.

CRESPO, A.M.C.; FALCÃO, D.P.; ARAÚJO P.M.F.; MEDEIROS, B.M.M. Effects of *Yersinia enterocolitica* derivatives on B lymphocyte activation *in vivo*. **Microbial. Immunol.**, v.46, p.95-100, 2002.

DUBE, P.H.; HANDLEY, S.A.; LEWIS, J.; MILLER, V.L. Protective role of interleukin-6 during *Yersinia enterocolitica* infection is mediated through the modulation of inflammatory cytokines. **Infect. Immun.**, v.72, p.3561-3570, 2004.

DUKUZUMUREMYI, J.M.; ROSQVIST, R.; HALLBERG, B.; AKERSTROM, B.; WOLF-WATZ, H.; SCHESSER, K. The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.35281-35290, 2000.

ERFURTH, S.E.; GROBNER, S.; KRAMER, U. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. **Infect. Immun.**, v.72, p.7045-7054, 2004.

ESPEVIK, T.; FIGARI, I.S.; SHALABY, M. R.; LACKIDES, G. A.; LEWIS, G. D.; SHEPARD, H. M.; PALLADINO, M. A. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. **J. Exp. Med.**, v. 166, p. 571-576, 1987.

EVDOKIMOV, A.G.; ANDERSON, D.E.; ROUTZAHN, K.M.; WAUGH, D.S. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. **J. Mol. Biol.**, v.312, p.807-821, 2001.

FALGARONE, G.; BLANCHARD, H.S.; VIREOULON, F.; SIMONET, M.; BREBAN, M. Coordinate involvement of invasin and Yop proteins in a *Yersinia pseudotuberculosis*-specific class I-restricted cytotoxic T cell-mediated response. **J. Immunol.**, v.162, p.2875-2883, 1999.

FALKOW, S.; ISBERG, R.R.; PORTNOY, D.A. The interaction of bacteria with mammalian cells. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v.8, p.333-363, 1992.

FARGEAS, C.; WU, C. Y.; NAKAJIMA, T.; COX, D.; NUTMAN, T.; DELESPESE, G. Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p.2173-2176, 1992.

FISHER, M.L.; CASTILLO, C.; MECSAS, J. Intranasal inoculation of mice with *Yersinia pseudotuberculosis* causes a lethal lung infection that is dependent on *Yersinia* outer proteins and PhoP. **Infect. Immun.**, v.1, p.429-442, 2007.

GALIOV, E.E.; HAKANSSON, S.; FORSBERG, A.; WOLF-WATZ, H. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. **Nature**, v.361, p.730-732, 1993.

GALYOV, E.E.; HAKANSSON, S.; WOLF-WATZ, H. Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. **J. Bacteriol.**, v.176, p.4543-4548, 1994.

GERKE, C.; FALKOW, S.; CHIEN, Y.H. The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by *Yersinia* to inhibit T cell activation. **J. Exp. Med.**, v.201, p.361-71, 2005.

GOEHRING, U.M.; SCHMIDT, G.; PEDERSON, K.J.; AKTORIES, K.; BARBIERI, J.T. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.36369-36372, 1999.

GRABENSTEIN, J.P.; MARCEAU, M.; PUJOL, C.; SIMONET, M.; BLISKA, J.B. The response regulator PhoP of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for replication in macrophages and for virulence. **Infect. Immun.**, v.72, p.4973-4984, 2004.

GREEN, S.P.; HARTLAND, E.L.; ROBINS-BROWNE, R.M.; PHILIPS, W.A. Role of YopH in the suppression of tyrosine phosphorylation and respiratory burst activity in murine macrophages infected with *Yersinia enterocolitica*. **J. Leuk. Biol.**, v.57, p. 972-977, 1995.

GRÖBNER, S.; AUTENRIETH, S.E.; SOLDANOVA, I.; GUNST, D.S.J.; SCHALLER, M.; BOHN, E.; MÜLLER, S.; LEVERKUS, M.; WESSELBORG, S.; AUTENRIETH, I.B. BORGMANN, S. *Yersinia* YopP-induced apoptotic cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features. **Apoptosis**, v.11, p.1959-1968, 2006.

