

unesp

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

**“CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DAS CITOCINAS E DOS ISÓTIPOS DE
IMUNOGLOBULINAS PRODUZIDOS NA YERSINIOSE EXPERIMENTAL
MURINA”**

Eloisa Elena Cangiani

**Tese para obtenção do título de
doutor em Análises Clínicas, área
de Análises Clínicas.**

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

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara

2005

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

**“CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DAS CITOCINAS E DOS ISÓTIPOS DE
IMUNOGLOBULINAS PRODUZIDOS NA YERSINIOSE EXPERIMENTAL
MURINA”**

Eloisa Elena Cangiani

**Tese para obtenção do título de
doutor em Análises Clínicas, área
de Análises Clínicas.**

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

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara

2005

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

Cangiani, Eloísa Elena

C222c Caracterização do padrão das citocinas e dos isótipos de
imunoglobulinas produzidos na yersiniose experimental murina. / . –
Araraquara, 2005.
78 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

Co-orientador: Iracilda Zeppone Carlos

.
1. Yersinia enterocolítica. 2. Ativação policlonal. 3. Citocinas . I.
Medeiros, Beatriz Maria Machado, orient. II. Carlos, Iracilda Zeppone, co-
orient. .III. Título.

CDD: 615.37

COMISSÃO EXAMINADORA

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

**Prof.^a Dr.^a Maria Regina D'Império Lima
(Membro Titular)**

**Prof. Dr. Phileo Pinge
(Membro Titular)**

**Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
(Membro Titular)**

**Prof.^a Dr.^a Deise Pasetto Falcão
(Membro Titular)**

Araraquara, dezembro de 2005

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Eloisa Elena Cangiani

Filiação Sylvio Cangiani e Terezinha Guerreiro Cangiani

Nascimento 19/08/1974 - Araraquara/SP - Brasil

Carteira de Identidade 277337471 SSP - SP - 23/07/1991

CPF 19634763871

Endereço residencial

Rua Carvalho Filho, 2209

Jd Primavera - Araraquara

14802-412, SP - Brasil

Telefone: 16 33362937

E-mail: eloisa_cangiani@yahoo.com.br

Endereço profissional

Ministério da Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência e Tecnologia para Inclusão Social

SAS QR 5, lote 6, Bloco H, 8º andar

SAS - Araraquara

70070-912, SP - Brasil

Telefone: 61 3317-85-87

E-mail: ecangiani@mct.gov.br

Formação Acadêmica/Titulação

1998 - 2001 Mestrado em Biotecnologia [Araraquara].

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Avaliação da resposta imune humoral murina à infecção por cepas de *Yersinia enterocolitica*, isoladas de pacientes com ou sem artrite", Ano de obtenção: 2001

Orientador: Profª Dr.ª Beatriz Maria Machado de Medeiros

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

1992 - 1997 Graduação em Farmácia Bioquímica.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Atuação Profissional

1. Drogonova Araraquara - REDE NET FARMA

Vínculo institucional

2001 - 2002 Vínculo: Farmacêutica-Responsável , Enquadramento funcional: Farmacêutica-Responsável , Carga horária: 30, Regime : Parcial

Atividades

2/2001 - 4/2002

Serviço Técnico Especializado

Especificação

1. Farmacêutica-Responsável

2. Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT

Vínculo institucional

2004 - Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Assessora Técnica , Carga horária: 8, Regime : Integral

Atividades

06/2004 - Atual

Serviço Técnico Especializado, Secretaria de Ciência e Tecnologia para Inclusão Social, Departamento de Ações Regionais

Especificação

1. Assessora Técnica na área de Fármacos

06/2004 – Atual Serviço Técnico Especializado, Secretaria de Ciência e Tecnologia para Inclusão Social, Coordenação Geral de Pesquisa e Desenvolvimento da Segurança Alimentar e Nutricional

Especificação

1. Assessora Técnica na área de Alimentação e Nutrição

Áreas de atuação

1 Immunologia

Idiomas

Entende Inglês (Razoável)

Fala Inglês (Razoavelmente)

Lê Inglês (Bem)

Escreve Inglês (Razoavelmente)

Prêmios e Títulos

2002 - 2º Melhor trabalho científico na área de Ciências da Saúde, 49ª Jornada Farmacêutica da UNESP - Araraquara

Trabalhos completos publicados em anais de evento

1.

SILVA, E. E. C. , RAMOS, O. P., MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Pesquisa de auto-anticorpos no soro de camundongos Swiss infectados com cepas de *Yersinia enterocolitica* O:3 de pacientes com ou sem artrite. In: Resumos da 49ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 2002, Araraquara. , 2002.

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

1.

SILVA, E. E. C., RAMOS, O. P., MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Detection of autoantibodies in sera of Swiss mice infected with different strains of *Yersinia enterocolitica* O:3, isolated from patients with or without reactive arthritis. In: XXVII Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2002, Salvador. Resumos do XXVII Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2002, p. 84.

2.

MEDEIROS, B. M. M., **SILVA, E. E. C.** , RAMOS, O. P., FALCÃO, D. P. Polyclonal activation as a consequence of infection of mice with strains of *Yersinia enterocolitica* isolated from patients with or without reactive arthritis In: 8th International Symposium on *Yersinia*, 2002, Turku. Abstract 8 th International Symposium on *Yersinia*, 2002. p.97 - 97

3.

MEDEIROS, B. M. M., RAMOS, O. P., **SILVA, E. E. C.** , FALCÃO, D. P. Polyclonal B-cell activation in mice infected by gastric route with *Yersinia enterocolitica* O:8 In: 8th International Symposium on *Yersinia*, 2002, Turku. Abstract 8 th International Symposium on *Yersinia*. , 2002. p.96 - 97

4.

MAIA, J. M. L., HIGUTI, L., **SILVA, E. E. C.** , MEDEIROS, B. M. M. Investigação do papel imunomodulador das proteínas Yops secretadas por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre a ativação dos linfócitos B - Resultados Preliminares. In: Resumos da 53ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC, 2001, Salvador, BA , 2001.

5.

RAMOS, O. P., **SILVA, E. E. C.** , MAIA, J. M. L., HIGUTI, L., MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Produção de anticorpos específicos em camundongos infectados com amostras virulenta e avirulenta de *Yersinia enterocolitica* O:8. In: Resumos da 48ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 2001, Araraquara, SP, 2001.

6.

RAMOS, O. P., **SILVA, E. E. C.** ; MEDEIROS, B. M. M. *Yersinia enterocolitica* O:8 induces B lymphocyte polyclonal activation and auto-antibodies production in experimentally infected mice. In: XXVI Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2001, Campos do Jordão, SP, 2001. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.34, p.163, 2001.

7.

SILVA, C. E. E., RAMOS, O. P., MEDEIROS, B. M. M. Activation of lymphocytes in the experimental yersiniosis. In: Resumos da XXV Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2000, Florianópolis, SC, 2000, p. 212-213.

8.

RAMOS, O. P., **SILVA, C. E. E.**, MAIA, J. M. L., HIGUTI, L., MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Ativação do sistema imune das mucosas de camundongos infectados por via oral com *Yersinia enterocolitica* O:8. In: Resumos da 47ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 2000, Araraquara, SP, 2000, p. 60.

9.

HIGUTI, L., MAIA, J. M. L., **SILVA, C. E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Efeito das Yops secretadas por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre a resposta imune humoral murina. In: Resumos da 47ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 2000, Araraquara, SP, 2000, p. 61.

10.

MAIA, J. M. L., HIGUTI, L., **SILVA, C. E. E.**, MEDEIROS, B. M. M. Investigação do papel imunomodulador das proteínas Yops secretadas por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre a ativação dos linfócitos B - Resultados Preliminares. In: Resumos do XII Congresso de iniciação científica da UNESP, 2000, São José do Rio Preto, SP, 2000, p. 86.

11.

SOUZA, C. D., HIGUTI, L., **CANGIANI, E. E.**, MEDEIROS, B. M. M. Ação das Yops liberadas por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre a secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos B de camundongos. In: Resumos do XI Congresso de iniciação científica da UNESP, 1999, Botucatu, SP, 1999, p. 77.

12.

SOUZA, C. D., HIGUTI, L., **CANGIANI, E. E.**, MEDEIROS, B. M. M. Efeito imunomodulador das Yops secretadas por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre a resposta imune humoral de camundongos. In: Resumos da XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1999, Caxambú, MG, 1999, p. 323.

13.

SOUZA, C. D., HIGUTI, L., **CANGIANI, E. E.**, MEDEIROS, B. M. M. Efeito imunomodulador das Yops secretadas por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre a resposta imune humoral de camundongos. In: Resumos da 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 1999, Araraquara, SP, 1999, p. 66.

14.

HIGUTI, L., SOUZA, C. D., **CANGIANI, E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Produção de anticorpos específicos em camundongos inoculados com Yops secretadas por *Yersinia pseudotuberculosis* In: Resumos do XI Congresso de iniciação científica da UNESP, 1999, Botucatu, SP, 1999, 76.

15.

HIGUTI, L., SOUZA, C. D., **CANGIANI, E. E.**, MEDEIROS, B. M. M. Resposta imune humoral de camundongos infectados com *Yersinia pseudotuberculosis* Yp III, curada do plasmídeo de virulência: Papel da invasina. In: Resumos da 51ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC, 1999, Porto Alegre, RS, 1999.

16.

SOUZA, C. D., HIGUTI, L., **CANGIANI, E. E.**, MEDEIROS, B. M. M. Células B esplênicas secretoras de imunoglobulinas em camundongos infectados com *Yersinia pseudotuberculosis* In: Resumos do X Congresso de iniciação científica da UNESP, 1998, Araraquara, SP, 1998, p. 230.

17.

MEDEIROS, B. M. M., **CANGIANI, E. E.**, SILVA, A. R. C., SATOMI, L. C., FALCÃO, D. P. Is invasina a polyclonal activator of B lymphocytes in mice infected with *Yersinia pseudotuberculosis* In: 7 th Internacional Congress on *Yersinia*, 1998, Nijmegen, The Netherlands. Nederlands Tidschrift voor Medische Microbiologie, v.6, p. S10, 1998.

18.

HIGUTI, L., SOUZA, C. D., **CANGIANI, E. E.**, MEDEIROS, B. M. M. Resposta imune humoral de camundongos infectados com amostras de *Yersinia pseudotuberculosis* curadas do plasmídeo de virulência: Papel da invasina. In: Resumos da XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1998, Caxambú, MG, 1998, p. 323.

19.

HIGUTI, L., SOUZA, C. D., **CANGIANI, E. E.**, MEDEIROS, B. M. M. Resposta imune humoral de camundongos infectados com *Yersinia pseudotuberculosis* Yp III, curada do plasmídeo de virulência: Papel da invasina In: Resumos do X Congresso de iniciação científica da UNESP, 1998, Araraquara, SP, 1998, p. 229.

20.

QUEIROZ, C. A., MALMEGRIM, K. C. R., **CANGIANI, E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Avaliação da resposta imune humoral de camundongos Balb/c infectados com *Yersinia enterocolitica* In: Resumos da XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1997, Caxambú, MG, 1997, 218.

21.

MALMEGRIM, K. C. R., QUEIROZ, C. A.; **CANGIANI, E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Avaliação da resposta imune humoral de camundongos Balb/c infectados com *Yersinia enterocolitica* O:3 In: Resumos da 44ª Jornada Farmacêutica Internacional da UNESP, 1997, Araraquara, SP, 1997, p. 128.

22.

SILVA, A. R. C., SATOMI, L. C., **CANGIANI, E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Influência da invasina na produção de anticorpos específicos anti-*Yersinia pseudotuberculosis* por camundongos infectados experimentalmente. In: Resumos do IX Congresso de iniciação científica da UNESP, 1997, Jaboticabal, SP, 1997, p. 205.

23.

CANGIANI, E. E., SILVA, A. R. C., SATOMI, L. C., MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Papel da invasina na ativação policlonal de células B em camundongos infectados com *Yersinia pseudotuberculosis* In: Resumos da XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1997, Caxambú, MG, 1997, p. 218.

24.

CANGIANI, E. E., SILVA, A. R. C., SATOMI, L. C., MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Papel da invasina na infecção experimental de camundongos por *Yersinia pseudotuberculosis* In: Resumos da 44ª Jornada Farmacêutica Internacional da UNESP, 1997, Araraquara, SP, 1997, p. 129.

25.

SATOMI, L. C., SILVA, A. R. C., **CANGIANI, E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. *Yersinia pseudotuberculosis* induz ativação policlonal de linfócitos B in vivo? In: Resumos do IX Congresso de iniciação científica da UNESP, 1997, Jaboticabal, SP, 1997, p. 204.

26.

MALMEGRIM, K. C. R., QUEIROZ, C. A., **CANGIANI, E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Avaliação da resposta imune humoral de camundongos Balb/c infectados experimentalmente com *Yersinia enterocolitica* O:3 In: Resumos do VIII Congresso de iniciação científica da UNESP, 1996, Garatinguetá, SP, 1996, p. 190.

27.

QUEIROZ, C. A., MALMEGRIM, K. C. R., **CANGIANI, E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Avaliação da resposta imune humoral de camundongos infectados experimentalmente por via oral com *Yersinia enterocolitica* O:3 In: Resumos da 43ª Jornada Farmacêutica Internacional da UNESP, 1996, Araraquara, SP, 1996, p. G-1.

28.

QUEIROZ, C. A., MALMEGRIM, K. C. R., **CANGIANI, E. E.**, MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia enterocolitica* O:3 em camundongos infectados experimentalmente por via oral. In: Resumos do VIII Congresso de iniciação científica da UNESP, 1996, Guaratingueta, SP, 1996, p. 190.

29.

CANGIANI, E. E., QUEIROZ, C. A., MALMEGRIM, K. C. R., MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Papel da invasina na infecção experimental de camundongos com *Yersinia pseudotuberculosis* In: Resumos do VIII Congresso de iniciação científica da UNESP, 1996, Guaratinguetá, SP, 1996, p. 191.

Artigos completos publicados em periódicos

1.

RAMOS, O. P., **SILVA, E. E. C.**, FALCÃO, D. P., MEDEIROS, B. M. M. Production of autoantibodies associated with polyclonal activation in *Yersinia enterocolitica* O:8-infected mice. Microbiol. Immunol., v. 49, n. 2, p. 129-137, 2005.

2.

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. Revista de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: , v.24, p.53 - 60, 2003.

3.

SILVA, E. E. C. , RAMOS, O. P., FALCÃO, D. P., BAUAB, T. M., MEDEIROS, B. M. M. *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from patients with or without reactive arthritis induces polyclonal activation of B cells and autoantibodies production in vivo.. Autoimmunity. , v.36, p.261 - 268, 2003.

Artigos resumidos publicados em periódicos

1.

MEDEIROS, B. M. M., **SILVA, E. E. C.** , RAMOS, O. P., FALCÃO, D. P. Polyclonal activation as a consequence of infection of mice with *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from patients with or without arthritis.. Adv. Exp. Med. Biol.. , v.529, p.151 - 153, 2003.

2.

MEDEIROS, B. M. M., RAMOS, O. P., **SILVA, E. E. C.** , FALCÃO, D. P. Polyclonal B-cell activation in mice infected by intragastric route with *Yersinia enterocolitica* O:8.. Adv. Exp. Med. Biol.. , v.529, p.147 - 149, 2003.

3.

RAMOS, O. P., **SILVA, E. E. C.** , MAIA, J. M. L., MEDEIROS, B. M. M. Ativação de linfócitos B das placas de Peyer de camundongos infectados por via gástrica com *Yersinia enterocolitica* O:8.. Revista de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: , v.22, p.79 - 93, 2001.

4.

RAMOS, O. P., **SILVA, E. E. C.** ; MAIA, J. M. L., HIGUTI, L., MALLAVOLTA, V. A. A., MEDEIROS, B. M. M. Produção de anticorpos específicos em camundongos infectados com amostras virulenta e avirulenta de *Yersinia enterocolitica* O:8.. Revista de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: , v.22, p.373 - 374, 2001.

5.

MEDEIROS, B. M. M., MALMEGRIM, K. C. R., QUEIROZ, C. A., **SILVA, E. E. C.** Humoral immune response in *Yersinia enterocolitica* O:3-infected Balb/c mice.. Revista de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: , v.21, p.45 - 55, 2000.

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1.

SILVA, E. E. C. ; LIMA, Édimo Garcia de, DIAS, Marcos Tavares Participação em banca de Valdelice Oliveira Burgos. Avaliação histológica do coração, fígado e baço de camundongos infectados pela cepa RAL de *Trypanosoma cruzi*., 2002
(Curso de Especialização Latu Sensu Em Imunologia) Centro Universitário Barão de Mauá

Participação em eventos

1.
Cangiani, E. E.
Curso de Capacitação sobre OSCIP, 2005. (Outra, Participações em eventos)
2.
Cangiani, E. E.
I Oficina de trabalho com projetos de pesquisa aprovados pelo CT-Agronegócio MCT/CNPq/MDS - 2003, 2005. (Oficina, Participações em eventos)
3.
Cangiani, E. E.
ALIMENTA, 2004. (Seminário, Participações em eventos)
4.
Cangiani, E. E.
Conferência Internacional sobre Rastreabilidade de Alimentos, 2004.
(Outra, Participações em eventos)
5.
Cangiani, E. E.
Fórum Nacional sobre Drogas, 2004. (Encontro, Participações em eventos)
6.
Cangiani, E. E.
I Oficina de Trabalho - Processo Preparatório para a 32ª Sessão do Comitê Permanente de Nutrição da ONU - Estudo de Casos, 2004. (Oficina, Participações em eventos)
7.
Cangiani, E. E.
I Seminário Internacional de C&T para Desenvolvimento Social na Amazônia Legal, 2004. (Seminário, Participações em eventos)
8.
Cangiani, E. E.
I Simpósio Escola, Nutrição e Saúde: Desafios Contemporâneos, 2004.
(Simpósio, Participações em eventos)
9.
Cangiani, E. E.
Oficina Internacional - Processo Preparatório para a 32ª Sessão do Comitê

Permanente de nutrição da ONU - Estudo de Casos, 2004. (Oficina, Participações em eventos)

10.

Cangiani, E. E.

Projeto Sexta com Ciência: Parcerias Público Privado, 2004. (Outra, Participações em eventos)

11.

Cangiani, E. E.

Reunião do Codex Alimentarius Commission, 2004. (Encontro, Participações em eventos)

12.

Cangiani, E. E.

Seminário Franco-Brasileiro Segurança Sanitária Animal, 2004. (Seminário, Participações em eventos)

13.

Cangiani, E. E.

Seminário Nacional de Alimentos, Tecnologias e Tendências, 2004. (Seminário, Participações em eventos)

14.

Cangiani, E. E.

Seminário Nacional de Saúde da População Negra, 2004. (Seminário, Participações em eventos)

15.

Cangiani, E. E.

Seminário Pesquisa Agropecuária para a Segurança Alimentar e o Combate à Fome, 2004. (Seminário, Participações em eventos)

16.

Cangiani, E. E.

1ª Conferência Brasileira sobre Arranjos Produtivos Locais, 2004. (Outra, Participações em eventos)

17.

Cangiani, E. E.

2ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde, 2004. (Outra, Participações em eventos)

18.

SILVA, E. E. C.

Palestra sobre Como falar corretamente e sem inibições, 2003. (Outra, Participações em eventos)

19.

SILVA, E. E. C.