GROSDENT, N.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; SORY, M.P.; CORNELIS G.R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. **Infect. Immun.**, v.70, p.4165-4176, 2002.

HAKANSSON, S; GALYOV, E.E; ROSQVIST, R.; WOLF-WATZ; H. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of HeLa plasma membrane. **Mol. Microbiol.**, v.20, p.593-603, 1996.

HAMID, N.; GUSTAVSSON, A.; ANDERSSON, K.; MCGEE, K.; PERSSON, C.; RUDD, C.E.; FALLMAN, M. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. **Microb. Pathog.**, v.27, p.231-242, 1999.

HAN, Y.W.; MILLER, V.L. Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.65, p.327-330, 1997.

HANDLEY, S.A.; DUBE, P.H.; REVELL, P.A.; MILLER, V.L. Characterization of oral *Yersinia enterocolitica* infection in three different strains of inbred mice. **Infect. Immun.**, v.3, p.1645-1656, 2004.

HARTLAND, L.; ROBINS-BROWNE, R. Infections with enteropathogenic *Yersinia* species: paradigms of bacterial pathogenesis. **Rev. Med. Microbiol.**, v.9, p.191-205, 1998.

HATADA, E.N.; KRAPPMANN, D.; SCHEIDEREIT, C. NF-Kb and the innate immune response. **Curr. Opin. Immunol.**, v.12, p.52-60, 2000.

HEIN, J.; KEMPF, V. A. J.; DIEBOLD, J.; BÜCHELER, N.; PREGER, S.; HORAK, I.; SING, A.; KRAMER, U.; AUTENRIETH, I. B. Interferon consensus sequence binding protein confers resistance against *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1408-1417, 2000.

HENTSCHKE, M.; TRÜLZSCH, K.; HEESEMAN, J.; AEPFELBACHER, M.; RUCKDESCHEL, K. Serogroup-related escape of *Yersinia enterocolitica* YopE from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. **Infect. Immun.**, v.75, p.4423-4431, 2007.

HERMANN, E.; YU, D.T.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K.H.; FLEISCHER, B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. **Lancet**, v.342, p.646-650, 1993.

HERMANN-MÄRKER, E.; HÖHLER, T. Pathogenesis of human leukocytes antigen B27-positive arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**,v.24, p. 865-881, 1998.

HINES, J.; SKRZYPEK, E.; KAJAVA, A.V.; STRALEY, S.C. Structure-function analysis of *Yersinia pestis* YopM's interaction with alpha-thrombin to rule on its significance in systemic plague and to model YopM's mechanism of binding host proteins. **Microb. Pathog.**, v.30, p.193-209, 2001.

HOEHN, P.; GOEDERT, S.; GERMANN, T.; KOELSCH, S.; JIN, S.; PALM, N.; RUEDE, E.; SCHMITT, E. Opposing effects of TGF-beta 2 on the Th1 cell development of naive CD4+ T cells isolated from different mouse strains. **J.Immunol.**, v.155, p. 3788-3793, 1995.

HORNEF, M.W.; WICK, M.J.; RHEN, M.; NORMARK, S. Bacterial strategies for overcoming host innate immune responses. **Nat. Immunol.**, v.3, p.1033-1040, 2002.

HUNTER, C. A.; BERMUDEZ, L.; BEERNINK H.; WAEGELL, W.; REMINGTON, J.S. Transforming growth factor beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 994-1000, 1995.

IGWE, E.I.; RUSSMANN, H.; ROGGENKAMP, A.; NOLL, A.; AUTENRIETH, I.B.; HEESEMANN, J. Rational live oral carrier vaccine design by mutating virulence-associated genes of *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.67, p.5500-5507, 1999.