50ª Jornada Farmacêutica da UNESP - curso de pré-jornada, 2003.
(Encontro, Participações em eventos)

20.

SILVA, E. E. C.

49ª Jornada farmacêutica da UNESP, 2002. (Encontro, Participações em eventos)

21.

SILVA, E. E. C.

Curso de Aperfeiçoamento Profissional, 2001. (Outra, Participações em eventos)

22.

SILVA, E. E. C.

Encontro da SBI, 2000. (Encontro, Participações em eventos)

23.

Cangiani, E. E.

I Simpósio de Biotecnologia, 1999. (Simpósio, Participações em eventos)

24.

Cangiani, E. E.

Jornada Farmacêutica da UNESP, 1999. (Encontro, Participações em eventos)

25.

Cangiani, E. E.

Jornada Farmacêutica da UNESP, 1998. (Encontro, Participações em eventos)

26.

Cangiani, E. E.

Jornada Farmacêutica da UNESP, 1997. (Encontro, Participações em eventos)

27.

Cangiani, E. E.

Reunião Anual da FESBE, 1997. (Congresso, Participações em eventos)

28.

Cangiani, E. E.

Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 1997. (Simpósio, Participações em eventos)

29.

Cangiani, E. E.

Iniciação Científica da UNESP, 1996. (Congresso, Participações em eventos)

30.

Cangiani, E. E.

Jornada Farmacêutica Internacional da UNESP, 1996. (Encontro, Participações em eventos)

31.

Cangiani, E. E.

Reunião Anual da FESBE, 1996. (Congresso, Participações em eventos)

32.

Cangiani, E. E.

Seminário sobre Qualidade Total em Laboratório Clínico, 1996.

(Seminário, Participações em eventos)

33.

Cangiani, E. E.

I Simpósio Internacional sobre AIDS, 1995. (Simpósio, Participações em eventos)

34.

Cangiani, E. E.

Jornada Farmacêutica Internacional da UNESP, 1995. (Encontro, Participações em eventos)

35.

Cangiani, E. E.

Jornada Farmacêutica Internacional da UNESP, 1994. (Encontro, Participações em eventos)

36.

Cangiani, E. E.

X Jornada Paulista de Parasitologia, 1994. (Encontro, Participações em eventos)

37.

Cangiani, E. E.

Jornada Farmacêutica Internacional da UNESP, 1993. (Encontro, Participações em eventos)

Indicadores de produção

Informações complementares

Participações em banca de trabalhos de conclusão - 1

Participações em eventos - 37

Produção bibliográfica

Artigos publicados em periódicos - 8

Completos - 3

Resumos - 5

Trabalhos publicados em anais de eventos - 30

Completos - 1

Resumos - 29

Outras informações relevantes

1-Estágio de Treinamento na disciplina de IMUNOLOGIA, do curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, período de 11/07 a 14/12/94.

2-Iniciação Científica na disciplina de IMUNOLOGIA, do curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, período de 08/95 a 07/97, com bolsa PIBIC.

3-Estágio de Treinamento no Sub-setor de coleta de material do Laboratório de Análises Clínicas "Prof. Antônio Longo" do núcleo de Atendimento à Comunidade, no período de 7 /08 a 05/09/97.

4-Estágio de Docência na disciplina de Imunologia, do curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, período - 1º semestre/2000.

5- Estágio de docência na disciplina de Imunologia, do curso de Graduação em Odontologia, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, período - 2º semestre/2002.

6- Estágio de docência na disciplina de Microbiologia, do curso de Farmácia-Bioquímica, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara, período - 2º semestre/2003. (24/06/2003)

7- Bolsa de Mestrado (FAPESP) e doutorado (CAPES)

Trabalho realizado na Disciplina de Imunologia,
Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara
– UNESP – SP, com apoio da CAPES, através da
concessão de uma bolsa de doutorado à aluna
Eloisa Elena Cangiani e da FAPESP, através do
auxílio à pesquisa (Processo nº **03/02774-1**)

“Por que aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos. Pois que tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei num alto retiro, porque conheceu o meu nome. Ele me invocará, e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia; livra-lo-ei e o glorificarei. Dar-lhe-ei abundância de dias, e lhe mostrarei a minha salvação.”

(Sl 91, 11; 14-16)

*Àqueles sem os quais nada seria possível, meus pais, **Sylvio** (in memoriam) e **Terezinha**, por terem me ensinado a nunca desistir dos meus ideais e buscar a Deus acima de todas as coisas, obrigada, pelo carinho, pelo amor, pelas orações, pelo incentivo constante e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.*

*Ao meu companheiro, **Hipólito**, pelo amor, por sua presença constante em todos os momentos desta caminhada, pela ajuda silenciosa e pelo encorajamento nas horas de dificuldades.*

Agradecimentos

À Deus por iluminar e conduzir meus passos e pela sua presença viva em minha vida.

À Prof.^a Dr.^a Beatriz Maria Machado de Medeiros, pela amizade, carinho, incentivo e orientação.

À Prof.^a Dr.^a Deise Pasetto Falcão por ter participado ativamente em todas as etapas da minha formação, pelo carinho e incentivo constante.

À Prof.^a Dr.^a Taís Maria Bauab, por ter cedido à amostra bacteriana em estudo e realizado a análise plasmidial da mesma.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, por permitir gentilmente a utilização do citômetro de fluxo para as análises e assim possibilitar a conclusão deste trabalho.

À grande amiga Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta, pelo carinho, amizade e auxílio técnico.

Aos amigos José Mário, Sílvia e Fabrício, pelo apoio, amizade, compreensão e auxílio técnico.

Ao amigo Gustavo por sua amizade, dedicação, desprendimento e apoio constante em todas as horas, essencial para a realização das análises de citometria de fluxo em Ribeirão Preto.

Às novas e fundamentais amigas Karen Angélica Cavassani e Ana Paula Moreira, importantíssimas para a realização das análises finais do trabalho, pela dedicação e boa vontade.

Às Bibliotecárias Irani Coito e Natalina Lambini Escremin, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pela colaboração na pesquisa e revisão bibliográfica.

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação do curso de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, Cláudia, Sônia e Laura, pelo apoio, paciência e amizade.

À Secretária do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, Aparecida Bernadete Rocateli Jesus, pelo apoio e amizade.

À FAPESP pela concessão do auxílio à pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Biotério Central da UNICAMP-CEMIB e USP-ICB/SP pelo fornecimento dos camundongos utilizados na pesquisa.

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

Sumário

I- Introdução	1
II- Objetivos	10
III- Material e Métodos	11
1- Animais de experimento	11
2- Amostra Bacteriana	11
3- Infecção experimental dos animais com a amostra bacteriana	11
3.1- Reativação da amostra de <i>Yersinia</i> e padronização do inoculo	11
3.2- Esquema de inoculação	12
4- Determinação do nº de células esplênicas secretoras de Imunoglobulinas (inespecíficas e específicas), através da técnica de ELISPOT	12
4.1- Preparo do extrato bruto da amostra de <i>Yersinia</i>	12
4.2- Obtenção das células esplênicas	13
4.3- Viabilidade das células esplênicas	13
4.4- Teste ELISPOT	14
5- Detecção de anticorpos específicos anti- <i>Yersinia</i> , através da técnica de ELISA	15
5.1- Obtenção dos soros	15
5.2- Técnica de ELISA indireta	15
6- Análise fenotípica dos linfócitos esplênicos, através da técnica de CITOMETRIA DE FLUXO	16
6.1- Obtenção da suspensão celular de linfócitos	16
6.2- Análise fenotípica dos linfócitos esplênicos	17

7- Detecção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF-α, TGF-β e IFN-γ através da técnica de CITOMETRIA DE FLUXO	18
8- Análise Estatística	19
IV- Resultados	20
1- Determinação do nº de células esplênicas secretoras de Imunoglobulinas (inespecíficas e específicas)	20
2- Detecção de anticorpos específicos anti-<i>Yersinia</i>	30
3- Análise fenotípica dos linfócitos esplênicos	33
4- Detecção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF-α, TGF-β e IFN-γ	37
5- Ocorrência de alterações patológicas	47
V- Discussão	48
VI- Conclusões	62
VII- Referências Bibliográficas	63

Lista de Tabelas:

Tabela 1 – Número de linfócitos viáveis, no baço dos animais BALB/c e C57BL/6 controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8, determinado por contagem em Câmara de Neubauer, pela técnica de exclusão com Azul de Trypan. Os valores apresentados representam a média aritmética e o desvio padrão do número de linfócitos viáveis, obtidos por baço (p. 23).

Tabela 2 – Número total de células secretoras de imunoglobulinas (Igs), detectadas no baço dos camundongos BALB/c controles e infectados, por via i.v., com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA- 2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores apresentados representam a média aritmética e o desvio padrão do número total de células secretoras de Igs, obtidos por baço (p. 24) .

Tabela 3 – Número de células secretoras de imunoglobulinas específicas, detectadas no baço dos camundongos BALB/c infectados, por via i.v., com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores apresentados representam a média aritmética do número de células secretoras de Igs específicas, obtidos por baço (p. 25).

Tabela 4 – Número total de células secretoras de imunoglobulinas, detectadas no baço dos camundongos C57BL/6 infectados e controles, por via i.v., com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores apresentados representam a média aritmética e o desvio padrão do número total de células secretoras de Igs, obtidos por baço (p. 26).

Tabela 5 – Número de células secretoras de imunoglobulinas específicas, no baço dos animais C57BL/6 infectados, por via i.v., com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores apresentados representam a média aritmética do número de Igs específicas, obtidos por baço (p. 27).

Tabela 6 – Detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia* no soro dos animais da linhagem BALB/c controles e infectados por via i.v. com a amostra

Y. enterocolitica O:8 WA- 2707. Os soros foram diluídos a 1/320 para IgG e 1/40 para IgM. Os valores descritos na tabela representam a densidade ótica (D.O.) medida à 492 nm (p. 31).

Tabela 7 – Detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia* no soro dos animais da linhagem C57BL/6 controles e infectados com a amostra *Y. enterocolitica* O:8 WA- 2707. Os soros foram diluídos a 1/320 para IgG e 1/40 para IgM. Os valores descritos na tabela representam a densidade ótica (D.O.) medida à 492 nm (p.31).

Tabela 8 – Proporção de células CD3+, CD4+CD8- (CD4+) e CD3+CD8+ (CD8+) no baço dos camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados, por via i.v, com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707, determinada por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, a partir de um pool de células, num total de 10.000 eventos. Os anticorpos monoclonais específicos estavam conjugados aos fluorocromos: FITC, PE E SPRD, respectivamente (p.34).

Tabela 9 – Detecção das citocinas intracelulares, nas populações CD3+CD8- (CD4+) e CD3+CD8+ (CD8+), dos animais BALB/c controles e infectados, por via i.v. com a amostra de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707 e controles, obtidas após análise por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, num total de 10.000 eventos, a partir de um pool de células. Os valores em negrito representam os maiores aumentos observados ao longo da cinética de infecção (p. 41).

Tabela 10 - Detecção das citocinas intracelulares, nas populações CD3+CD8- (CD4+) e CD3+CD8+ (CD8+), dos animais C57BL/6 infectados com a amostra de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707 e controles, obtidas após análise por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, num total de 10.000 eventos, a partir de um pool de células. Os valores em negrito representam os maiores aumentos observados ao longo da cinética de infecção (p. 42).

Lista de Figuras:

Figura 1a – Número total de células secretoras de imunoglobulinas dos isótipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, determinado no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados com células viáveis de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores representam a média de 3 animais. O símbolo * corresponde às diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, $N=3$). C corresponde à média dos animais controles em diferentes dias p.i.. Os resultados representam os valores médios de dois experimentos independentes (p. 28).

Figura 1b – Número total de células secretoras de imunoglobulinas dos isótipos IgM e IgA, determinado no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados com células viáveis de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores representam a média de 3 animais. O símbolo * corresponde às diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, $N=3$). C corresponde à média dos animais controles em diferentes dias p.i. Os resultados representam os valores médios de dois experimentos independentes (p. 29).

Figura 2 – Detecção dos níveis de anticorpos anti-*Yersinia* nos soros dos camundongos BALB/c, controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707, em diferentes dias após infecção. Os soros foram diluídos a 1/320 para IgG e 1/40 para IgM. O símbolo * corresponde às diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, $N=3$) entre os animais BALB/c e C57BL/6. As linhas pontilhadas correspondem ao valor do cut-off (cut-off IgG Balb/c=0.043 e cut-off IgG C57BL/6=0,028; cut-off IgM BALB/c = 0.105; cut-off IgM C57BL/6 = 0.046). Os resultados representam os valores médios de dois experimentos independentes (p. 32).

Figura 3 – Proporção de linfócitos T CD4+ obtidos do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados por via i.v. com *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, a partir de um pool de células, num total de 10.000 eventos. Os anticorpos monoclonais específicos estavam conjugados aos fluorocromos: FITC e PE (p. 35).

Figura 4 – Proporção de linfócitos T CD8+ obtidos do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados por via i.v. com *Y. enterocolitica* O:8-WA

2707. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, num total de 10.000 eventos, a partir de um pool de células. Os anticorpos monoclonais específicos estavam conjugados aos fluorocromos: FITC E SPRD (p. 36).

Figura 5 – Proporção de citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- α e TGF- β , detectadas na população de linfócitos esplênicos T CD4+ dos animais BALB/c controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8. Os gráficos representam os maiores aumentos observados nos animais infectados, em relação aos animais controles, nos diferentes dias da cinética de infecção (p. 43).

Figura 6 – Proporção de citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- α e TGF- β , detectadas na população de linfócitos esplênicos T CD8+ dos animais BALB/c controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8. Os gráficos representam os maiores aumentos observados nos animais infectados, em relação aos animais controles, nos diferentes dias da cinética de infecção (p.44).

Figura 7 – Proporção de citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- α , detectadas na população de linfócitos esplênicos T CD4+ dos animais C57BL/6 controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8. Os gráficos representam os maiores aumentos observados nos animais infectados, em relação aos animais controles, nos diferentes dias da cinética de infecção (p. 45).

Figura 8 – Proporção de citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- α , detectadas na população de linfócitos esplênicos T CD8+ dos animais C57BL/6 controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8. Os gráficos representam os maiores aumentos observados nos animais infectados, em relação aos animais controles, nos diferentes dias da cinética de infecção (p. 46).

Lista de Abreviaturas:

BAB	“Blood Agar Base”
CFU	Unidades Formadoras de Colônia
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ELISPOT	“Enzyme Linked Spot Assay”
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HLA	“Human Leukocyte Antigen”
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulina
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina- 12
IL-4	Interleucina – 4
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IV ou i.v.	Intravenoso
LD50	Dose letal mediana
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro
NK	Natural Killer
PBS	Solução tampão salina fosfato
PE	Ficoeritrina
p.i.	Pós-infecção
pYV	Plasmídeo de virulência de <i>Yersinia</i>
SPF	“Specific pathogen free”
SPRD	Spectral Red

TCD4	Linfócito T CD4
TCD8	Linfócito T CD8
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral beta
Th	Linfócito T helper
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

RESUMO

Yersinia enterocolitica é um enteropatógeno que pode levar ao desenvolvimento de artrite reativa. Um dos mecanismos imunomoduladores usados pelos patógenos artritogênicos é a ativação policlonal de linfócitos. O objetivo deste estudo foi verificar se ocorre ativação policlonal de linfócitos B e comparar o padrão isotípico de imunoglobulinas produzidas durante a infecção com *Y. enterocolitica* O:8 em linhagens de camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6), bem como analisar o padrão de secreção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias pelas populações de células T CD4+ e CD8+. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados por via intravenosa com *Y. enterocolitica* O:8. Células esplênicas foram obtidas no 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dias pós-infecção e o número de células secretoras de imunoglobulinas totais e específicas dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA foram determinados pela técnica de ELISPOT. A presença de anticorpos específicos nos soros dos camundongos foi investigada por ELISA. A imunofenotipagem dos linfócitos T, presentes no baço dos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados e controles, bem como o padrão de citocinas intracelulares pró-inflamatórias e regulatórias produzidas pelos linfócitos T foram determinados por CITOMETRIA DE FLUXO. O número de células secretoras de imunoglobulinas específicas presentes no baço dos animais infectados de ambas as linhagens foi relativamente baixo. Foi observada ativação policlonal em ambas as linhagens, e a maior ativação observada foi nos camundongos BALB/c (aumento de 27,2 vezes para IgG1 e aumento de 13,3 vezes para IgG3 no 28º dia pós-infecção e 12,2 vezes para IgG2a no 14º dia). Os camundongos C57BL/6 apresentaram uma predominância de células secretoras de IgG2a (aumento de 7,8 vezes no 21º dia). O pico de produção de anticorpos específicos anti-*Yersinia* do isotipo IgG no soro dos

camundongos BALB/c foi observado no 28º dia pós-infecção (p.i.). O maior aumento de IgM ocorreu no 14º dia. Foi observado um aumento progressivo dos anticorpos IgG específicos nos camundongos C57BL/6 até o 28º dia p.i.; IgM esteve aumentado no 21º dia p.i. Não foi observada produção de anticorpos específicos do isotipo IgA, tanto nos camundongos BALB/c quanto nos C57BL/6. De um modo geral, as duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, apresentaram um maior percentual de linfócitos esplênicos T CD4+, sendo que o maior aumento ocorreu no 14º dia p.i.. A população T CD8+ esteve mais elevada nos BALB/c no 14º dia p.i. e nos C57BL/6 no 21º dia p.i. Para IL-4, nos camundongos BALB/c, observou-se um aumento em relação aos animais controles já a partir do 7º dia p.i., permanecendo elevada nos dias subseqüentes. Observou-se um pico de produção no 14º dia p.i. na população T CD4+, sendo o aumento em relação aos controles de 6,7 vezes, com percentual de 12,44%. O pico de produção de IL-4 para linfócitos T CD8+ também foi no 14º dia, com elevação de 2,3 vezes em relação aos controles e percentual de 13,21%. IL-10 apresentou-se aumentada no 14º dia p.i. em ambas as populações, com aumentos de 4,6 vezes em relação aos controles na população T CD4+ e 1,8 vezes na população T CD8+. TGF- β foi produzida apenas nos animais BALB/c, no 7º, 14º e 28º dia p.i., sendo o pico de secreção no 28º dia p.i., em ambas as populações de linfócitos T. Nos animais C57BL/6 foi observado um aumento da citocina TNF- α nos animais infectados, nas populações T CD4+ e T CD8+, no 21º e 7º dia p.i. (127 vezes e 2,6 vezes). IFN- γ apresentou-se elevado no 14º dia p.i. (2 vezes e 1,7 vezes em relação aos controles) em ambas as populações de linfócitos T. Foi possível concluir que ocorreu ativação policlonal de linfócitos B em ambas as linhagens de camundongos, com predominância de células secretoras de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a para os animais BALB/c e IgG2a para os animais C57BL/6. Nos camundongos C57BL/6 infectados, a resposta de citocinas Th1

predominou, e pode ser melhor observada a partir do 7º dia p.i. Nos camundongos BALB/c infectados, nós também observamos a participação das citocinas Th1 no início da infecção, mas parece ocorrer uma mudança para resposta Th2 posteriormente.

Palavras Chaves: ativação policlonal, *Yersinia enterocolitica* O:8, anticorpos específicos, citocinas regulatórias e pró-inflamatórias.

ABSTRACT

Yersinia enterocolitica is an enteropathogen that can lead to the development of reactive arthritis. One of the immunomodulating mechanisms used by arthritogenic pathogens is the polyclonal activation of lymphocytes. The objective of this study was to verify if the polyclonal activation of B-lymphocytes occur and to compare the different immunoglobulin (Ig) isotypes produced during the infection with *Y. enterocolitica* O:8 in susceptible (BALB/c) and resistant (C57BL/6) mice strains. We also analyzed the production of pro-inflammatory and regulatory cytokines in T CD4+ and T CD8+ lymphocytes populations. BALB/c and C57BL/6 mice were infected intravenously with *Y. enterocolitica* O:8. Spleen cells were taken on days 3, 7, 14, 21, and 28 after infection and the number of cells secreting total and specific antibodies of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, and IgA isotypes was determined by the ELISPOT assay. The presence of specific antibodies in mouse serum was investigated by ELISA. The immunophenotyping of splenic T lymphocytes of BALB/c and C57BL/6 infected and controls, and the profile of intracellular pro-inflammatory and regulatory cytokines produced by these cells was determined by FLOW CYTOMETRY. In both strains, the number of specific Ig-secreting cells was relatively low. It was observed polyclonal activation in both strains, and the greatest activation was observed in the BALB/c mice (27,2-fold and 13,3-fold increase for IgG1 and IgG3 on the 28th day after infection and 12,2-fold for IgG2a on 14th day). The C57BL/6 mice showed a predominance of IgG2a-secreting cells (7,8-fold increase on the 21th day). The peak production of specific anti-*Yersinia* IgG antibodies in the sera of BALB/c mice was observed on the 28th day after infection. The greatest increase in IgM occurred on the 14th day. It was observed a progressive increase of specific IgG antibodies in C57BL/6 mice up to the 28th day after infection while IgM was increased on the 21st day after infection. It wasn't observed production of specific IgA antibodies in both

BALB/c and C57BL/6 mice. In general, both strains of mice had a predominance of CD4+ T splenic lymphocytes, and the biggest increase occurred on the 14th day after infection. The CD8+ T cell population was more elevated in BALB/c mice on the 14th day and in C57BL/6 on the 21st day after infection. In the BALB/c it was observed an increase in the production of IL-4 as early as the 7th day after infection, and it remained elevated on the next days. The IL-4 peak production was observed on the 14th day in the CD4+ population, which increased 6.7-fold in the infected animals when related to the controls (12,44%). In the CD8+ T cell population the IL-4 peak production occurred on the 14th day after infection, which increased 2.3-fold compared with the controls (13,21%). The IL-10 increased 4.6-fold on the 14th day after infection, in the CD4+ T population and 1.8-fold in the CD8+ T population, related with the controls. The TGF- β cytokine was produced only in the BALB/c mice, on the 7th, 14th and 28th days after infection, with peaked on the 28th day after-infection, in both T cell populations. In the C57BL/6 mice it was observed, on the 21th day after infection, an increase of TNF- α (127-fold) in infected animals, and it could be verified in the CD4+ T lymphocytes and on the 7th day after infection in the CD8+ T lymphocytes (2.6-fold). The production of IFN- γ presented an increase in the 14th day after infection (2-fold and 1.7-fold in relation to the controls) also for both T lymphocytes populations. It was concluded that occurred polyclonal B-lymphocyte activation in both strains of mice, with a predominance of IgG1- and IgG2a-secreting cells for BALB/c mice and IgG2a for C57BL/6 mice. In infected C57BL/6 mice the Th1 cytokine response predominates, and it could be better observed from the 7th day after infection. In infected BALB/c mice, though we also observed the participation of Th1 cytokines in the beginning of the infection, it seems to occur a switch to the Th2 response lately.

Key Words: polyclonal activation, *Yersinia enterocolitica* O:8, specific antibodies, pro-inflammatory and regulatory cytokines.

I- Introdução

Yersinia enterocolitica é um patógeno Gram-negativo que causa gastroenterite em humanos e roedores (COVER & ABE, 1989). A via usual de contaminação é através da ingestão de alimento ou água contaminada com a bactéria (BOTTONNE, 1999). Após a ingestão, a bactéria atravessa a barreira do epitélio intestinal pela passagem através das células M, distribuindo-se na lâmina própria e colonizando preferencialmente as placas de Peyer. Cepas portadoras de plasmídeo de virulência (pYV) são capazes de migrar das placas de Peyer para os linfonodos mesentéricos atingindo órgãos como baço, fígado e pulmões, nos quais se multiplicam extracelularmente levando à formação de abscessos e lesões granulomatosas (AUTENRIETH & FIRSCHING, 1996). De uma a três semanas após a infecção, os pacientes podem desenvolver artrite reativa que varia de uma artralgia leve à poliartrite severa e geralmente regride dentro de poucas semanas ou meses. Um subgrupo destes pacientes (10%) desenvolve uma artrite inflamatória crônica (LEIRISALO-REPO & SUORANTA, 1988).

O modelo da yersiniose em camundongos, estabelecido por Carter (CARTER & COLLINS, 1974), é ainda o mais conveniente e mais usado na investigação da interação da *Yersinia* com o hospedeiro, sob condições próximas àquelas em humanos.

Y. enterocolitica O:8 é letal para o camundongo e artritogênica para ratos Lewis e SHR. A letalidade para camundongos está intimamente associada com a expressão de um sistema de transporte de ferro de alta afinidade, codificado por cromossomo, que permite que o patógeno obtenha ferro para o seu crescimento em meios deficientes de ferro (HEESEMAN & GAEDE, 1989).

À semelhança de outros patógenos intestinais, a persistência da *Yersinia* nos tecidos das mucosas é considerada um importante fator para o desenvolvimento de artrite poliarticular, não-supurativa (GRANFORS et al., 1989).

Entre as bactérias que causam artrite reativa, como a *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Chlamydia*, *Yersinia* é um dos agentes etiológicos mais comuns (VALTONEN et al., 1985). Esses microrganismos diferem em muitos aspectos, mas existem características comuns. Essas incluem a capacidade de causar infecção primária no tecido mucoso, lipopolissacarídeo como parte integrante da membrana externa, artrite pós-infecciosa em associação com HLA-B27 e o tipo de envolvimento articular (WUORELA & GRANFORS, 1998). Apesar das semelhanças na estrutura destas bactérias, em especial no lipopolissacarídeo de parede (NURMINEN et al., 1983), a capacidade de causar esta sequela varia bastante (GRANFORS et al., 1988). Infecções causadas pelos sorotipos O:3 e O:9 de *Y. enterocolitica* são frequentemente complicadas com o desenvolvimento de artrite reativa, enquanto infecções causadas pelo sorotipo O:8 raramente apresentam esta complicação, embora este sorotipo seja altamente virulento para humanos e animais.

O mecanismo pelo qual patógenos artritogênicos interagem com o sistema imune humano para produzir sinovite inflamatória não está completamente esclarecido. Entretanto, estudos indicam que a sinovite característica dessas doenças resulta, pelo menos em parte, da capacidade do patógeno artritogênico modular seletivamente a resposta imune do hospedeiro infectado (LAHESMAA et al., 1994).

Um dos mecanismos imunomoduladores usados pelos patógenos artritogênicos é a ativação policlonal de linfócitos (LAHESMAA et al., 1994). LPS bacteriano é encontrado no fluído sinovial e na membrana sinovial de pacientes com artrite reativa induzida por *Yersinia* (GRANFORS et al., 1989), e estes pacientes

apresentam uma resposta forte e persistente de anticorpos para LPS. Este fato potencialmente proporcionaria um estímulo mitogênico localizado para linfócitos B nas articulações.

Anteriormente (MEDEIROS et al., 1995), nosso grupo demonstrou pela primeira vez a ativação policlonal do repertório de linfócitos B, provocada por uma amostra de *Y. enterocolitica* O:3 inoculada por via intravenosa (i.v.) em camundongos Swiss. Esta amostra de *Y. enterocolitica* O:3, foi isolada de fezes diarréica humana e era portadora do plasmídeo de virulência. Não se observou a ocorrência de artrite nos animais estudados.

Infecções clínicas por *Y. enterocolitica* são seguidas pelo desenvolvimento de auto-anticorpos, incluindo anticorpos dirigidos contra músculo liso, tecido conjuntivo, epitélio tubular renal e a membrana basal das células epiteliais da tireóide (GRIPENBERG et al., 1978; MONTPLAISIR et al., 1979; SHENKMAN & BOTTONE, 1981). A produção destes auto-anticorpos pode resultar da ativação policlonal de linfócitos B; células B em repouso com receptores dirigidos contra estruturas autólogas seriam estimuladas como resultado da relação microrganismo-hospedeiro.

Nosso grupo verificou que existe uma associação entre ativação policlonal de células B e a presença de auto-anticorpos em camundongos infectados com *Y. enterocolitica* O:3 (MEDEIROS et al., 1997). Assim o desenvolvimento de doenças auto-imunes em pacientes infectados com *Y. enterocolitica* provavelmente pode ser o resultado da ativação policlonal de linfócitos B.

Em trabalho posterior realizado em nosso laboratório (SILVA et al., 2003) foi estudada a capacidade ativadora policlonal de três amostras de *Y. enterocolitica* O:3, uma delas isolada de um paciente com artrite, outra isolada de um paciente sem artrite e o par isogênico desta amostra, desprovido do plasmídeo de virulência. Os resultados obtidos não nos permitiram determinar se existe uma associação

entre a capacidade artritogênica de *Y. enterocolitica* e ativação policlonal de linfócitos B, uma vez que a amostra isolada do paciente sem artrite também induziu esta ativação. Além disso, todas as amostras estudadas induziram a produção de auto-anticorpos. Não se pode esquecer que o risco destas complicações é determinado em grande parte por fatores ligados ao hospedeiro, em particular pela carga genética do paciente, idade e estado imunitário do mesmo.

As amostras de *Y. enterocolitica* que costumam causar artrite em humanos com maior frequência são aquelas do sorotipo O:3, as quais apresentam baixa virulência para camundongos BALB/c ($LD_{50} > 10^6$ CFU) e não são artritogênicas para ratos, enquanto as amostras do sorotipo O:8, virulentas para camundongos ($LD_{50} < 10^3$ CFU), raramente descritas como sendo artritogênicas para humanos, podem causar artrite em ratos Lewis (CARTER & COLLINS, 1974; MARTINEZ, 1983).

Os trabalhos realizados por Ramos e colaboradores (2001) e Medeiros e colaboradores (2003) demonstraram que tanto camundongos infectados com a amostra de *Y. enterocolitica* sorotipo O:8, virulenta para camundongos, quanto aqueles infectados com a amostra avirulenta, desprovida do plasmídeo de virulência, desenvolviam ativação policlonal de linfócitos B e produziam auto-anticorpos. O modelo animal utilizado foi camundongo Swiss, de origem SPF, que é suscetível à infecção, infectado por via oral.

Até o momento, os trabalhos realizados por nosso grupo a respeito da ativação policlonal provocada por *Yersinia* têm utilizado como modelo linhagens suscetíveis de camundongos (Swiss e BALB/c) (MEDEIROS et al., 1995; MEDEIROS et al., 1997; MEDEIROS et al., 2000; RAMOS et al., 2001; CRESPO et al., 2002; MEDEIROS et al., 2003; SILVA et al., 2003). Não sabemos se linhagens

resistentes de camundongos, como a C57BL/6, também desenvolvem ativação policlonal.

Células B responsivas são controladas por moléculas acessórias que ligam receptores de antígeno às vias sinalizadoras inibitórias ou estimulatórias, dependendo da natureza do antígeno e das circunstâncias em que esse antígeno é encontrado (CAZAC AND ROES, 2000; FEARON AND CARROL, 2000). Além disso, a interação com células T auxiliares (Th) antígeno-específicas é importante para a mobilização de uma resposta eficiente de anticorpos, dirigida contra antígenos protéicos, e o estabelecimento de células B de memória (CAZAC AND ROES, 2000).

Moléculas sinalizadoras secretadas estimulam ou inibem funções efetoras de populações distintas de leucócitos e podem desempenhar uma função central no direcionamento e função da resposta imune (SHER et al., 1992).

Embora as células T desempenhem uma função importante na patogênese da artrite reativa, o mecanismo exato pelo qual a resposta imune é iniciada ainda é pouco esclarecido.

Os subgrupos 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 (secretoras de interleucina-4 [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 (YIN et al., 1997; HERMANN-MÄRHER & HÖKLER, 1998).

Estes subgrupos também diferem significativamente em sua capacidade de auxiliar a produção de anticorpos por linfócitos B (MOSSMAN & COFFMAN, 1989).

Células Th1 auxiliam os linfócitos B na produção de anticorpos, favorecendo a produção do isótipo IgG2a. Pelo contrário, células Th2 proporcionam auxílio à célula B para produção de anticorpos de vários isótipos, com um amplo espectro de funções efectoras Fc-dependentes (LAHESMAA et al., 1994). Os resultados obtidos no trabalho de Silva et al. (2003) mostraram que, com as três amostras de *Y. enterocolitica* testadas, embora tenha sido observado um aumento na produção de células secretoras de IgG2a, também foi observada a ativação de clones secretores de outros isótipos de imunoglobulinas. O direcionamento para a produção destes isótipos de imunoglobulina pode sugerir um padrão Th2 de resposta imune.

A resposta imune é mantida sob controle por um processo homeostático. Dentre as células que podem ser responsáveis por essa regulação muita atenção tem-se voltado para as células T. O conceito de células T supressoras emergiu quando foi demonstrado que a estimulação do sistema imune por antígenos T-dependentes poderia dar origem à produção de células T supressoras que regulavam negativamente a diferenciação das células T auxiliares ou células efectoras antígeno-específicas (CRISPIN et al., 2004).

É amplamente aceito que o desenvolvimento de doenças auto-imunes envolve a quebra de mecanismos que controlam a tolerância das células T a antígenos próprios (DELVES & ROITT, 2000). Células T auto-reativas são primariamente eliminadas no timo por seleção negativa. Entretanto, algumas células T auto-reativas podem escapar da seleção tímica e serem liberadas na periferia. Durante 30 anos, estudos conduzidos em diferentes modelos experimentais demonstraram a existência de um mecanismo de imunossupressão no qual um subgrupo particular de células previne a ativação de células auto-reativas (SHEVACH, 2000).

Uma resposta imune celular eficiente, necessária para superar a infecção por *Yersinia*, é controlada por diferentes tipos celulares e suas respectivas citocinas (AUTENRIETH et al., 1992; AUTENRIETH et al., 1994; BOHN et al., 1994; BOHN & AUTENRIETH, 1996; BOHN et al., 1998; ZHAO et al., 2000). Foi demonstrado que nos primeiros três dias após infecção por *Y. enterocolitica*, a resposta imune inata do hospedeiro, particularmente envolvendo fagócitos Mac-1⁺ e células NK, desempenha uma função importante, controlando o crescimento deste patógeno nos tecidos do hospedeiro. Depois disso, uma resposta de célula T específica é montada, com as células Th1 CD4⁺ desempenhando uma função protetora importante. 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).

A resposta protetora do hospedeiro à yersiniose é mediada por várias citocinas pró-inflamatórias. Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-12 (IL-12) e interferon-gama (IFN- γ) são essenciais na resistência contra este patógeno, sugerindo que células T ativadas por macrófagos são células efetoras importantes na resposta protetora do hospedeiro à *Yersinia* (AUTENRIETH et al., 1992, AUTENRIETH & HEESEMAN, 1992, BOHN & AUTENRIETH, 1996, BOHN et al., 1998).

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

O próprio papel das células T CD4⁺ na eliminação da infecção por *Yersinia*, embora crucial, parece ser ambíguo. Assim, células T CD4⁺ promovem eliminação de *Y. enterocolitica* em camundongos C57BL/6 (BOHN & AUTENRIETH, 1996), mas promovem exacerbação da infecção em camundongos BALB/c. 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 tanto células T CD8+ quanto células NK no que se refere à sua potencial capacidade de eliminar *Yersinia* (BOHN et al., 1998).

Um outro mecanismo de controle da resposta autoimune é mediado por células T regulatórias, as quais expandem a sua diversidade de ação devido à expressão de vários marcadores fenotípicos ou pela produção de citocinas. A participação das citocinas tem sido demonstrada em muitos modelos “in vivo” de autoimunidade, onde as células regulatórias participam, fornecendo evidências a favor de uma função para as citocinas na regulação imune. Diferentes citocinas podem regular negativamente tanto a resposta imune normal quanto as respostas autoimunes. TGF- β , IL-10 e IL-4 são consideradas moléculas inibitórias. TGF- β e IL-10 inibem tanto respostas mediadas por células Th1 quanto por Th2 “in vivo”. IL-4 parece regular negativamente várias doenças autoimunes mediadas por células Th1, enquanto, IFN- γ , parece inibir as respostas mediadas por células Th2 (MALOY et al, 2003).

Entretanto, o papel imunorregulatório de TGF- β ainda não está claro. Dados contraditórios sobre as respostas Th1 mediadas por TGF- β foram relatados, indicando que esta citocina estimula (SWAIN et al., 1991; FARGEAS et al., 1992; NAGELKERKEN et al., 1993) ou regula negativamente o desenvolvimento de células Th1 (WU et al., 1994; HOHEN et al., 1995).

Os dados a respeito do papel de TGF- β nas infecções também são contraditórios. TGF- β promove infecção em *Leishmania braziliensis* (BARRAL et al., 1993) e *Toxoplasma gondii* (HUNTER et al., 1995) em correlação com a regulação negativa de IL-4 e IL-10 (BARRAL et al., 1993). Além disso, na infecção pelo *T. gondii*, TGF- β inibe os efeitos protetores da IL-12 em camundongos com

desordem de imunodeficiência combinada (HUNTER et al., 1995). 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).

Desta maneira, parece importante entender-se o balanço crítico entre citocinas pró-inflamatórias e regulatórias nas infecções por *Yersinia*.

Em nosso estudo realizamos a infecção experimental de camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6), com uma amostra virulenta de *Y. enterocolitica* O:8, portadora do plasmídeo de virulência pYV (*Y. enterocolitica* WA-2707), a fim de verificarmos o papel da ativação policlonal nestas duas linhagens de camundongos. Além disso, realizamos uma análise comparativa do balanço entre citocinas pró-inflamatórias e regulatórias produzidas *in vivo* por estes animais durante a infecção por *Yersinia*, com ênfase no estudo do papel das citocinas supressoras como IL-4, IL-10 e TGF- β .

II- Objetivos

1. Verificar se ocorre ativação policlonal de linfócitos B em camundongos resistentes (C57BL/6) e suscetíveis (BALB/c) à infecção por *Y. enterocolitica* O:8. Caracterizar o padrão isotípico das imunoglobulinas.
2. Determinar o padrão de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, e TGF- β) e as subpopulações de linfócitos T envolvidas nesta produção, em camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados por *Yersinia enterocolitica* O:8.
3. Verificar a presença de anticorpos específicos anti-*Yersinia* no soro dos animais infectados e controles.

III- Material e Métodos

1- Animais de experimento:

Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, fêmeas, “SPF”, com cerca de 6 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP – CEMIB e Biotério de Camundongos Isogênicos ICB/USP-SP -. Os animais foram mantidos em gaiolas, em um biotério controlado, sob pressão positiva, com livre acesso à água e comida estéreis.