IRIARTE, M.; CORNELIS, G.R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. **Mol. Microbiol.**, v.29, p.915-929, 1998.

IVANOV, M.I.; STUCKEY, J.A.; SCHUBERT, H.L.; SAPER, M.A.; BLISKA, J.B. Two substrate-targeting sites in the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase co-operate to promote bacterial virulence. **Mol. Microbiol.**, v.55, p.1346-1356, 2005.

JURIS S.J.; SHAO F.; DIXON J.E. *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. **Cell Microbiol.**, v.4, p.201-211, 2002.

JURIS, S. J.; RUDOLPH, A. E.; HUDDLER, D.; ORTH, K.; DIXON, J. E. A distinctive role for *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p.9431-9436, 2000.

JURIS, S.J.; SHAH, K.; SHOKAT, K.; DIXON, J.E.; VACRATSI, P.O. Identification of otubain 1 as a novel substrate for the *Yersinia* protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry. **FEBS Lett.**, v.580, p.179-183, 2006.

KERSCHEN, E.J.; COHEN, D.A.; KAPLAN, A.M.; STRALEY, S.C. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. **Infect. Immun.**, v.72, p.4589-602, 2004.

KITAMURA, M. NF-kappaB-mediated self defense of macrophages faced with bacteria. **Eur. J. Immunol.**, v.29, p.1647-1655, 1999.

KRAMER, U.; WIEDIG, C.A. *Y. enterocolitica* translocated Yops impair stimulation of T-cells by antigen presenting cells. **Immunol. Lett.**, v.100, p.130-8, 2005.

LEE, V.T; MAZMANIAN, S.K; SCHNEEWIND, O. A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reaction is activated by specific signals. **J. Bacteriol.**, v.183, p.4970-4978, 2001.

LEUNG, K.Y.; REISNER, B.S.; STRALEY, S.C. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. **Infect. Immun.**, v.58, p.3262-3271, 1990.

LIANG, F.; HUANG, Z.; LEE, S.Y.; LIANG, J.; IVANOV, M.I. Aurintricarboxylic acid blocks *in vitro* and *in vivo* activity of YopH, an essential virulent factor of *Yersinia pestis*, the agent of plague. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.41734-41741, 2003.

LIU, H.; SIDIROPOULOS, P.; SONG, G.; PAGLIARI, L.J.; BIRRER, M.J.; STEIN, B.; ANRATHER, J.; POPE, R.M. TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. **J. Immunol.**, v.164, p.4277-4285, 2000.

LOGSDON, L.K.; MECSAS, J. Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. **Infect. Immun.**, v.71, p.4595-4607, 2003.

LOGSDON, L.K.; MECSAS, J. The proinflammatory response induced by wild-type *Yersinia pseudotuberculosis* infection inhibits survival of yop mutants in the gastrointestinal tract and Peyer's patches. **Infect. Immun.**, v.74, p.1516-1527, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Microbiol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.

LUNDGREN, E.; CARBALLEIRA, N.; VASQUEZ, R.; DUBININA, E.; BRANDEN, H.; PERSSON, H.; WOLF-WATZ, H. Invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* activates human peripheral B cells. **Infect. Immun.**, v.64, p.829-835, 1996.

MAIA, J.M.L. **Influência das proteínas “Yops” de *Yersinia pseudotuberculosis* na resposta imune humoral murina.** 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2006.

MEDEIROS, B.M.M.; SOUZA, C.D.; HIGUTI, L.; MAIA, J.M.L.; SILVA, E.E.C. Papel das proteínas “Yops” de *Yersinia pseudotuberculosis* na ativação dos linfócitos B. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.24, p.53-60, 2003.

MEDEIROS, B.M.M.; CANGIANI, E.E.; HIGUTI, L.; SATOMI, L.C.; SOUZA, C.D.; SILVA, A.R.C.; MAIA, J.M.L.; FALCÃO, D.P. Invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* is not polyclonal activator of mouse B lymphocytes. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.27, p.221-227, 2006.