2- Amostra bacteriana:

Yersinia enterocolitica WA-2707, portadora de plasmídeo de virulência, biotipo 2, sorotipo O:8, lisotipo X_z

A amostra foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Referência em *Yersinia* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Câmpus de Araraquara – SP.

Antes da utilização da amostra bacteriana para a infecção experimental dos animais, a presença do plasmídeo de virulência foi confirmada através da técnica de Birboim modificada por Lee Ryley (BIRBOIM & DOLY, 1979)

3- Infecção experimental dos animais com a amostra bacteriana (MEDEIROS et al., 1995).

3.1- Reativação da amostra de *Yersinia* e padronização do inóculo:

Antes de ser utilizada, a bactéria foi reativada através de passagem em camundongos. Para tal, dois camundongos foram inoculados por via intravenosa com 0,2 mL de uma suspensão do microrganismo, contendo um valor estimado de 10⁷ células/mL. Após 24 horas, esses animais foram sacrificados. O baço foi retirado

e então triturado com 1 mL de solução salina 0,85% estéril e o produto foi semeado em meio de ágar base sangue (BAB) e incubado a 25° C por 48 horas.

A partir deste crescimento preparou-se o inóculo. O crescimento da placa de ágar base sangue (BAB), da amostra de *Yersinia*, foi ressuspensão em solução salina estéril e padronizado em espectrofotômetro de maneira a obter uma suspensão com cerca de 4 a 6 x 10² CFU/mL (AUTENRIETH et al., 1994). Um volume de 0,1 mL da diluição 10⁻⁶ da referida suspensão foi plaqueado em BAB, sendo as placas incubadas a 25°C por 48 horas. Após esse período o número de colônias foi contado, obtendo-se um valor médio de colônias/placa.

3.2- Esquema de inoculação:

Grupos de animais suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6) foram inoculados, por via intravenosa, com 0,2 mL da suspensão bacteriana da amostra contendo cerca de 1x10² e 1x10⁴ células/mL, respectivamente. O mesmo número de animais, não inoculados, foi mantido como controle (AUTENRIETH et al., 1994).

Três animais de cada grupo, BALB/c e C57BL/6, foram sacrificados, submetidos à punção cardíaca e à remoção do baço no 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção.

4- Determinação do número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (inespecíficas e específicas), através da técnica de ELISPOT (CZERKINSKY et al, 1983).

4.1- Preparo do extrato bruto da amostra de *Yersinia*:

Os extratos brutos foram preparados através da desintegração de células viáveis de *Yersinia enterocolitica* O:8 por sonicação (Sonicator® - Ultrasonic

processor XL) ,10 picos de 1 minuto, 15 setting e centrifugação a 7.000 g, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante obtido teve a sua concentração protéica avaliada através da dosagem pelo método de Lowry et al (1951).

4.2- Obtenção das células esplênicas:

Os animais dos grupos controle e inoculado foram sacrificados no 3°, 7°, 14°, 21° e 28° dias após a infecção experimental. O baço foi retirado e transferido para uma placa de Petri pequena, contendo 5 mL de BSS, pH 7,2, gelado. A seguir, o baço foi macerado para a liberação das células esplênicas. A suspensão celular obtida foi homogeneizada várias vezes, utilizando-se uma seringa de 3 mL com agulha 25x8, e a seguir transferida para tubos cônicos de polietileno, graduados, sendo então centrifugada. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio BSS, pH 7,2. Esse processo foi repetido 2 vezes. Antes da 3ª lavagem as células foram ressuspensas em 5mL de cloreto de amônio 0,83% suplementado com soro fetal e foram deixadas em repouso por 5 minutos, a temperatura ambiente para lise das hemácias. A suspensão foi centrifugada novamente e, então, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 (Sigma) suplementado com soro fetal para se efetuar a 3ª lavagem. Após essa lavagem a suspensão celular foi filtrada em gaze para retenção dos “debris” celulares.

4.3- Viabilidade das células esplênicas:

O número de linfócitos viáveis no baço de cada camundongo foi avaliado através da técnica de exclusão com Azul Trypan (MISHELL & SHIIGI, 1980). A um dado volume da solução de Azul Trypan 0,2% foi adicionado um volume da suspensão de células esplênicas na diluição apropriada e os linfócitos viáveis foram contados em Câmara de Neubauer.

4.4- Teste ELISPOT:

Placas de ELISA de fundo chato foram recobertas com soro anti-imunoglobulinas totais de camundongo (Sigma) (para detecção do número total de células secretoras de imunoglobulinas) ou com extrato bruto da amostra bacteriana (para detecção de células secretoras de imunoglobulinas antígeno-específicas), diluídos em tampão K_2HPO_4/KH_2PO_4 0,05M, pH 8,0. As placas foram incubadas "over-night" a 4° C. Após esse período as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/T, cinco minutos cada. Após saturação das placas com PBS/T contendo 1% de gelatina (2 horas – 37° C), as suspensões celulares obtidas do baço dos camundongos infectados e controles, diluídas em meio RPMI 1640, foram adicionadas em concentrações apropriadas (10^5 e 10^6 para realização do ELISPOT inespecífico e 10^6 e 10^7 para realização do ELISPOT específico). As placas foram incubadas por 6 h a 37° C, em estufa contendo 5% de CO_2 e umidificação, e a seguir as células foram lisadas com um pulso rápido de água destilada contendo 0,05% de Tween 20. Após esse tratamento foram adicionados soros biotinizados (Southern Biotech) anti-IgG₁, anti-IgG_{2a}, anti-IgG_{2b}, anti-IgG₃, anti-IgM de camundongo, diluídos a 1/1500 e anti-IgA de camundongo, diluído a 1/4000 em PBS/T contendo 1% de gelatina. As placas foram incubadas "over-night" a 4°C. Após a incubação, foi realizada a lavagem das placas e adicionada uma solução de fosfatase alcalina ligada à estreptavidina (GIBCO) diluída 1/2500 em PBS/T contendo 1% de gelatina com nova incubação por 2 h a 37° C. Novamente as placas foram lavadas e a seguir foi adicionado o substrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato – BCIP, a 1mg/mL em tampão AMP-2-amino-2-metil-1-propanol, SIGMA). Após 3-4 horas de incubação a 37° C, as imunoglobulinas secretadas foram visualizadas como pontos azulados, contadas e sua frequência determinada em relação ao número total de células adicionadas às cavidades da placa.

5- Detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia enterocolitica* O:8, através da técnica de ELISA (MEDEIROS et al, 1991).

5.1- Obtenção dos soros:

Cada camundongo foi submetido à punção cardíaca para obtenção do soro. O sangue coagulado foi mantido por 15 minutos em estufa a 37°C, centrifugado, e o sobrenadante estocado em “ependorff” a –20°C até o momento do uso.

5.2- Técnica de ELISA indireta:

O nível de anticorpos específicos foi determinado nos soros dos animais controles e infectados com a amostra de *Y. enterocolitica* WA-2707.

O extrato bruto da amostra bacteriana diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6, a uma concentração de 5 µg/mL, foi adsorvido em placas de microtitulação de fundo chato (COSTAR), seguido de incubação a 4°C durante 18 horas. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T), 5 minutos. Os soros dos animais infectados e controles foram diluídos em PBS/T contendo 1% de soro albumina bovina (PBS/T/BSA), a partir de 1/40 para detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia* do isotipo IgM e IgA, e 1/320 para o isotipo IgG. Um volume de 100 uL foi adicionado às cavidades da placa, e esta foi incubada a 37°C, durante 1 h. Após novas lavagens com PBS/T, foram adicionados 100 uL dos conjugados anti-IgG e anti-IgM de camundongo diluídos 1/2000, e anti-IgA diluído a 1/4000, em PBS/T/BSA, todos marcados com peroxidase (SIGMA), e a placa foi incubada 1 h. Após novas lavagens, foi adicionado 100 uL do substrato orto-fenilenodiamina (OPD – SIGMA), em uma concentração de 10 mg diluídos em 25 mL de tampão citrato 0,1M, pH 5,0, contendo 10 uL de peróxido de hidrogênio. Após uma

incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, a reação foi bloqueada acrescentando-se 100 uL de HCL 3N. A leitura das placas foi feita através da medida de absorvância em espectrofotômetro (Microplate Reader – Model 550 - BIO-RAD), em um comprimento de onda de 492 nm.

Os soros de 3 animais não-infectados foram utilizados para se determinar o valor de “cut off”. A média das densidades ópticas (DO) + 2 desvios padrão, para cada isotipo de Ig, foi determinada e considerada como o “cut off”.

6 - Análise fenotípica dos linfócitos esplênicos, através da técnica de CITOMETRIA DE FLUXO (MORITA et al, 1998).

6.1 - Obtenção da suspensão celular de linfócitos.

Para obtenção do número adequado de linfócitos viáveis, foi feito um *pool* de células esplênicas, utilizando-se para tanto 3 animais de cada grupo, infectados e controles. O baço dos animais foi removido, macerado com cerca de 5 mL de PBS estéril. Todo o volume foi transferido para tubos Falcon de 15 mL, sendo adicionados mais 5 mL de PBS estéril. A suspensão foi lavada 2 vezes, a 358 g por 5 min cada.

A suspensão celular do baço dos animais infectados e controles foi enriquecida para linfócitos através da remoção das células aderentes. Para tanto a suspensão celular foi cultivada em meio RPMI 1640 (Sigma) por 1 h a 37°C em placas plásticas de poliestireno de 24 cavidades. As células não-aderentes foram então coletadas e tratadas com 5mL de cloreto de amônio 0,83% suplementado com soro fetal, deixadas em repouso por 5 minutos, à temperatura ambiente, para lise das hemácias. Após essa etapa as células foram contadas em câmara de Neubauer.

As células esplências foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol, estreptomicina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, penicilina (100 U/mL) e 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, a uma concentração final de 2×10^6 células/mL.

As células foram então bloqueadas com uma solução de *Mouse FcBlock*[™] (BD PharMingen) e incubadas por 45 minutos a 4°C. Após a incubação as células foram distribuídas nos tubos de FACS, num volume de 250 $\mu\text{L}/\text{tubo}$.

6.2 - Análise fenotípica dos linfócitos esplêncios.

Uma fração das células não-aderentes foi examinada por tripla coloração com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular. As células foram incubadas com concentrações saturantes de anticorpo monoclonal anti-CD3 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD4 conjugado com ficoeritrina (PE) e anti-CD8 conjugado com *spectral red* (SPRD) (Southern Biotech), e seus respectivos isótipos controles, incubadas no escuro, por 30 minutos a 4°C, lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA, centrifugadas a 358 g por 10 minutos, e ressuspensas em 400 μL de PBS contendo 1% paraformaldeído, para fixação, e estocadas no escuro a 4°C até o momento da análise.

A análise da expressão dos marcadores de superfície foi realizada utilizando-se um citômetro de fluxo FACSort (Becton Dickinson). Os linfócitos foram especificamente analisados por “gating” seletivo baseado nos parâmetros de tamanho e granulosidade celulares. Imunoglobulinas isotipo-específicas marcadas com os mesmos fluorocromos (BD PharMingen), que não se ligam aos linfócitos murinos, foram utilizadas como controles.

7- Detecção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α , TGF- β e IFN- γ através da técnica de CITOMETRIA DE FLUXO (MORITA et al., 1998).

Uma outra fração das células não-aderentes foi cultivada em placas de 24 cavidades (Costar), numa concentração de 2×10^6 células/mL em 10 mL de RPMI 1640 contendo 1% de BSA, suplementado com 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol, estreptomicina 10 μ g/mL, penicilina (100 U/mL) e estimuladas por 6 h a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, com uma combinação de 25 ng/mL de forbol miristato acetato (PMA) e 1 μ g/mL de ionomicina (SIGMA). Após 4 h de cultura, foi adicionada brefeldina A (SIGMA) a 10 μ g/mL. Seguiu-se nova incubação por um período de 2 h.

As células foram então coradas com concentrações saturantes de anticorpos monoclonais anti-CD3-FITC, anti-CD8-SPRD, e respectivos isótipos controles, e incubadas por 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após lavagens com PBS, as células foram fixadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído. As células foram então estocadas “overnight” a 4°C, no escuro.

Para a coloração das citocinas intracelulares, as células foram lavadas com PBS e posteriormente acrescidas de 180 μ L de solução de Cytofix/Cytoperm (BD) e incubadas por 20 minutos, a 4°C, no escuro. A seguir, as células foram lavadas 2 vezes com uma solução de Perm Wash (BD), a 358 g, a 4° C, por 10 minutos, ressuspensas em 50 μ L de Perm Wash e incubadas com vários anticorpos monoclonais citocina-específicos e anticorpos monoclonais isótipo-controles conjugados com PE, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Os anticorpos monoclonais citocina-específicos utilizados foram: anti-IL-10 (Caltag), a-IL-4 (R&D System), a-TNF- α (Caltag), a-IFN- γ (Caltag) e a-TGF- β (BD Pharmingen). Após 2 lavagens com PerWash (exceção ao TGF- β , onde foi utilizado Perm Wash acrescido de 4% de BSA), as células foram fixadas e estocadas a 4°C, no escuro até o

momento da análise. Para o TGF- β , em virtude de utilizarmos uma ponte com um anticorpo biotinizado conjugado à PE, foram repetidos os passos de permeabilização, antes da fixação. Para análise, as células foram ressuspensas em 400 μ L de PBS/ 1% de paraformaldeído e analisadas por citometria de fluxo.

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- Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Comparação entre o grupo de animais infectados e o grupo controle foi realizada através do teste t-Student, utilizando-se o "software" Origin 4.1. Diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$.

IV- Resultados

1. Determinação do número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (totais e específicas).

Os resultados do número total de linfócitos viáveis determinado no baço dos animais BALB/c e C57BL/6, controles e infectados, encontram-se na **Tabela 1**.

Os resultados obtidos com as suspensões celulares provenientes dos baços dos camundongos BALB/c, infectados com 1×10^2 células/mL, e dos baços dos animais do grupo controle (não-infectados), quanto ao número de células secretoras de Igs totais produzidas nos diferentes dias pós-infecção, avaliadas através da técnica de ELISPOT, encontram-se nas **Figuras 1a e 1b e Tabela 2**. Os resultados são apresentados como a média de 3 animais infectados, em diferentes dias pós-infecção. Os valores das médias aritméticas do número de células secretoras de Igs específicas são apresentados na **Tabela 3**.

Analisando a **Tabela 1**, podemos observar, de um modo geral, um aumento no número de linfócitos viáveis nos animais infectados BALB/c e C57BL/6, quando comparado aos animais controles. Comparando-se os animais infectados BALB/c e C57BL/6, observamos um maior aumento na população de linfócitos esplênicos nos primeiros, ao longo de toda cinética da infecção, com um pico de produção entre o 21^o e 28^o dia p.i.

Analisando as **Figuras 1a e 1b**, podemos observar que os animais BALB/c apresentaram um aumento no número de células secretoras de Igs totais logo no início da infecção, a partir do 7^o dia p.i.

Os maiores aumentos observados foram dos isótipos IgG1 (27,2 vezes aumentado em relação aos controles), no 28^o dia p.i, IgG2a (aumento de 12,2

vezes em relação aos animais controles), no 14^o dia p.i. e IgG3 (aumento de 13,3 vezes em relação aos animais controles), no 28^o dia (**Figura 1a**).

O número de células secretoras de Igs totais, do isótipo IgM, apresentou-se elevado, em relação aos controles, durante todo o período avaliado, sendo que o pico de secreção de IgM ocorreu no 28^o dia p.i. (aumento de 8 vezes em relação aos controles). O número de células secretoras de Igs do isótipo IgG2b apresentou-se elevado a partir do 7^o dia p.i., com pico de secreção no 21^o dia (aumento de 5,4 vezes em relação aos controles). Já o isótipo IgA apresentou um aumento significativo apenas no 7^o e 21^o dia p.i., com pico de secreção no 7^o dia p.i. (4,3 vezes) (**Figura 1b**).

Na **Tabela 3**, podemos observar um aumento no número de células secretoras de Igs específicas já a partir do 7^o dia p.i. para todos os isótipos testados. O maior aumento foi do isótipo IgM (219 células secretoras/baço x 10²), no 28^o dia. Para os isótipos IgG1 e IgG2a o pico de secreção ocorreu no 28^o dia p.i. O pico de secreção de IgG3 e IgA ocorreu no 14^o dia p.i., enquanto que o de IgG2b ocorreu no 21^o dia p.i.

Os resultados obtidos com as suspensões celulares provenientes dos baços dos camundongos C57BL/6, infectados com 1x10⁴ células/mL, e dos baços dos animais do grupo controle (não-infectados), quanto ao número de células secretoras de Igs totais produzidas nos diferentes dias pós-infecção, avaliadas através da técnica de ELISPOT, encontram-se nas **Figuras 1a e 1b e Tabela 4**. Os resultados são apresentados como a média de 3 animais infectados, em diferentes dias p.i. Os valores das médias aritméticas do número de células secretoras de Igs específicas são mostrados na **Tabela 5**.

Na **Figura 1a**, podemos observar um aumento no número de células secretoras de Igs totais entre o 14^o e 21^o dias p.i. O maior aumento foi do isótipo IgG2a (aumento de 7,8 vezes em relação aos animais controles), no 21^o dia.

O número de células secretoras de Igs totais do isótipo IgG1 apresentou-se aumentado no 14^o dia p.i (aumento de 6,2 vezes em relação aos controles). Para o isótipo IgG3 observou-se um aumento no 21^o dia p.i (aumento de 5,3 vezes). O isótipo IgG2b apresentou-se elevado entre o 14^o e 28^o dias p.i, com pico no 14^o dia (aumento de 6,5 vezes) (**Figura 1a**). O isótipo IgM apresentou um pico de secreção no 7^o dia p.i (aumento de 5,1 vezes em relação aos animais controles), enquanto o isótipo IgA apresentou um pico de secreção no 21^o dia p.i (aumento de 6,2 vezes em relação aos controles) (**Figura 1b**).

Na **Tabela 5**, podemos observar que o número de células secretoras de Igs específicas, para todos os isótipos testados, apresentou-se aumentado no 21^o dia p.i. O maior aumento foi do isótipo IgM (76 células secretoras/baço x 10²), no 21^o dia p.i.

Quando comparamos o número de células secretoras de Igs inespecíficas dos animais da linhagem BALB/c e os C57BL/6 observamos que os animais BALB/c apresentaram uma maior secreção dos isótipos IgG1 (3,2 vezes), IgG2a (2,4 vezes), IgG3 (1,7 vezes) e IgM (3,2 vezes), em relação aos C57BL/6. Os animais C57BL/6 apresentaram, de uma maneira geral, um menor número de células secretoras de Igs totais em relação aos BALB/c, para todos os isótipos testados.

Tabela 1 – Número de linfócitos viáveis, no baço dos animais BALB/c e C57BL/6 controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8, determinado por contagem em Câmara de Neubauer, pela técnica de exclusão com Azul de Trypan. Os valores apresentados representam a média aritmética e o desvio padrão do número de linfócitos viáveis, obtidos por baço.

Número de linfócitos viáveis/baço				
Dias p.i	BALB/c		C57BL/6	
	I	C	I	C
3°	4,9 x 10 ⁸ ±1,4	4,4 x 10 ⁸ ±0,3	3,4 x 10 ⁸ ±0,6	2,9 x 10 ⁸ ±1,0
7°	5,4 x 10 ⁸ ±1,0	3,6 x 10 ⁸ ±0,5	4,6 x 10 ⁸ ±0,9	2,2 x 10 ⁸ ±0
14°	5,8 x 10 ⁸ ±0,8	3,1 x 10 ⁸ ±1,0	4,2 x 10 ⁸ ±0,8	3,1 x 10 ⁸ ±0,1
21°	12,8 x 10 ⁸ ±0,2	5,3 x 10 ⁸ ±2,6	4,6 x 10 ⁸ ±1,8	3,7 x 10 ⁸ ±0,4
28°	10,5 x 10 ⁸ ±9,2	3,3 x 10 ⁸ ±0	3,8 x 10 ⁸ ±0,2	3,4 x 10 ⁸ ±0,8

I= Infectados

C= Controles

Tabela 2 – Número total de células secretoras de imunoglobulinas (Igs), detectadas no baço dos camundongos BALB/c controles e infectados, por via i.v., com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA- 2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores apresentados representam a média aritmética e o desvio padrão do número total de células secretoras de Igs, obtidos por baço.

Igs	Média e desvio padrão do nº total de células secretoras de Igs /baço x 10 ²					
	Dias após a infecção					
	3 ^o	7 ^o	14 ^o	21 ^o	28 ^o	C
IgG1	377±0*	763±0*	864±0*	1386±0*	2584±0*	95±30
IgG2a	290±0*	401±123*	1037±55*	416±178	901±0*	85±27
IgG2b	501±152	1342±0*	1108±254*	1613±0*	1564±0*	300±86
IgG3	126±67	732±0*	578±142*	307±113	799±0*	60±32
IgM	744±366	1879±0*	2203±214*	2451±0*	3485±0*	437±130
IgA	365±0	781±0*	261±6	387±0	255±0	182±79

C= Controles (média±SD dos animais controles em diferentes dias p.i.)

* = p<0,05 em relação ao grupo controle

Tabela 3 – Número de células secretoras de imunoglobulinas específicas, detectadas no baço dos camundongos BALB/c infectados, por via i.v., com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores apresentados representam a média aritmética do número de células secretoras de Igs específicas, obtidos por baço.

Igs	Média do nº de células secretoras de Igs específicas/baço x 10 ²					
	Dias após a infecção					
	3 ^o	7 ^o	14 ^o	21 ^o	28 ^o	C
IgG1	5	30	84	83	181	0
IgG2a	5	14	48	39	65	0
IgG2b	2	16	57	122	65	0
IgG3	8	43	48	26	13	0
IgM	10	35	177	83	219	0
IgA	0	11	23	0	0	0

C= Controles (média dos animais controles em diferentes dias p.i.)

Tabela 4 – Número total de células secretoras de imunoglobulinas, detectadas no baço dos camundongos C57BL/6 infectados e controles, por via i.v., com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores apresentados representam a média aritmética e o desvio padrão do número total de células secretoras de Igs, obtidos por baço.

Igs	Média e desvio padrão do nº total de células secretoras de Igs /baço x 10 ²					
	Dias após a infecção					
	3 ^o	7 ^o	14 ^o	21 ^o	28 ^o	C
IgG1	22±17	96±48	792±0*	431±0*	198±0	128±136
IgG2a	56±69	188±6*	438±263*	460±0*	389±0*	59±52
IgG2b	133±0	226±11	734±0*	696±0*	493±0*	112±102
IgG3	106±0	235±183	138±25	454±0*	137±0	85±65
IgM	391±0	1092±0*	368±179	838±0*	713±0*	213±180
IgA	239±0	177±30	79±25	620±0*	461±0*	100±75

C= Controles (média±SD dos animais controles em diferentes dias p.i)

* = p<0,05 em relação ao grupo controle

Tabela 5 – Número de células secretoras de imunoglobulinas específicas, no baço dos animais C57BL/6 infectados, por via i.v., com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores apresentados representam a média aritmética do número de Igs específicas, obtidos por baço.

Igs	Média do nº de células secretoras de Igs específicas/baço x 10 ²					C
	Dias após a infecção					
	3 ^o	7 ^o	14 ^o	21 ^o	28 ^o	
IgG1	4	3	3	45	7	0
IgG2a	4	5	7	37	21	0
IgG2b	5	20	28	54	26	0
IgG3	7	8	6	31	19	0
IgM	73	47	37	76	48	0
IgA	2	5	3	12	6	0

C= Controles (média dos animais controles em diferentes dias p.i)

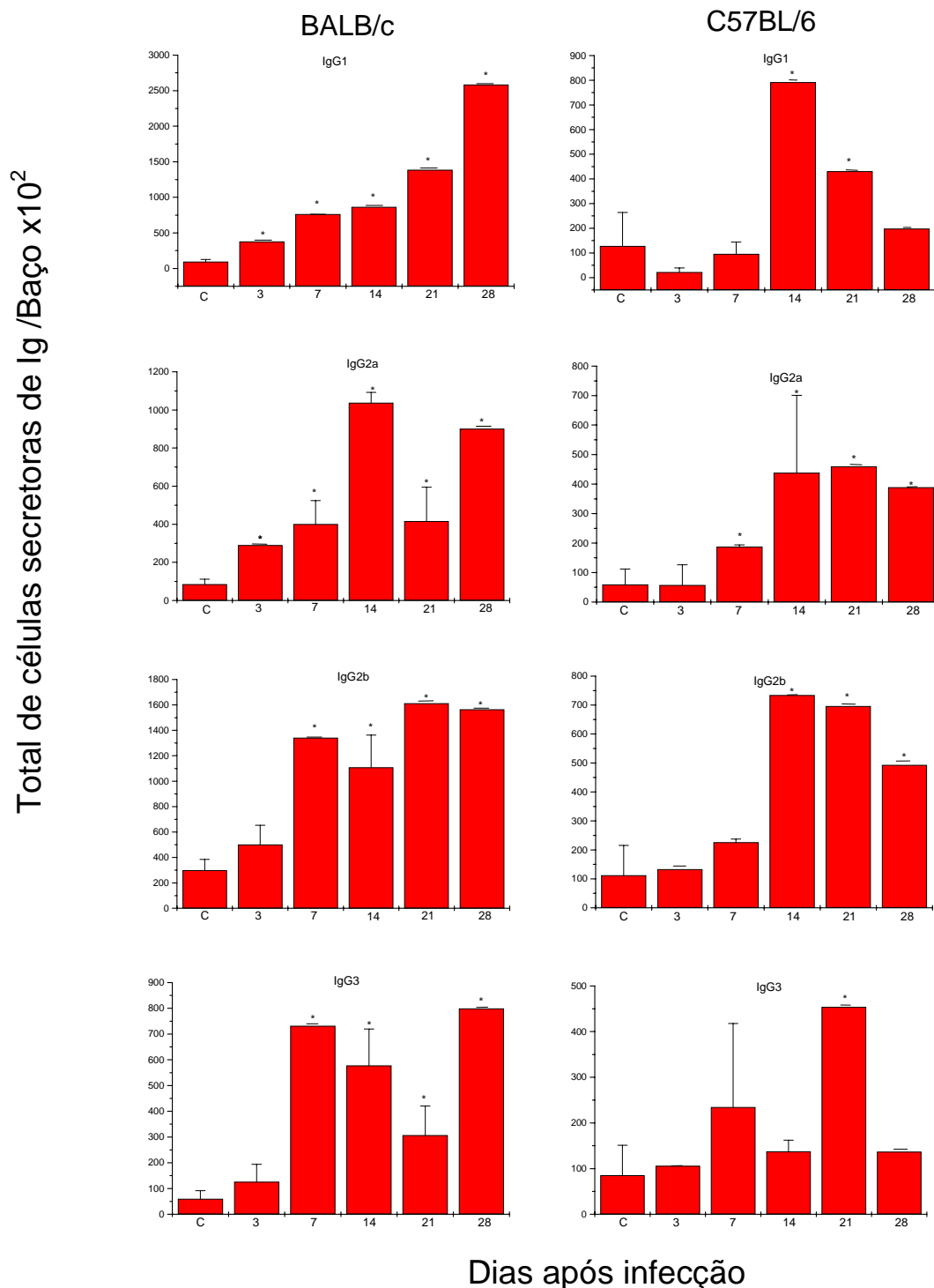


Figura 1a – Número total de células secretoras de imunoglobulinas dos isótipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, determinado no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados com células viáveis de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores representam a média de 3 animais. O símbolo * corresponde às diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, $N=3$). C corresponde à média dos animais controles em diferentes dias p.i.. Os resultados representam os valores médios de dois experimentos independentes.

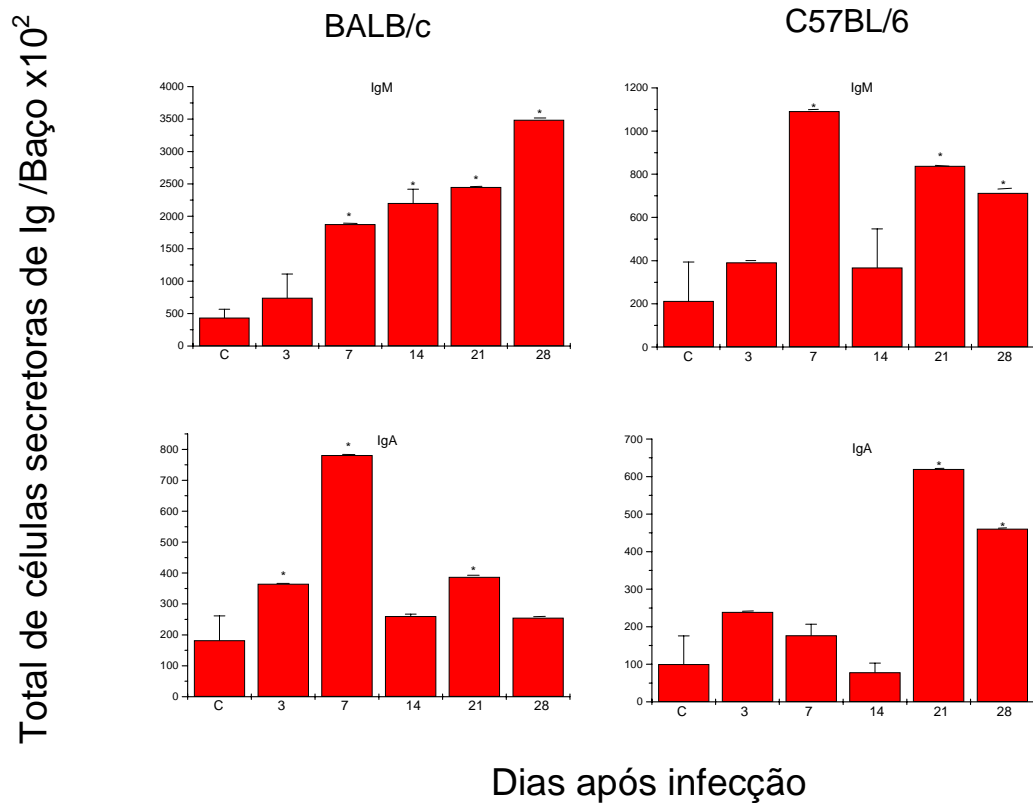


Figura 1b – Número total de células secretoras de imunoglobulinas dos isótipos IgM e IgA, determinado no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados com células viáveis de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707, através da técnica de ELISPOT. Os valores representam a média de 3 animais. O símbolo * corresponde às diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, $N=3$). C corresponde à média dos animais controles em diferentes dias p.i. Os resultados representam os valores médios de dois experimentos independentes.

2. Detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia*

A concentração de anticorpos anti-*Yersinia*, detectada no soro dos camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados e controles, encontra-se na **Figura 2**. Os valores das médias aritméticas e desvio padrão são apresentados na **Tabela 6 e 7**.

Na **Figura 2**, podemos observar que os animais BALB/c apresentaram um aumento na concentração de anticorpos séricos anti-*Yersinia*, do isótipo IgG, a partir do 7º dia p.i., sendo que a partir do 14º dia, os níveis mantiveram-se praticamente constantes. O isótipo IgM apresentou-se aumentado a partir do 7º dia, sendo que o pico de produção ocorreu no 14º dia p.i., decrescendo a seguir.

No soro dos animais C57BL/6, pudemos observar um aumento progressivo na concentração de anticorpos específicos anti-*Yersinia* do isótipo IgG, a partir do 14º dia p.i., com pico no 28º dia. Para o isótipo IgM observou-se um aumento a partir do 7º dia p.i., sendo que o pico de produção foi observado no 21º dia p.i.

Nas duas linhagens de camundongos não foi observada produção de anticorpos séricos do isótipo IgA.

Quando comparamos a reatividade do soro dos animais BALB/c e C57BL/6, podemos observar uma maior secreção de anticorpos específicos anti-*Yersinia* na linhagem BALB/c, sendo que para o isótipo IgG, diferenças significativas foram observadas no 7º, 14º, 21º e 28º dias pós-infecção, com aumentos de 8,7 vezes, 3,7 vezes, 1,9 vezes e 1,1 vezes, respectivamente, em relação aos animais C57BL/6. Para o isótipo IgM diferenças significativas foram observadas no 7º e 14º dias pós-infecção, com elevações de 2,9 e 3,8 vezes em relação aos animais C57BL/6.

Tabela 6 – Detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia* no soro dos animais da linhagem BALB/c controles e infectados por via i.v. com a amostra *Y.enterocolitica* O:8 WA- 2707. Os soros foram diluídos a 1/320 para IgG e 1/40 para IgM. Os valores descritos na tabela representam a densidade ótica (D.O.) medida à 492 nm.

Média e desvio padrão da D.O.						
Ig	Dias após a infecção					Cut-off
	3 ^o	7 ^o	14 ^o	21 ^o	28 ^o	
IgG	0,068±0,04*	0,295±0*	1,621±0,05*	1,653±0,004*	1,661±0,006*	0,043
IgM	0,087±0,006	0,588±0,151*	0,715±0,040*	0,533±0,247*	0,429±0,234*	0,105

*p<0,05 em relação ao grupo controle

Tabela 7 – Detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia* no soro dos animais da linhagem C57BL/6 controles e infectados com a amostra *Y.enterocolitica* O:8 WA- 2707. Os soros foram diluídos a 1/320 para IgG e 1/40 para IgM. Os valores descritos na tabela representam a densidade ótica (D.O.) medida à 492 nm.

Média e desvio padrão da D.O.						
Ig	Dias após a infecção					Cut-off
	3 ^o	7 ^o	14 ^o	21 ^o	28 ^o	
IgG	0,037±0,004*	0,034±0,012	0,442±0,129*	0,847±0,106*	1,574±0,006*	0,028
IgM	0,023±0,008	0,205±0,186*	0,186±0,021*	0,266±0,104*	0,175±0,013*	0,046

*p<0,05 em relação ao grupo controle

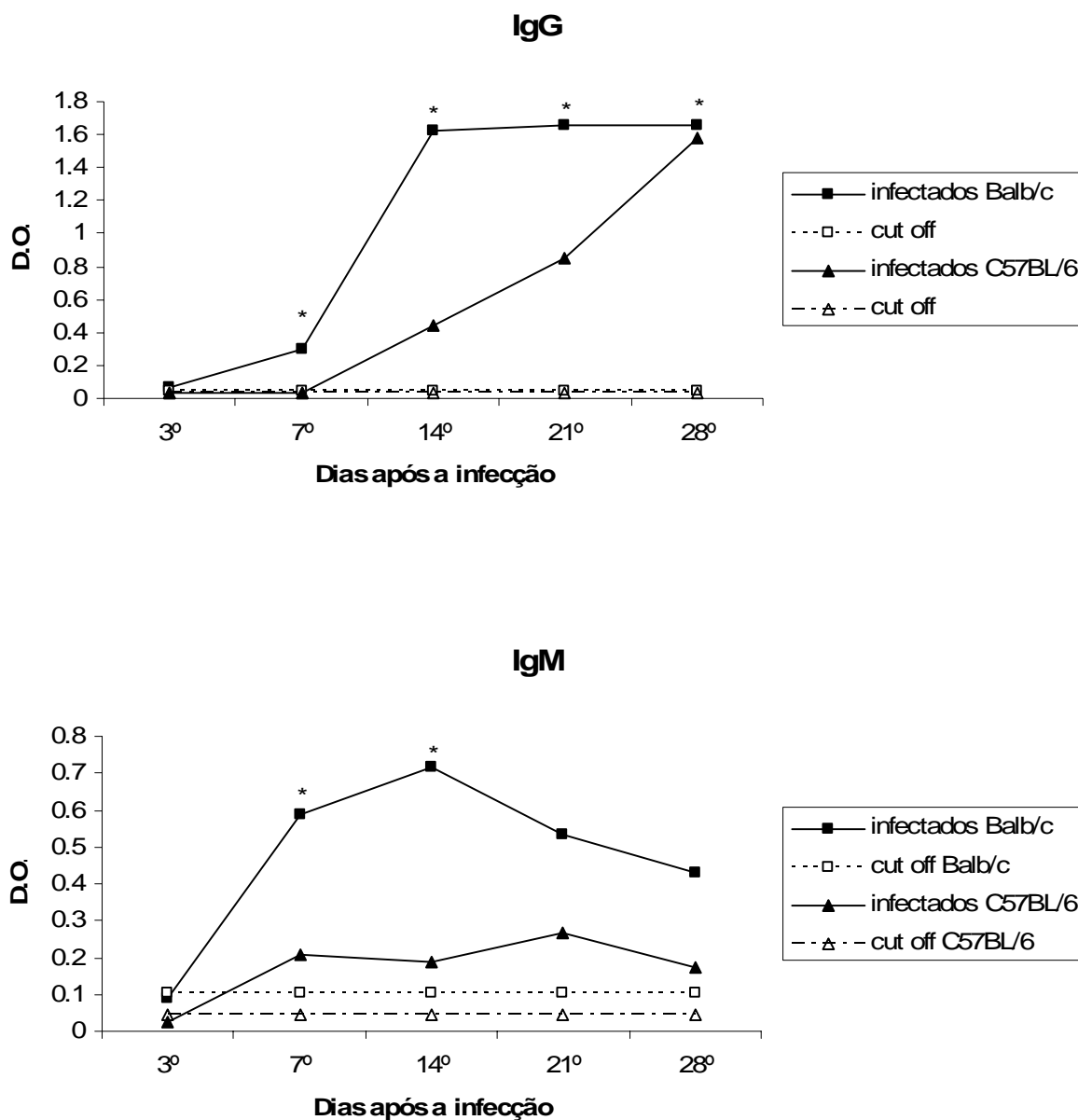


Figura 2 – Detecção dos níveis de anticorpos anti-*Yersinia* nos soros dos camundongos BALB/c, controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707, em diferentes dias após infecção. Os soros foram diluídos a 1/320 para IgG e 1/40 para IgM. O símbolo * corresponde às diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, $N = 3$) entre os animais BALB/c e C57BL/6. As linhas pontilhadas correspondem ao valor do cut-off (cut-off IgG Balb/c=0.043 e cut-off IgG C57BL/6=0,028; cut-off IgM BALB/c = 0.105; cut-off IgM C57BL/6 = 0.046). Os resultados representam os valores médios de dois experimentos independentes.