MCDONALD, C.; VACRATISIS, P.O.; BLISKA, J.B.; DIXON, J.E. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. **J. Biol. Chem.** v.278, p.18514-18523, 2003.

MILLS, S. D.; BOLAND, A.; SORY, M-P.; SMISSEN, P. V. D.; KERBOURCH, C.; FINLAY, B. B.; CORNELI, G. R. *Yersinia enterocolitica* induces apoptoses in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.12638-12643, 1997.

MONACK, D.M.; MECSAS, J.; BOULEY, D.; FALKOW, S. *Yersinia*- induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. **J. Exp. Med.**, v.188, p.2127-2137, 1998.

MONACK, D.M.; MECSAS, J.; BOULEY, D.; FALKOW, S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for his cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.94, p.10385-10390, 1997.

MONNAZZI, L.G.S.; CARLOS, I.Z.; MEDEIROS, B.M.M. Influence of *Yersinia pseudotuberculosis* outer proteins (Yops) on interleukin-12, tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by peritoneal macrophages. **Immunol. Lett.**, v.94, p.91-98, 2004.

MORITA, Y.; YAMAMURA, M.; KAWASHIMA, M.; HARADA, S.; TSUJI, K.; SHIBUYA, K.; MARUVAMA, K.; MAKINO, H. Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4⁺ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** V.41, n.9, p.1669-1676, 1998.

MORRIS, S.C.; MADDEN, K.B.; ADAMOVICZ, J.J.; GAUSE, W.C.; HUBBARD, B.R.; GATELY, M.K.; FINKELMAN, F.D. Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. **J. Immunol.**, v.152, p.1047, 1994.

NAGELKERKEN, L.; GOLLOB, K. J.; TIELEMANS, M.; COLFMAN, R. L. Role of transforming growth factor-beta in the preferential induction of T helper cells of type 1 by staphylococcal enterotoxin B. **Eur. J. Immunol.**, v.23, p.2306-2310, 1993.

NAKAJIMA, R.; BRUBAKER, R. R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. **Infect. Immun.**, v. 61, p.23-31, 1993.

NAKAJIMA, R.; MOTIN, V.L.; BRUBAKER, R.R. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. **Infect. Immun.**, v.63, p.3021-3029, 1995.

NAKANE, A.; ASANO, M.; SASAKI, S.; NISHIKAWA, S.; MIURA, T.; KOHANAWA, M.; MINAGAWA, T. Transforming growth factor beta is protective in host resistance against *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 3901-3904, 1996.

NAVARRO, L.; ALTO, N.M.; DIXON, J.E. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. **Curr. Opinion Microbiol.**, v.8, p.21-27, 2005.

NISHIMURA, T.; SANTA, K.; YAHATA, T.; SATO, N.; OHTA, A.; OHMI, Y.; SATO, T.; HOZUMI, K.; HABU, S. Involvement of IL-4-producing Vbeta8.2⁺ CD4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T cells in non-MHC gene-controlled predisposition toward skewing into T helper type-2 immunity in BALB/c mice. **J. Immunol.**, v.158, p.5698-5706, 1997.

ORTH, K.; XU, Z.; MUDGETT, M.B.; BAO, Z.Q.; PALMER, L.E.; BLISKA, J.B.; MANGEL, W.F.; STASKAWICZ, B.; DIXON, J.E. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. **Science**, v.290, p.1594-1597, 2000.

PAGLIARI L.J.; PERLMAN H.; LIU H.; POPE R.M. Macrophages require constitutive NF-kappa B activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. **Mol. Cell. Biol.** v.20, p.8855-8865, 2000.

PALMER, L. E.; HOBBIE, S.; GALÁN, J. E.; BLISKA, J. B. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. **Mol. Microbiol.**, v.27, p.953-965, 1998.

PERSSON, C.; CARBALLEIRA, N.; WOLF-WATZ, H.; FALLMAN, M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. **EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.**, v.16, p.2307-2318, 1997.

PETTERSSON, J.; HOLMSTROM, A.; HILL, J.; LEARY, S.; FRITZH-LINDSTEN, E.; VON EULER-MATELL, A.; CARLSSON, E.; TITBALL, R.; FORSBERG, A.; WOLF-WATZ, H. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. **Mol. Microbiol.**, v.32, p. 961-976, 1999.

PERRY, R.D. ; FETHERSTON, J.D. *Yersinia pestis*-etilogic agent of plague. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, p.35-66, 1997.

PORTNOY, D.A.; MOSELEY, S.L.; FALKOW, S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v.31, p. 775-782, 1981.

PUJOL, C.; BLISKA, J.B. The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.71, p.5892-5899, 2003.

PUJOL, C.; BLISKA, J.B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. **Clin. Immunol.**, v. 114, p. 216-26, 2005.

RANGES, G. E.; FIGARI, I. S.; ESPEVIK, T.; PALLADINO, M. A. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 166, p. 991-998, 1987.

ROEBUCK, K.A. Regulation of interleukin-8 gene expression. **J. Interferon Cytokine Res.** v.19, p.429-438, 1999.

ROSQVIST, R.; FORSBERG, A.; WOLF-WATZ, H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. **Infect. Immun.**, v.59, p.4562-4569, 1991.

RUCKDESCHEL, K.; MANNEL, O.; RICHTER, K.; JACOBI, C. A.; HEESEMANN, J. Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF- κ B suppression and apoptosis induction in macrophages. **Am. Soc. Microbiol.**, v.69, p.7652-7662, 2001a.

RUCKDESCHEL, K.; RICHTER, K.; MANNEL, O.; TRÜLZSCH, K.; ROUOT, B.; HEESEMANN, J. *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. **J. Immunol.**, v.166, p.1823-1831, 2001b.

RUCKDESCHEL, K.; ROGGENKAMP, A.; SCHUBERT, S.; HEESEMANN, J. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. **Infect. Immun.**, v.64, p.724-733, 1996.

RUCKDESCHEL, K.; HARB, S.; ROGGENKAMP, A.; HORNEF, M.; ZUMBIHL, R.; KÖHLER, S.; HEESEMANN, J.; ROUOT, B. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. **J. Exp. Med.**, v.187, p.1069-1079, 1998.

RUCKDESCHEL, K.; MACHOLD, J.; ROGGENKAMP, A.; SCHUBERT, S.; PIERRE, J.; ZUMBIHI, R.; LIAUTARD, J-P.; HEESEMANN, J.; ROUOT, B. *Yersinia enterocolitica*

promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$, p38, and c-Jun NH₂-terminal kinase: correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha production. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.15920-15927, 1997.

SAUVONNET, N.; LAMBERMONT, I.; VAN DER BRUGGEN, P.; CORNELIS, G.R. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Mol. Microbiol.**, v.45, p.805-815, 2002a.

SAUVONNET, N.; PRADET-BALADE, B.; GARCIA-SANZ, J.A., CORNELIS, G.R. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.25133-25142, 2002b.

SCHESSER, K.; FRIHZ-LINDSTEN, E.; WOLF-WATZ, H. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. **J. Bacteriol.** v.178, p.7227-33, 1996.

SCHESSER, K.; SPIIK, A.K.; DUKUZUMUREMYI, J.M.; NEURATH, M.F.; PETTERSSON, S.; WOLF-WATZ, H. The YopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF- κ B activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. **Mol. Microbiol.** v.28, p.1067-1079, 1998.

SCHMID, Y.; GRASSL, G.A.; BUHLER, O.T.; SKURNIK, M.; AUTENRIETH, I.B.; BOHN, E. *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 6780-6789, 2004 .

SCHOPPET, M.; HUPPERTZ, H.I. Differential stimulation of helper and cytotoxic T cells by dendritic cells after infection by *Yersinia enterocolitica* *in vitro*. **Cell. Immunol.**, v.208, p.43-51, 2001.