3- Análise fenotípica dos linfócitos esplênicos dos animais controles e infectados com *Yersinia*

Os estudos imunofenotípicos das células T foram realizados utilizando-se um pool de células obtidos a partir de uma suspensão de linfócitos esplênicos dos animais BALB/c e C57BL/6 controles e infectados por via i.v. com *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707. A proporção de células CD3+, CD4+ e CD8+ detectada por citometria de fluxo, está apresentada na **Tabela 8 e Figuras 3 e 4**, que representam os valores de um experimento representativo, sendo os valores expressos em % de células.

Nos animais BALB/c, observou-se um predomínio da população de linfócitos T CD4+ durante todo o curso da infecção. Em praticamente todos os dias p.i. as porcentagens de linfócitos T CD4+ e T CD8+ dos animais infectados ficou abaixo dos valores observados nos animais controles. A maior população de linfócitos T CD4+ foi verificada no 14^o dia pós-infecção (28,2±17,1%). Na população de linfócitos esplênicos T CD8+ dos animais infectados, a maior proporção de linfócitos marcados também ocorreu no 14^o dia da cinética de infecção (14,8±9,6%).

Nos animais C57BL/6, observou-se um predomínio da população de linfócitos T CD4+ durante praticamente toda a cinética de infecção, com exceção do 7^o dia p.i. A maior proporção de linfócitos T CD4+ foi observada no 14^o dia p.i. (24,7±13,1%), com aumento em relação aos controles de 1,3 vezes. Com relação à população de linfócitos T CD8+, observou-se um aumento no número de linfócitos viáveis no 21^o p.i. (18,8±0%), com aumento em relação ao controle de 1,06 vezes.

Tabela 8 – Proporção de células CD3+, CD4+CD8- (CD4+) e CD3+CD8+ (CD8+) no baço dos camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados, por via i.v, com a amostra de *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707, determinada por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, a partir de um pool de células, num total de 10.000 eventos. Os anticorpos monoclonais específicos estavam conjugados aos fluorocromos: FITC, PE E SPRD, respectivamente.

		BALB/c						C57BL/6									
		I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C				
Dias p.i		CD3+	CD3+	CD4+	CD4+	CD8+	CD8+	CD8+	CD8+	CD3+	CD3+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD8+	CD8+
3		46,50	42,93	24,03	30,60	10,35	11,02	37,37	34,18	10,43	22,42	9,35	17,52				
7		34,56	39,73	13,43	21,84	8,22	10,72	31,18	32,17	6,57	14,97	11,22	14,28				
14		23,82	37,09	16,11	23,70	8,09	12,61	28,16	40,59	15,45	21,71	15,05	19,59				
21		25,26	21,90	12,65	26,07	6,87	11,80	23,04	20,53	23,80	24,27	18,78	17,92				
28		21,69	23,48	11,87	28,42	3,57	14,36	16,90	24,53	11,63	29,79	11,90	16,99				

I = Infectado

C= Controle

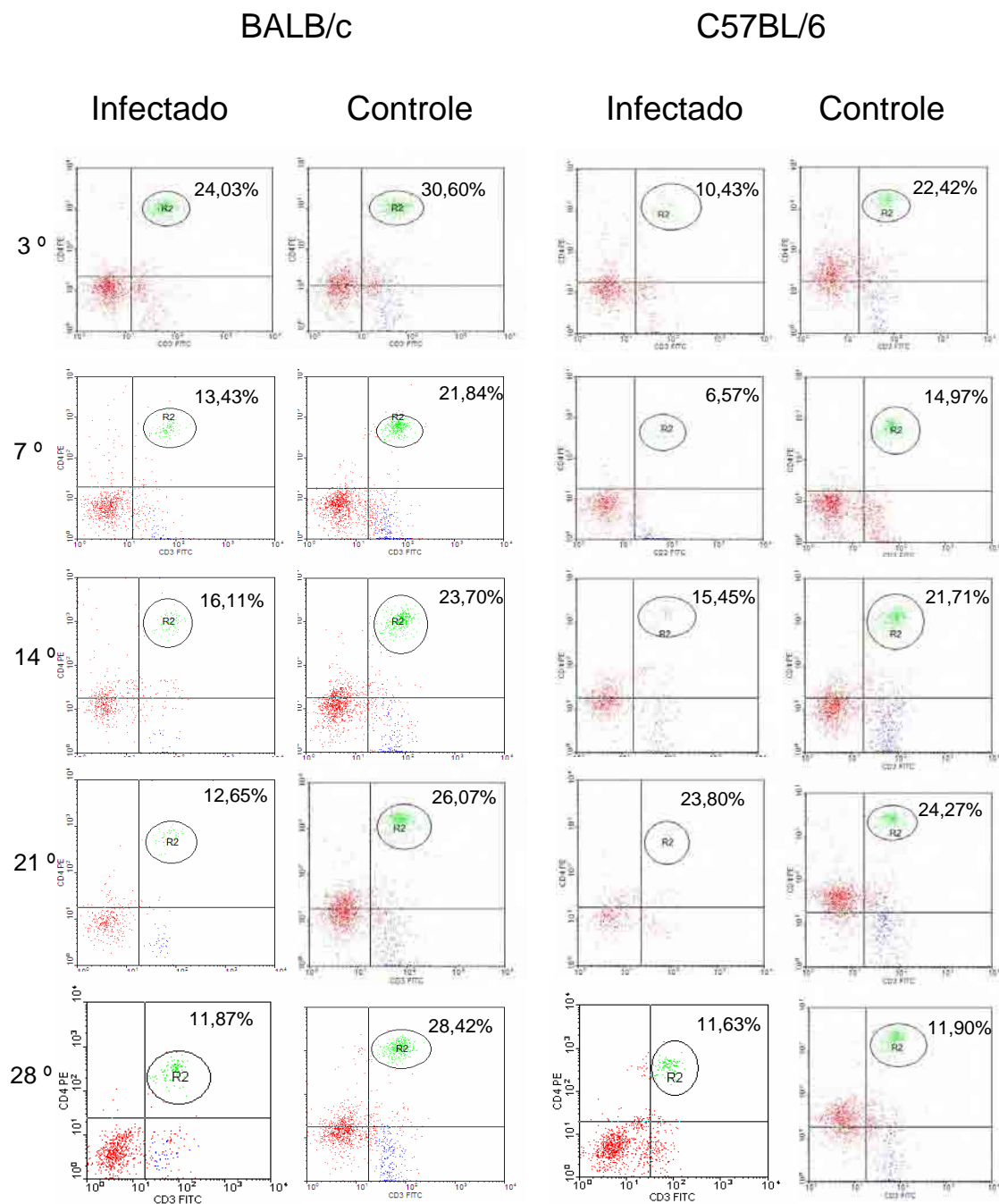


Figura 3— Proporção de linfócitos T CD4⁺ obtidos do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados por via i.v. com *Y.enterocolitica* O:8 WA-2707. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, a partir de um pool de células, num total de 10.000 eventos. Os anticorpos monoclonais específicos estavam conjugados aos fluorocromos: FITC e PE.

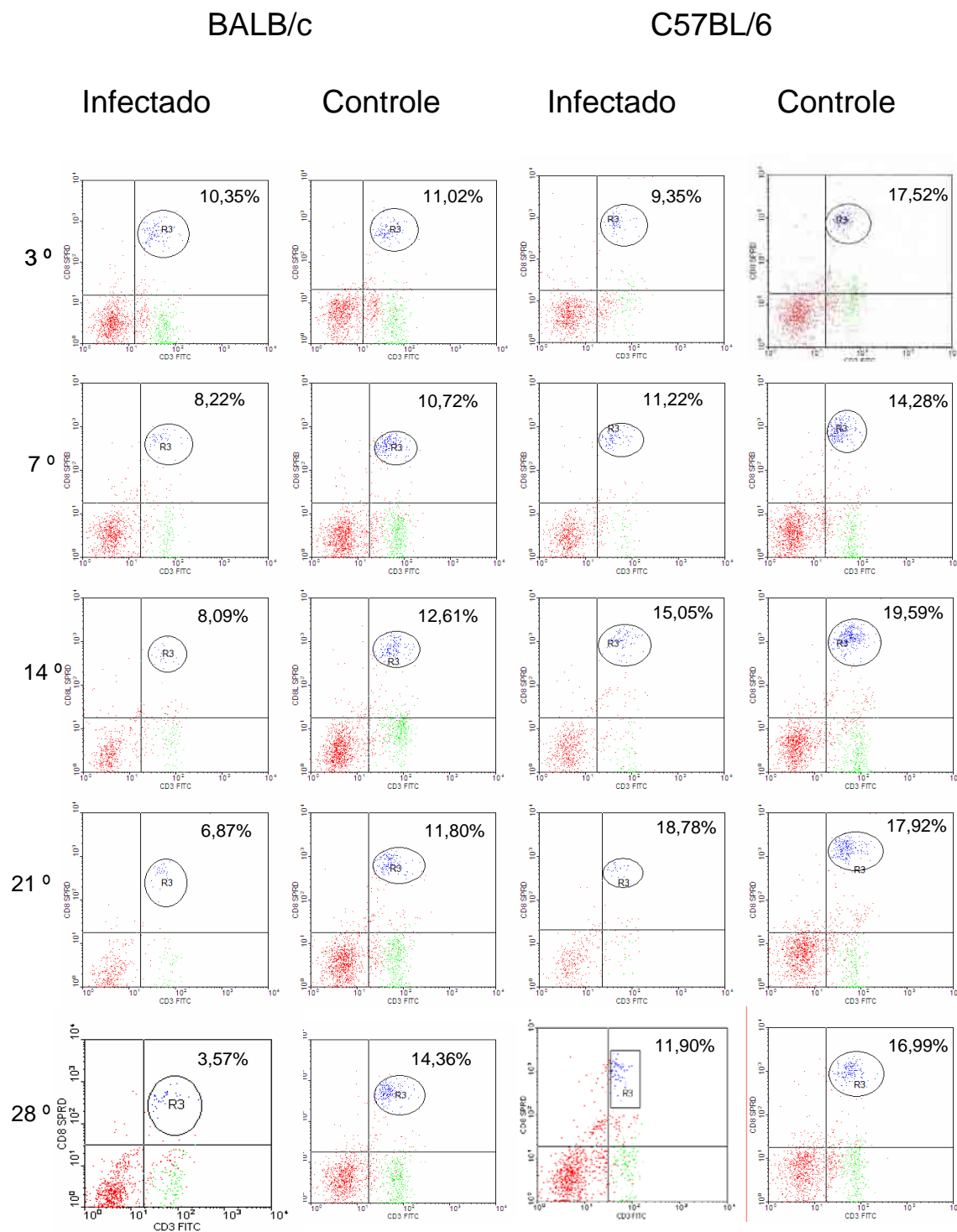


Figura 4 – Proporção de linfócitos T CD8+ obtidos do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados por via i.v. com *Y.enterocolitica* O:8-WA 2707. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, num total de 10.000 eventos, a partir de um pool de células. Os anticorpos monoclonais específicos estavam conjugados aos fluorocromos: FITC E SPRD.

4- Detecção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α , TGF- β e IFN- γ através da técnica de Citometria de fluxo

A produção de citocinas intracelulares pelos linfócitos T estimulados com IONO+PMA+BF, dos camundongos **BALB/c** e **C57BL/6**, infectados e controles, está apresentada nas **Tabelas 9 e 10**.

Quanto à produção de citocinas intracelulares regulatórias e pró-inflamatórias nos camundongos **BALB/c**, foi possível observar que, para a maioria das citocinas pesquisadas, o pico de produção ocorreu ao redor do 14^o dia pós-infecção, tanto com relação às produzidas pela população T CD4+, quanto pela população T CD8+.

Para IL-4, observou-se um aumento em relação aos animais controles a partir do 7^o dia p.i., permanecendo elevada nos dias subseqüentes, com exceção do 21^o dia. Observou-se um pico de produção no 14^o dia pós-infecção na população T CD4+, sendo o aumento em relação aos controles de 6,7 vezes, com percentual de 12,44%. O pico de produção de IL-4 para linfócitos T CD8+ também foi no 14^o dia, com elevação de 2,3 vezes em relação aos controles e percentual de 13,21%.

A citocina IL-10 apresentou-se elevada em relação aos controles entre o 7^o e 28^o dia p.i., observando-se um pico de produção no 14^o dia, com aumento de 4,6 vezes em relação aos controles, na população de linfócitos T CD4+ e 1,8 vezes na população de linfócitos esplênicos T CD8+ e percentuais de 22,92% e 18,1%, respectivamente.

Para a citocina TNF- α , observou-se uma elevação em relação aos controles a partir do 3^o dia, com declínio entre o 7^o e 14^o dia p.i.. Analisando as células estimuladas, observou-se que o maior aumento ocorreu no 21^o dia p.i., para a população T CD4+, com elevação de 4,6 vezes em relação aos controles (percentual de 23,85%), e no 7^o dia p.i., para a população de linfócitos T CD8+, com valores de 1,7 vezes maiores que nos animais controles e percentual de 21,54%.

Para a citocina IFN- γ , observou-se um aumento, tanto na população de linfócitos T CD4+ e T CD8+ no 7º dia p.i., em relação aos animais controles, de 6,8 vezes e 1,9 vezes, respectivamente. Os percentuais encontrados na *gate* foram de 20,06% e 21,07%. Em praticamente todos os dias da cinética, com exceção do 7º e 28º dias de infecção, observou-se uma diminuição na produção desta citocina pelos animais infectados em relação aos animais controles.

A citocina regulatória TGF- β , foi detectada no 7º, 14º e 28º dias p.i., sendo que o pico de produção ocorreu no 28º dia, nas duas populações de linfócitos esplênicos, onde se observou uma elevação de 18,5 vezes na população T CD4+ e, 29,8 vezes na população T CD8+, com percentuais de 18,47% e 29,8%.

Analisando a produção de citocinas intracelulares, pelos linfócitos estimulados com IONO+PMA+BF, nos camundongos **C57BL/6**, observou-se que, os níveis da citocina intracelular IL-4 estavam aumentados em relação aos controles no 7º e 28º dias p.i., sendo que o pico de produção na população T CD4+ ocorreu no 7º dia, com elevação de 1,2 vezes em relação aos controles, com percentuais de 5,25%. Na população TCD8+ o pico de produção ocorreu no 14º dia p.i., com aumento de 17,3 vezes em relação aos controles, com percentuais de 6,74%.

Para a citocina intracelular IL-10, observou-se um aumento em relação aos controles, nas populações de linfócitos T CD4+ e TCD8+, no 14º dia p.i., com elevação de 1,7 vezes e 4,6 vezes, respectivamente, com percentuais de células de 10,32% e 9,11%.

Para a citocina intracelular TNF- α , observou-se um aumento no 21º dia p.i. para a população T CD4+ e no 7º dia para a população T CD8+. A elevação em relação aos controles foi de 127 vezes para TCD4+ e 2,6 vezes para TCD8+, com percentuais de 24,22% e de 15,33%, respectivamente.

A citocina intracelular IFN- γ , apresentou-se elevada em relação aos controles no 14^o dia p.i. em ambas as populações de linfócitos T, com aumento de 2 vezes em relação aos controles na população T CD4+ e 1,7 na população T CD8+, com percentuais de 9,75% e 9,67%, respectivamente.

Para os animais C57BL/6 não houve produção de TGF- β na população de células estimuladas com PMA+IONO+BF.

Comparando-se o perfil de produção de citocinas regulatórias e pró-inflamatórias entre as duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, pode-se observar que nos camundongos BALB/c, para IL-4, ocorreu uma elevação na porcentagem de células produtoras já a partir do 7^o dia p.i., seguindo-se elevada no 14^o e 28^o dias p.i., enquanto que nos animais C57BL/6 o aumento significativo na porcentagem de células produtoras desta citocina ocorreu no 7^o e 28^o dias p.i. IL-10 apresentou-se mais elevada na linhagem BALB/c, no 14^o dia p.i., na população de linfócitos T CD4+ e T CD8+. A citocina pró-inflamatória TNF- α apresentou-se mais elevada na linhagem BALB/c quando comparada à linhagem C57BL/6 no 14^o dia p.i., sendo que nos demais dias da cinética de infecção observou-se uma maior produção desta citocina nos animais C57BL/6. IFN- γ apresentou-se mais elevado na linhagem C57BL/6 em relação à linhagem BALB/c, no 14^o dia na população T CD4+. No entanto, essa citocina apresentou-se mais elevada na linhagem BALB/c em relação à C57BL/6, entre o 3^o e 21^o dia, na população TCD8+. Essa citocina permaneceu elevada até o 28^o dia nos animais C57BL/6. A citocina regulatória TGF- β foi detectada apenas nos camundongos BALB/c, mostrando-se elevada já a partir do 7^o dia p.i., com pico no 28^o dia, em ambas as populações de linfócitos T.

Um resumo dos maiores aumentos observados na produção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- α e TGF- β , nos animais infectados em relação

aos animais controles, ao longo da cinética de infecção, está apresentado nas **Figuras 5, 6, 7 e 8.**

Tabela 9 – Detecção das citocinas intracelulares, nas populações CD3+CD8- (CD4+) e CD3+CD8+ (CD8+), dos animais BALB/c controles e infectados, por via i.v. com a amostra de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707 e controles, obtidas após análise por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem de células esplênicas fenotipadas, num total de 10.000 eventos, a partir de um pool de células. Os valores em negrito representam os maiores aumentos observados ao longo da cinética de infecção.

Dpi	3º			7º			14º			21º			28º		
	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	
Parâmetro (%)															
CD4/IL-4	1,97	1,47	5,48	1,09	12,44	1,86	0,24	0	7,43	0,68					
CD8/IL-4	2,40	3,71	10,72	7,45	13,21	5,73	9,49	0	5,93	1,61					
CD4/IL-10	3,50	1,86	6,32	0,55	22,92	4,95	0,93	1,08	10,03	0					
CD8/IL-10	7,44	7,24	17,35	9,61	18,10	10,19	7,20	0,45	7,03	2,03					
CD4/TNF	12,63	5,36	4,58	0,36	8,63	8,16	23,85	5,13	20,59	2,94					
CD8/TNF	16,52	19,73	21,54	12,38	16,78	8,82	9,06	6,39	12,08	10,70					
CD4/IFN	4,81	2,48	20,06	2,95	2,40	2,56	1,89	2,04	17,45	5,01					
CD8/IFN	5,64	7,74	21,07	10,72	15,67	6,65	13,08	2,25	9,37	6,36					
CD4/TGF	0	0	6,89	2,45	5,39	0	0	0	18,47	0					
CD8/TGF	0	0	7,55	3,74	5,53	0	0	0	29,80	0					

Dpi= Dias após a infecção

Tabela 10 - Detecção das citocinas intracelulares, nas populações CD3+CD8- (CD4+) e CD3+CD8+ (CD8+), dos animais C57BL/6 infectados com a amostra de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707 e controles, obtidas após análise por citometria de fluxo. Os valores representam a percentagem de células esplênicas fenotipadas, num total de 10.000 eventos, a partir de um pool de células. Os valores em negrito representam os maiores aumentos observados ao longo da cinética de infecção.