SCHOPPET, M.; BUBERT, A.; HUPPERTZ, H.I. Dendritic cell function is pertubated by *Yersinia enterocolitica* infection *in vitro*. **Clin. Exp. Immunol.**, v.122, p.316-323, 2000.

SCHOTTE, P.; DENECKER, G.; VAN DEN BROEKE, A.; VANDENABEELE, P., CORNELIS, G.R.; BEYAERT, R. Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.25134-25142, 2004.

SCHREIBER, E.; MATTHIAS, P.; MULLER, M.M.; SCHAFFNER, W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. **Nucleic Acids. Res.**, v.15, p.6419, 1989.

SEDER, R.A.; PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.635-673, 1994.

SHAO, F.; MERRITT, P.M.; BAO, Z.; INNES, R.W.; DIXON, J.E. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. **Cell**, v.109, p.575-588, 2002.

SHAO, F.; VACRATISIS, P.O.; BAO, Z.; BOWERS, K.E.; FIERKE, C.A.; DIXON, J.E. Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.100, p.904-909, 2003.

SHARMA, R.K.; SODHI, A.; BATRA, H.V.; TUTEJA, U. Effect of rLcrV and rYopB from *Yersinia pestis* on murine peritoneal macrophages in vitro. **Immunol. Lett.**, v.93, p. 179-187, 2004.

SING, A.; ROGGENKAMP, A.; GEIGER, A.M.; HEESEMANN, J. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 168, p. 1315-1321, 2002 .

SKRZYPEK, E.; COWAN, C.; STRALEY, S.C. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. **Mol. Microbiol.**, v.30, p.1051-1065, 1998.

SKRZYPEK, E.; MYERS-MORALES, T.; WHITEHEART, S.W.; STRALEY, S.C. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. **Infect. Immun.**, v.71, p.937-947, 2003.

SOLBACH, W. Tumor-promoting phorbol esters selectively abrogate the expression of the T4 differentiation antigen expressed on normal and malignant (Sézary) T helper lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v.156, p.1250-1255, 1982.

SORY, M.P.; BOLAND, A.; LAMBERMONT, I.; CORNELIS, G.R. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v.92, p.11998-2002, 1995.

SPACCAPELO, R.; ROMANI, L.; TONNETTI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; TOGNELLINI, R.; REED, S. G.; PUCCETTI, P.; BISTONI, F. TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 155, p. 1349-1360, 1995.

STARNBACH, M.N.; BEVAN, M.J. Cells infected with *Yersinia* present an epitope to class I MHC-restricted CTL. **J. Immunol.**, v.153, p.1603-1612, 1994.

SWAIN, S. L.; HUSTON, G.; TONKONOGY, S.; WEINBERG, A. Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion patterns and cell surface phenotype. **J. Immunol.**, v.147, p. 2991-3000, 1991.

TATO, C.M.; HUNTER, C.A. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. **Infect. Immun.**, v.70, p.3311-3317, 2002.

TRULZSCH, K.; SPORLEDER, T.; IGWE, E.I.; RUSSMANN, H.; HEESEMANN, J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5227-34, 2004.

TRULZSCH, K.; GEGINAT, G.; SPORLEDER, T.; RUCKDESCHEL, K.; HOFFMANN, R.; HEESEMANN, J.; RUSSMANN, H. *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. **J. Immunol.**, v.174, p.4244-51, 2005.

UGRINOVIC, S.; MERTZ, A.; WU, P.; BRAUN, J.; SIEPER, J. A single nonamer from the *Yersinia* 60-kDa heat shock protein is the target of HLA-B27-restricted CTL response in *Yersinia*-induced reactive arthritis. **J. Immunol.**, v.159, p.5715-5723, 1997.

UNE, T.; BRUBAKER, R.R. In vivo comparison of avirulent Vwa- and Pgm- or Pstr phenotypes of *yersiniae*. **Infect. Immun.**, v.43, p.895-900, 1984.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. **Infect. Immun.**, v.70, p.1033-1041, 2002.

VIBOUD, G.I.; BLISKA, J.B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.59, p.69-89, 2005.

VIBOUD G.I.; SO S.S.; RYNDAK M.B.; BLISKA J.B. Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, v.47, p.1305-1315, 2003.

VIBOUD, G.I.; MEJIA, E.; BLISKA, J.B. Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. **Cell. Microbiol.**, v.9, p.1504-1515, 2006.

VON PAWEL-RAMMINGEN U.; TELEPNEV M.V.; SCHMIDT G.; AKTORIES K.; WOLF-WATZ H.; ROSQVIST R. GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. **Mol. Microbiol.**, v.36, p.737-48, 2000.

YAO, T.; MECSAS, J.; HEALY, J.I.; FALKOW, S.; CHIEN, Y. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, YopH. **J. Exp. Med.**, v.190, p.1343-1350, 1999.

YEH, E.T.; GONG, L.; KAMITANI, T. Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. **Gene**, v.248, p.1-14, 2000.

YIN, Z.; BRAUN, J.; NEURE, L.; WU, P.; LIU, L.; EGGENS, U.; SIEPER, J. Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.40, p.1788-1797, 1997.

WEINER, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunol. Rev.**, v.182, p.207-214, 2001.

WIEDIG, C.A.; KRAMER, U.; GARBOM, S.; WOLF-WATZ, H.; AUTENRIETH, I.B. Induction of CD8⁺ T cell responses by *Yersinia* vaccine carrier strains. **Vaccine**, v.23, p.4984-4998, 2005.

WILEY, D.J.; NORDFELTH, R.; ROSENZWEIG, J.; DaFONSECA, C.J.; GUSTIN, R.; WOLF-WATZ, H.; SCHESSER, K. The Ser/Thr kinase of *Yersinia* protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton. **Microbial Pathogenesis**, v.40, p.234-243, 2006.

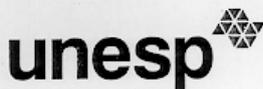
WU, C. Y.; DEMEURE, C. E.; GATELY, M.; PODLASKI, F.; YSSEL, H.; KINIWA, M.; DELESPESE, G. In vitro maturation of human neonatal CD4 T lymphocytes. I. Induction of IL-4-producing cells after long-term culture in the presence of IL-4 plus either IL-2 or IL-12. **J. Immunol.**, v.152, p. 1141-1153, 1994.

ZHANG, Y.; BLISKA, J.B. Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of *Yersinia*. **Curr. Topics Microbiol.**, v.289, p.151-173, 2005.

ZHAO, Y.; LAJOIE, G.; ZHANG, H.; CHIU, B.; PAYNE, U.; INMAN, R. D. Tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice respond to acute *Yersinia enterocolitica* infection with less apoptosis and more effective host resistance. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1243-1251, 2000.

ZHOU, H.; MONACK, D.M.; KAYAGAKI, N.; WERTZ, I.; YIN, J.; WOLF, B.; DIXIT, V.M. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappaB activation. **J. Exp. Med.**, v. 202, p.1327-32, 2005.

VIII – APÊNDICE:



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 37/2004 – Animais em Pesquisa

Interessado: LUIS GUSTAVO SILVA MONNAZZI

Orientador: Prof^a Dr^a Beatriz Maria Machado Medeiros

Projeto: PAPEL DAS YOPS DE *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*
NA MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS TH1/TH2 E NA
CITOTOXICIDADE DOS LINFÓCITOS DURANTE INFECÇÃO
EXPERIMENTAL

Parecer nº 02/2005 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Papel das Yops de *Yersinia pseudotuberculosis* na modulação das respostas Th1/Th2 e na citotoxicidade dos linfócitos durante infecção experimental", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 19 de janeiro de 2005.

Prof^a. Dr^a. MARIA VIRGINIA S. GOMES DE OLIVEIRA
Vice-Coordenadora do CEP