Dpi	3º			7º			14º			21º			28º			
	I	C		I	C		I	C		I	C		I	C		
Parâmetro (%)																
CD4/IL-4	0	5,25		5,25	4,37		6,37	7,19		0	0,89		3,15	2,37		
CD8/IL-4	0	4,5		3,54	0,44		6,74	0,39		1,49	0,72		2,80	0		
CD4/IL-10	1,08	3,23		4,04	11,89		10,32	6,09		3,57	0		1,28	0		
CD8/IL-10	0	3,57		8,53	3,99		9,11	1,99		3,53	3,55		3,06	0		
CD4/TNF	6,77	8,77		10,78	6,12		18,01	5,4		24,22	0,19		7,54	2,43		
CD8/TNF	11,42	17,51		15,33	6,00		10,63	0,54		8,43	4,15		6,50	2,53		
CD4/IFN	1,69	9,88		8,53	6,77		9,75	4,71		9,6	2,93		7,35	1,77		
CD8/IFN	1,49	12,25		7,76	13,78		9,67	5,84		4,05	3,33		7,02	2,16		
CD4/TGF	0	0		0	0		0	0		0	0		0	0		
CD8/TGF	0	0		0	0		0	0		0	0		0	0		

Dpi= Dias após a infecção

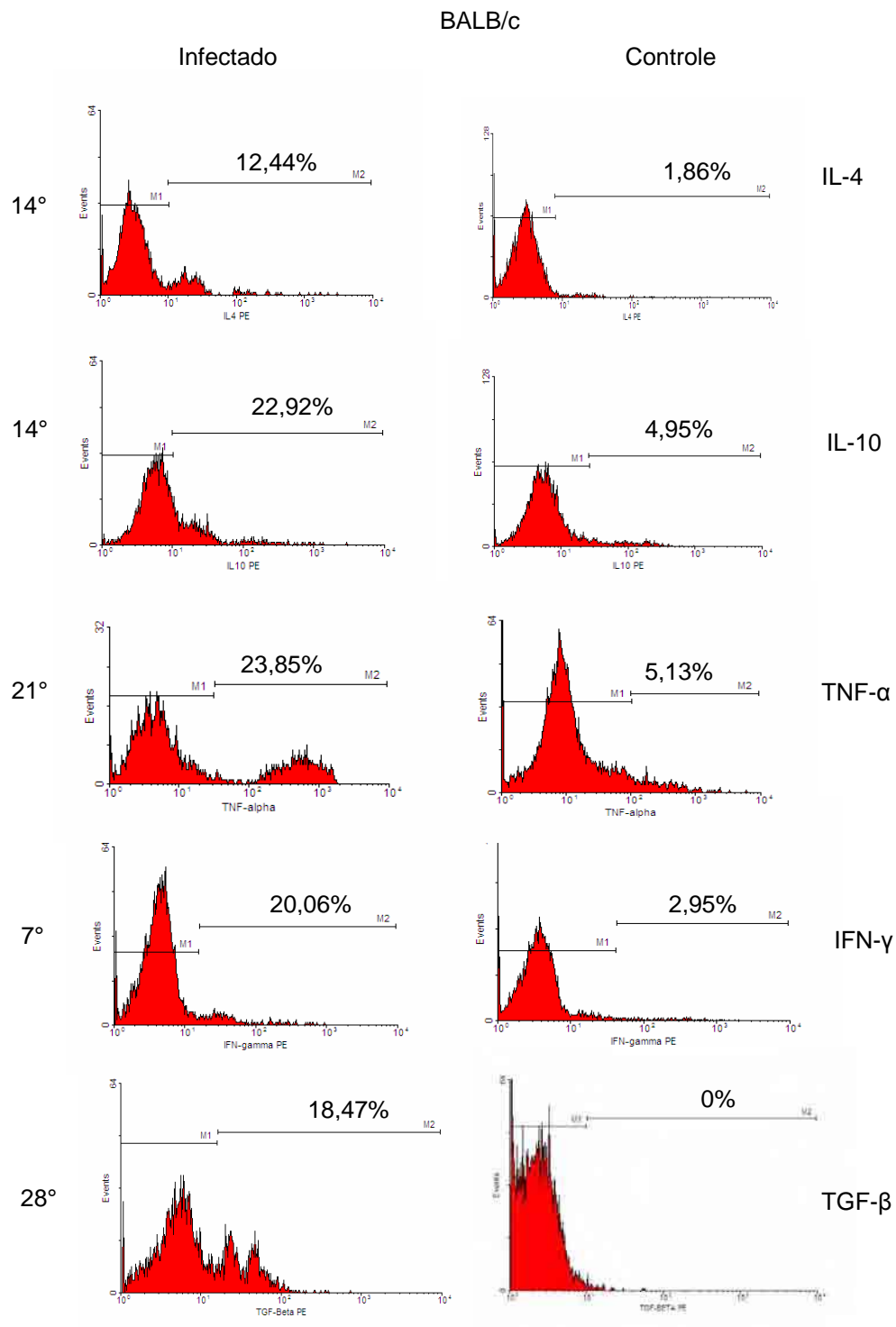


Figura 5 – Proporção de citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- α e TGF- β , detectadas na população de linfócitos esplênicos T CD4⁺ dos animais BALB/c controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8. Os gráficos representam os maiores aumentos observados nos animais infectados, em relação aos animais controles, nos diferentes dias da cinética de infecção.

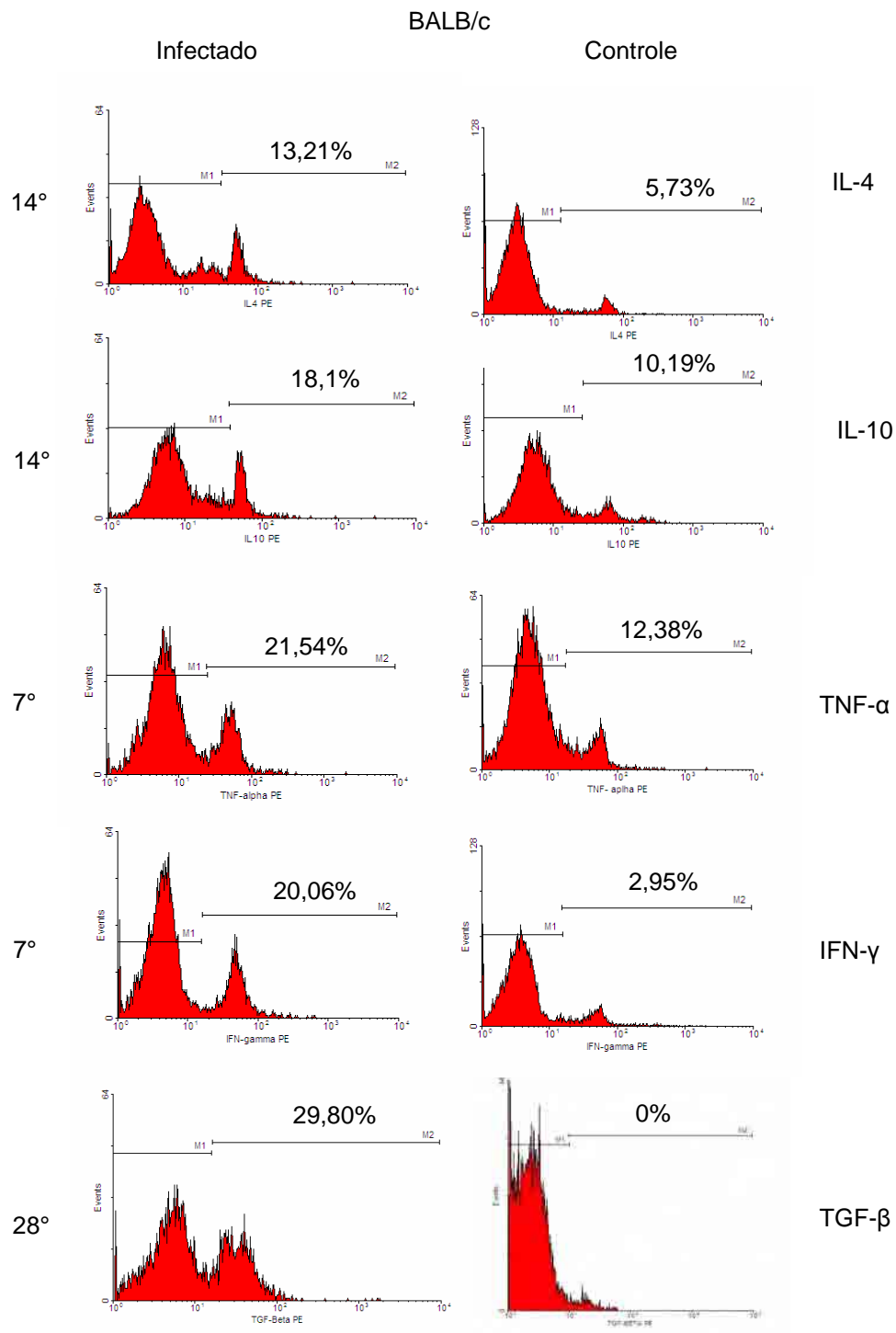


Figura 6 – Proporção de citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- α e TGF- β , detectadas na população de linfócitos esplênicos T CD8⁺ dos animais BALB/c controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8. Os gráficos representam os maiores aumentos observados nos animais infectados, em relação aos animais controles, nos diferentes dias da cinética de infecção.

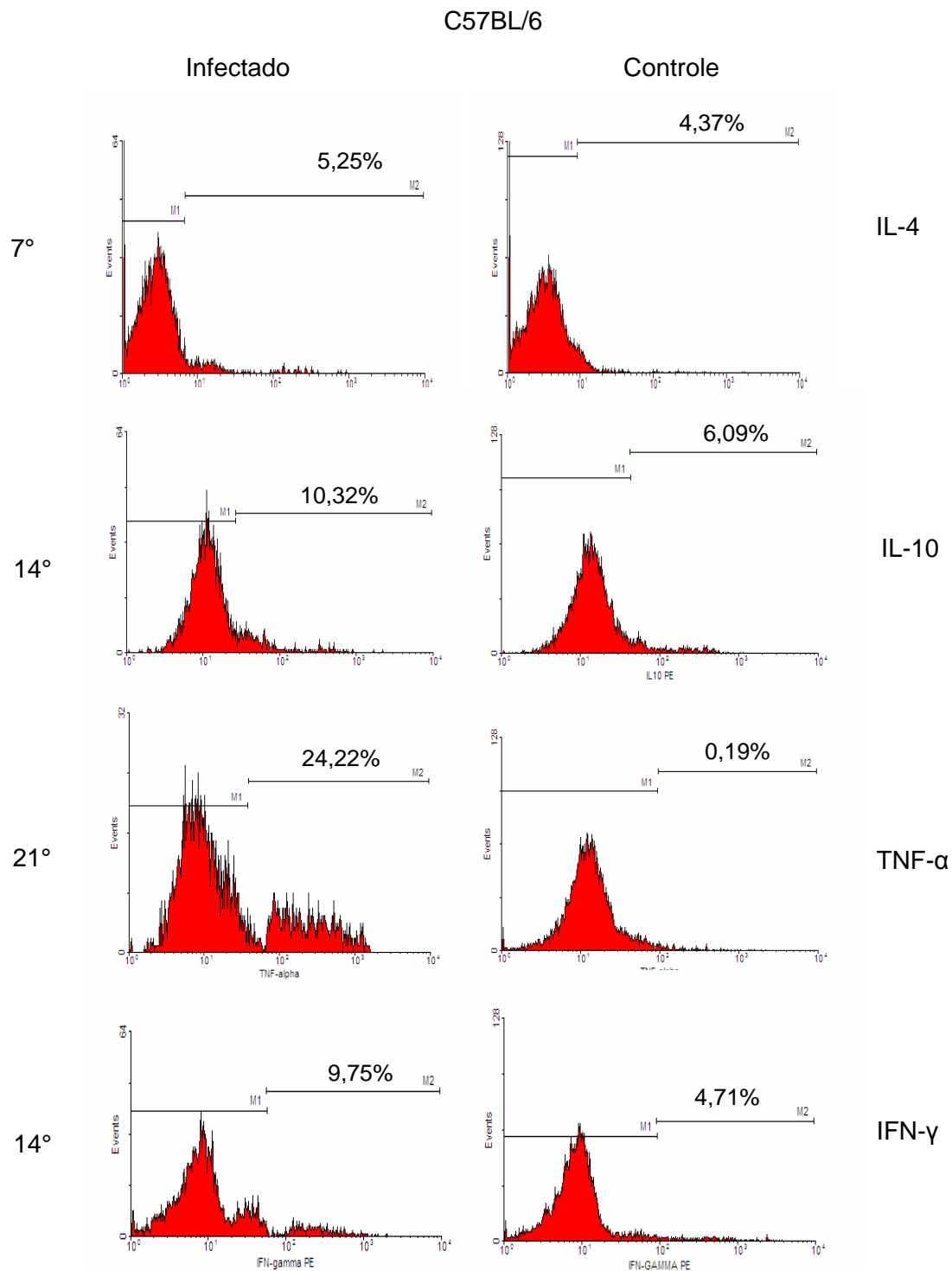


Figura 7 – Proporção de citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- α , detectadas na população de linfócitos esplênicos T CD4+ dos animais C57BL/6 controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8. Os gráficos representam os maiores aumentos observados nos animais infectados, em relação aos animais controles, nos diferentes dias da cinética de infecção.

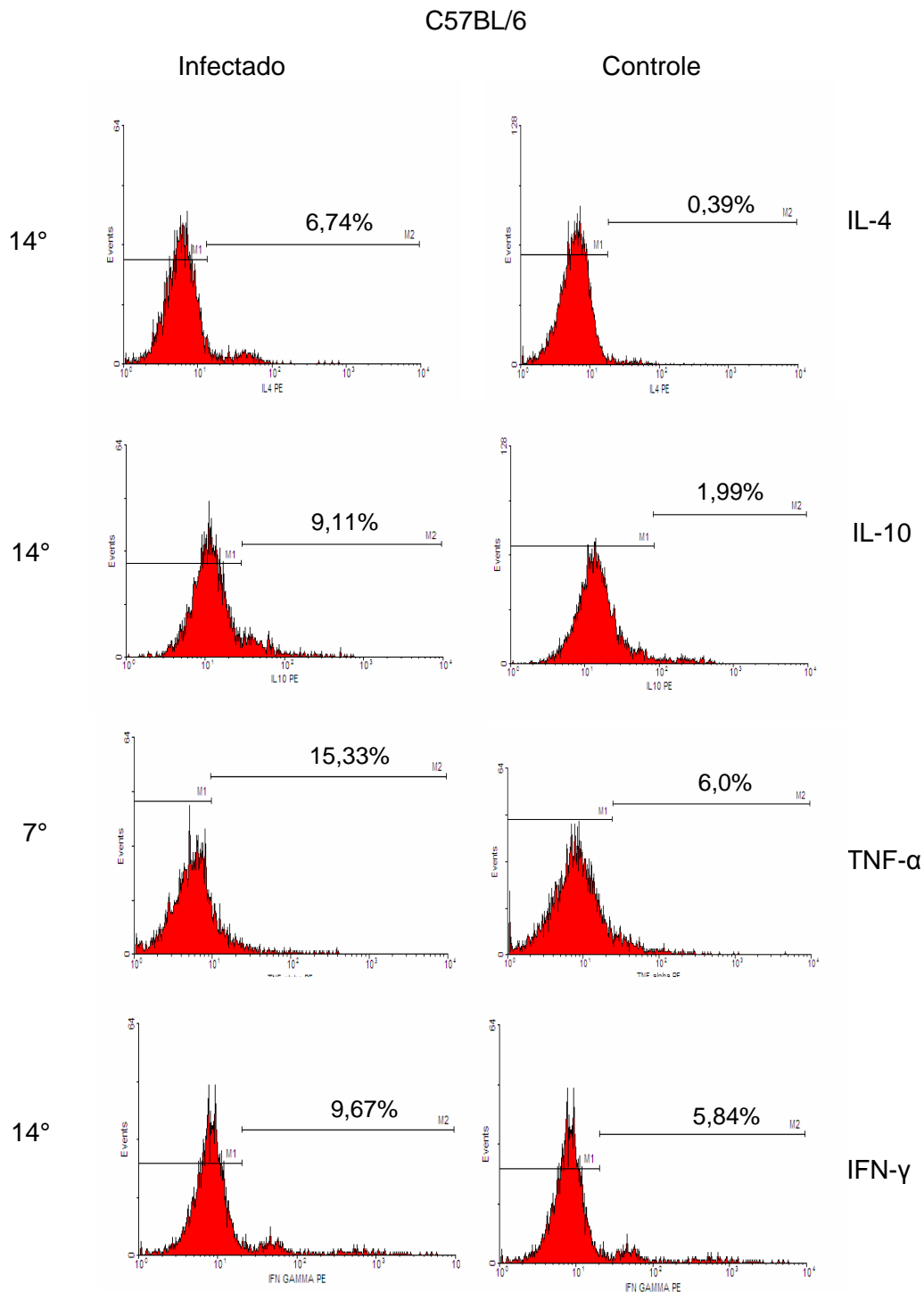


Figura 8 – Proporção de citocinas intracelulares IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- α , detectadas na população de linfócitos esplênicos T CD8+ dos animais C57BL/6 controles e infectados com *Y. enterocolitica* O:8. Os gráficos representam os maiores aumentos observados nos animais infectados, em relação aos animais controles, nos diferentes dias da cinética de infecção.

5- Ocorrência de alterações patológicas

Foram observadas lesões granulomatosas no baço, fígado e pulmões, nas duas linhagens estudadas, a partir do 14º dia após a infecção. As lesões se apresentaram como infiltrados de células polimorfonucleares, mostrando um aspecto purulento, principalmente no baço. O baço e o fígado destes animais se apresentaram aumentados em tamanho, chegando à dimensão de 5 a 6 vezes o tamanho do órgão quando comparados aos animais controles.

Os camundongos BALB/c e C57BL/6 começaram a morrer ao redor do 14º dia. Os camundongos BALB/c apresentaram-se mais comprometidos pela infecção, deixando de se alimentar e progredindo rapidamente para óbito. Os animais C57BL/6, apesar de bastante comprometidos, mantiveram uma alimentação mais regular e aqueles animais que não foram a óbito mostraram-se recuperados nos demais dias da infecção.

V- Discussão

Uma vez conhecendo a versatilidade da *Yersinia* em burlar o sistema imune do hospedeiro e a importância das citocinas pró-inflamatórias na proteção às yersinioses (BOHN & AUTENRIETH, 1996), decidiu-se realizar este trabalho cujo principal objetivo foi verificar a ocorrência de ativação policlonal de linfócitos B, comparar o padrão isotípico de imunoglobulinas produzidas durante a infecção com *Y. enterocolitica* O:8 em linhagens de camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6), bem como analisar o padrão de secreção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias pelas populações T CD4+ e CD8+.

A suscetibilidade de camundongos BALB/c à *Yersinia* pode ser causada, parcialmente, por um recrutamento tardio de células efetoras essenciais como os macrófagos. Essas células ativadas por linfócitos T, constituem um importante componente da resposta imune do hospedeiro na infecção primária por *Yersinia* (AUTENRIETH & HEESEMANN, 1992).

A escolha da dose de inoculação a ser utilizada neste trabalho foi feita baseando-se nos trabalhos de Autenrieth et al (1994), no qual foi determinado que a DL50 da infecção por via I.V. com *Y. enterocolitica* O:8 seria de 2×10^4 para os animais C57BL/6 (resistentes) e 5×10^2 para os camundongos BALB/c (suscetíveis).

Verifica-se que a infecção experimental de camundongos por *Y. enterocolitica* se assemelha à yersiniose em humanos, mas não provoca artrite como sequela. Carter et al, em 1973, trabalhando com *Y. enterocolitica* O:8 (WA), isolada de um caso de septicemia humana, verificaram que a mesma era bastante patogênica para camundongos, quando inoculada por via intravenosa. Carter & Collins, em 1974, utilizando essa mesma cepa por via intravenosa, reproduziram pela primeira vez em camundongos uma infecção semelhante àquela observada em humanos, onde se

desenvolve uma infecção sistêmica piogênica, envolvendo principalmente baço, fígado e pulmão.

Os trabalhos realizados utilizando camundongos como modelo experimental de infecção por *Yersinia*, relatavam, até então, que embora os animais se tornassem infectados pela bactéria, não apresentavam sinais clínicos de artrite. O único relato de que *Y. enterocolitica* O:3 é experimentalmente artritogênica para camundongos data de 1990, quando Toyos et al demonstraram que artrite poderia ser induzida em camundongos pré-tratados com desferrioxamine e inoculados por via oral, a via de infecção mais frequente em humanos. O padrão de doenças nas articulações era semelhante àquele da artrite humana associada com este patógeno (TOYOS et al, 1990, 1992).

Os resultados apresentados por Autenrieth et al (1992) indicam que *Y. enterocolitica* poderia ser mais uma candidata a demonstrar que linfócitos T específicos desenvolvem um importante papel durante a infecção e podem ser necessários para a eliminação da bactéria localizada extracelularmente.

Geralmente é aceito que patógenos extracelulares são primariamente eliminados por polimorfonucleares leucócitos e dessa forma causam uma resposta inflamatória piogênica. Ao contrário, patógenos intracelulares facultativos são eliminados por macrófagos ativados por linfócitos T específicos. Inúmeras evidências comprovam que *Yersinia enterocolitica* se comporta como um patógeno intracelular facultativo, principalmente nos estágios iniciais da infecção, sobrevivendo e replicando dentro de macrófagos murinos (AUTENRIETH et al., 1993; PUJOL & BLISKA, 2005). Isso também evidencia que *Yersinia* intracelular pode subverter as funções antimicrobinas normais dos macrófagos (PUJOL & BLISKA, 2005).

A capacidade de *Yersinia* proliferar em macrófagos, contribuindo para o retardo no estabelecimento de uma resposta imune específica, bem como o fato do macrófago servir de veículo de transporte a partir do sítio inicial da infecção até os tecidos linfáticos pode auxiliar e contribuir para o desenvolvimento da artrite reativa (PUJOL & BLISKA, 2005).

Estudos em indivíduos que desenvolveram artrite reativa após yersinioses ou salmoneloses mostraram a presença de antígenos derivados do agente causador nas articulações, mesmo anos após a infecção original, e a resposta persistente de anticorpos contra o agente causador sugere que o microrganismo ou seus componentes não são eficientemente eliminados nestes indivíduos, ou eles provavelmente persistam em algum lugar do organismo por um longo período de tempo (GRANFORS et al, 1998). Rüssmann et al (1996) observaram que *Y. enterocolitica* pode usar polimorfonucleares fagocíticos para se locomover através da monocamada endotelial; dessa forma, consegue entrar na corrente sanguínea e alcançar os tecidos sinoviais ou órgãos alvos onde induz seqüelas típicas.

Com base nos resultados da ativação policlonal de linfócitos B por nós obtidos, foi possível constatar que ambas as linhagens de camundongos BALB/c (suscetíveis) e C57BL/6 (resistentes), infectadas com a amostra de *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707, apresentaram ativação policlonal de linfócitos B. A linhagem suscetível mostrou um maior aumento no número de células secretoras de imunoglobulinas totais dos isótipos IgG1, IgG2a e IgG3, enquanto a linhagem resistente apresentou um maior aumento no isótipo IgG2a.

Os camundongos BALB/c apresentaram uma elevação significativa dos isótipos IgGa, IgG3 e IgM no 28º dia, IgG2b e IgA no 21º e 7º dia p.i. e dos isótipos IgG2a 14º dia p.i., respectivamente.

Nos camundongos C57BL/6 a produção de células secretoras de imunoglobulinas totais do isótipo IgG2a elevou-se significativamente a partir do 7º dia p.i e teve pico no 21º dia. IgG1 e IgG2b apresentaram picos de secreção no 14º dia, o isótipo IgG3 apresentou-se elevado no 21º dia, já o isótipo IgA apresentou-se aumentado no 21º dia p.i.

Quanto à produção de células secretoras de Igs específicas, observou-se um ligeiro aumento em todos os isótipos testados, mas IgM foi o isótipo com maior aumento tanto nos animais BALB/c, quanto nos animais C57BL/6, com a diferença de que para os últimos o aumento ocorreu no início da cinética de infecção (7º dia p.i.).

Em trabalho anterior, realizado em nosso laboratório, Ramos et al. (2005), trabalhando com a mesma cepa bacteriana, porém utilizando camundongos SWISS, “SPF”, como modelos experimentais, observaram que a maior ativação de células secretoras de Igs totais foi do isótipo IgM, com pico entre o 28º e 42º dias p.i.

Analisando os anticorpos específicos anti-*Yersinia*, foi possível observar uma maior produção de anticorpos IgG e IgM, no soro dos animais infectados BALB/c, quando comparados aos animais infectados C57BL/6, já a partir do 7º dia p.i. Neste período podemos observar que para o isótipo IgG, no 7º, 14º, 21º e 28º dias pós-infecção, os aumentos em relação aos animais C57BL/6, foram de 8,7 vezes, 3,7 vezes, 1,9 vezes e 1,1 vezes, respectivamente. Para o isótipo IgM diferenças significativas foram observadas no 7º e 14º dias pós-infecção, com elevações de 2,9 e 3,8 vezes em relação aos animais C57BL/6. Com base nestes dados, observamos que para o isótipo IgG, os animais BALB/c formularam uma resposta efetiva de anticorpos específicos anti-*Yersinia* logo no início da infecção, mantendo-a constante até o final da cinética de infecção. Já os animais C57BL/6 montaram uma resposta mais tardia, no 28º dia. Isso pode sugerir uma menor produção de

anticorpos específicos anti-*Yersinia* ou uma maior utilização dos anticorpos produzidos e secretados pelos linfócitos B. Para IgM, observa-se que as duas linhagens apresentaram um perfil semelhante de secreção de anticorpos pelas células B, sendo que a produção pelos camundongos BALB/c foi sempre superior à dos C57BL/6.

Através da análise da resposta imune humoral, avaliada através das técnicas de ELISPOT e ELISA, foi possível verificar que nossos dados estão de acordo com aqueles obtidos por Autenrieth et al. (1994). Esses autores analisaram a resposta imune de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados por via i.v com *Y. enterocolitica* O:8, e observaram que a produção de anticorpos *Yersinia* específicos, incluindo IgG1 e IgG2a, foram comparáveis em ambas as linhagens de camundongos. Somente no 21º dia foi observado um pico de produção de anticorpos específicos do isótipo IgG2b no soro dos camundongos C57BL/6. No nosso trabalho o isótipo IgG2b apresentou-se elevado já a partir do 14º dia p.i. nos camundongos C57BL/6. O pico de produção de IgG2a ocorreu logo no início da cinética de infecção nos animais BALB/c (14º dia), enquanto que na linhagem C57BL/6, o pico de produção ocorreu no 28º dia .

Embora os níveis de citocinas no soro sejam um bom indicador da resposta sistêmica, eles podem não representar acuradamente o nível de citocinas no microambiente, como por exemplo, no tecido esplênico (DUBE et al. 2004). Em vista disso, optamos por determinar o perfil de citocinas Th1 e Th2 a partir de um homogenado obtido do baço de 3 animais, do qual, posteriormente, isolamos os linfócitos esplênicos.

Na tentativa de melhorar a detecção das citocinas intracelulares, durante a cultura dos esplenócitos utilizamos a brefeldina A, após 4 h de cultura, devido ao seu efeito inibitório na secreção de proteínas, o que permite um acúmulo das citocinas

no complexo de Golgi , produzindo um aumento do sinal que poderá ser detectado pelo citômetro de fluxo (MORITA et al., 1998)

Os camundongos BALB/c infectados com *Y. enterocolitica* O:8 WA-2707, apresentaram uma resposta de citocinas de perfil Th2, com predomínio de citocinas como IL-4 e IL-10 no 14º dia pós-infecção. No entanto, parece ter ocorrido uma inversão no perfil de citocinas no 21º dia pós-infecção com a elevação da citocina Th1 TNF- α . Nestes animais observou-se ainda a regulação das citocinas pró-inflamatórias pelo TGF- β , o qual apresentou-se elevado no início da infecção entre o 7º e 14º dias, com pico no 28º dia. A presença de altos níveis das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β , provavelmente, justifica a maior suscetibilidade dos animais BALB/c à infecção por *Yersinia*.

Os animais C57BL/6 apresentaram um predomínio de citocinas do tipo Th1, como TNF- α e IFN- γ , no 7º, 14º e 21º dias após a infecção, em ambas as populações de linfócitos T CD4+ e CD8+. Ocorreu uma elevação no perfil de citocinas Th2 entre o 7º e 14º dias pós-infecção, o que poderia justificar os isótipos observados durante a ativação policlonal nestes animais. IL-10 apresentou-se elevada nos camundongos C57BL/6 no 14º dia p.i. Após o 14º dia, observou-se uma queda na produção desta citocina o que pode estar relacionado a uma maior estimulação na produção da citocina antagonista IFN- γ induzida por *Yersinia*. Um fato importante foi a ausência de produção da citocina TGF- β , mostrando que a resposta imune da linhagem C57BL/6 não é influenciada por esta citocina regulatória.

Os resultados obtidos através da técnica de citometria sugerem que os animais BALB/c revelaram uma tendência à manutenção de um padrão Th2, embora durante a cinética de infecção citocinas Th1 também estiveram elevadas. Esse padrão seria responsável pela indução de uma resposta imune humoral. Se

pensarmos que a bactéria *Y. enterocolitica* pode se comportar como um patógeno intracelular facultativo (AUTENRIETH et al., 1993), essa resposta humoral seria ineficiente para a erradicação e controle da infecção, tornando os animais mais suscetíveis.

Os animais C57BL/6, por outro lado, exibiram um padrão de secreção de citocinas voltadas para um perfil Th1 durante a cinética de infecção, no entanto, da mesma forma que nos animais BALB/c, houve picos de secreção de citocinas Th2, mas de menor intensidade. Essa tendência levaria à elaboração de uma resposta celular mais efetiva contra o patógeno e conseqüentemente à eliminação da bactéria, tornando os animais resistentes à infecção.

Yin et al. (1997) teorizaram que o desenvolvimento da artrite reativa pode resultar do fracasso em montar uma resposta Th1 efetiva contra o patógeno no início da infecção. Esses autores encontraram no líquido sinovial e na membrana sinovial de pacientes com artrite reativa, um padrão Th2 de citocinas.

Estudos anteriores mostraram que camundongos C57BL/6 são resistentes contra *Y. enterocolitica* enquanto camundongos BALB/c são suscetíveis (HANCOCK et al., 1986). Camundongos BALB/c são maus produtores de IFN- γ , enquanto camundongos C57BL/6 são bons produtores dessa citocina (BOHN & AUTENRIETH, 1996). 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*. Pelo contrário, nos camundongos C57BL/6, resistentes à infecção, a administração de IFN- γ e anticorpos anti-IL-4 não afeta significativamente a yersiniose (BOHN & AUTENRIETH, 1996). As duas linhagens de camundongos, resistentes e suscetíveis, apresentam diferentes respostas à administração de IL-12. O

tratamento dos camundongos resistentes com IL-12 aumentou o número de bactérias no baço e causou efeitos tóxicos no fígado (AUTENRIETH et al., 1994, BOHN & AUTENRIETH, 1996). 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*, comparados com os camundongos BALB/c. 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).

A toxicidade de IL-12 é possivelmente mediada por TNF- α e IFN- γ (ORANGE et al., 1994; GATELY, 1994; OZMEN et al. 1994). Por outro lado, os efeitos tóxicos da IL-12 também poderiam ser explicados pela presença de maiores concentrações de IL-10 nos camundongos BALB/c do que nos C57BL/6. IL-10 é induzida por IL-12 e aquela, por sua vez, inibe a produção assim como os efeitos mediados pela IL-12 (MORRIS et al., 1994). IL-10 parece agir antagonisticamente à IL-12 durante yersiniose em camundongos BALB/c. Assim, a adição de IL-10 às culturas de esplenócitos diminui, enquanto anticorpos anti-IL-10 aumentam, a produção de IFN- γ induzida por *Yersinia*. Esta relação não foi encontrada em camundongos C57BL/6 e possivelmente reflita a baixa resposta de IFN- γ , mais do que uma produção excessiva de citocinas antagonistas tais como IL-10 em camundongos BALB/c (BOHN & AUTENRIETH, 1996). Os autores demonstraram que, ao menos ao nível de expressão de mRNA, camundongos C57BL/6 produzem mais IL-10 do que os BALB/c (BOHN et al., 1994). Além disso, possivelmente outras citocinas antagonistas, como por exemplo, TGF- β ou IL-4, possam ser responsabilizadas pelos diferentes efeitos da IL-12 em camundongos BALB/c e C57BL/6 (BRUNDA, 1994; SCHMITT et al., 1994; HUNTER et al., 1995).

Yin et al. (1997) verificaram que células mononucleares do fluido sinovial de pacientes com artrite reativa provocada por *Y. enterocolitica*, *Clamidia trachomatis* ou *Salmonella enteritidis*, frente à estimulação com a bactéria específica, secretavam baixas quantidades de IFN- γ e TNF- α , mas altas quantidades de IL-10. Essa citocina era responsável pela supressão de IFN- γ e TNF- α . A adição de anticorpos neutralizantes anti-IL-12 às culturas de monócitos, abolia completamente os efeitos da IL-10, sugerindo que a inibição das citocinas Th1 pela IL-10 seria mediada através de supressão da síntese de IL-12. IL-12 exógena aumentava claramente a secreção de TNF- α e IFN- γ .

Outros trabalhos evidenciaram variações na suscetibilidade de camundongos à infecção por *Yersinia*, e esta suscetibilidade parece ser dependente da produção de IFN- γ (AUTENRIETH et al, 1994; HANCOCK et al, 1986).

Autenrieth et al. (1994) verificaram que em camundongos BALB/c, suscetíveis à infecção por *Y. enterocolitica*, níveis detectáveis de IFN- γ só podiam ser encontrados após o 21º dia de infecção. Esses autores propuseram que a suscetibilidade destes camundongos à *Yersinia* poderia ser devida a uma fraca e demorada resposta de células T *Yersinia*-específicas, quando comparada com aquela observada em camundongos resistentes.

Foi bem demonstrado que o TNF- α e o IFN- γ são importantes mediadores da resposta inflamatória do hospedeiro à infecção com microrganismos intracelulares facultativos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Y. enterocolitica*. Ambas citocinas são produzidas endogenamente na fase primária da infecção com esses patógenos (AUTENRIETH & HEESEMANN, 1992). Essas citocinas são cruciais em limitar a severidade da infecção por *Yersinia*, sendo que a inibição dessas, conseqüentemente, aumenta a habilidade da *Yersinia* em se

multiplicar no hospedeiro (AUTENRIETH & HEESEMANN, 1992; NAKAJIMA & BRUBAKE, 1993).

Particularmente em infecções com bactéria intracelular facultativa, um tratamento com anticorpo anti-TNF- α não apenas prejudicou a formação de granulomas, uma marca registrada da imunidade mediada por células, mas também permitiu uma proliferação massiva do organismo infectante (KINDLER et al., 1989; MIELKE et al., 1992). Isto sugere que a habilidade de inibir TNF- α é vantajosa para o patógeno.

Foi demonstrado que um sinergismo entre TNF- α e IL-2 é essencial para desencadear toxicidade induzida por IL-12. Do mesmo modo, a administração de IL-12 produziu níveis elevados de TNF- α em células esplênicas estimuladas com antígeno de *Yersinia* ("heat killed *Yersinia*", HKY) de camundongos C57BL/6 infectados com a bactéria (GATELY et al., 1994; ORANGE et al., 1994; OZMEN et al., 1994; ORANGE et al., 1995).

Dessa forma, uma vez que, TNF- α e IFN- γ agem conjuntamente como importantes mediadores da resposta inflamatória, torna-se claro que a "simples" interferência no processo de fagocitose da bactéria altera toda a resposta dependente dessas citocinas.

Em vários modelos de infecção, foi demonstrado que TGF- β neutraliza a resistência mediada por IL-12. TGF- β é uma molécula imunorreguladora a qual inibe ativação de macrófagos (NELSON et al., 1991; POWRIE, 1995) e a geração e atividades citolíticas de células T citotóxicas, células NK e células K ativadas por citocinas (KEHRL et al., 1986; ROOK et al., 1986; RANGES et al., 1987). 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). TGF- β exerce um papel importante na progressão de infecções por

Mycobacteria avium (DENIS & GHADIRIAN, 1991), *Leishmania amazonensis* (BARRAL et al, 1993), *L. braziliensis* (BARRAL NETTO et al, 1992; BARRAL et al, 1993), *Trypanosoma cruzi* (SILVA et al., 1991) e *Toxoplasma gondii* (HUNTER et al., 1995). Por outro lado, TGF- β exerce um papel benéfico na resistência adquirida contra infecções por *Candida albicans* (SPACCAPELO et al., 1995) e *L. monocytogenes* (NAKANE et al., 1996).

Em infecções por *Leishmania*, a depleção de célula T CD4⁺ aumentou a expressão tissular de iNOS em camundongos BALB/c suscetíveis para um nível comparável ao dos camundongos resistentes C57BL/6 (STENGER et al., 1994). Além disso, foi sugerido que uma relativa falta de iNOS em camundongos suscetíveis poderia ser devida a uma maior expressão de TGF- β nos tecidos dos camundongos suscetíveis em relação aos resistentes (STENGER et al., 1994).

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).

As citocinas inibitórias IL-10 e TGF- β são importantes na homeostase da resposta imune. Trabalhos realizados por Kühn et al. (1993) e Shull et al. (1992), mostraram que camundongos deficientes em IL-10 desenvolveram enterocolite, que foi mediada por células Th1, e camundongos deficientes em TGF- β desenvolveram uma doença inflamatória multifocal com manifestações autoimunes, incluindo a produção de autoanticorpos.

Estudos “in vitro” demonstraram que TGF- β 1 pode inibir a proliferação de células B, secreção de anticorpos e expressão de moléculas de superfície, incluindo receptores de antígeno. Isso também estimula a expressão de MHC

classe II e induz a diferenciação dos linfócitos em células secretoras de IgA (LETTERIO & ROBERTS, 1998).

Segundo Bohn et al (1998), o TGF- β teve um efeito oposto à IL-12 através de uma regulação negativa moderada da produção de TNF- α , sugerindo que em camundongos resistentes, os quais induzem uma forte resposta Th1, deve haver um déficit nos mecanismos imunorreguladores negativos. Portanto, especula-se que tanto a toxicidade induzida por IL-12, mediada por TNF- α , quanto a proteção induzida por IL-12, mediada por IFN- γ , possam ser balanceadas por TGF- β , o que parece ser crítico para se obter uma ótima resposta imune contra *Yersinia*.

De modo geral, nos animais BALB/c e C57BL/6, infectados e controles, observamos uma prevalência da população de linfócitos secretores T CD4+. Esse é um outro fator que pode contribuir para explicar a maior suscetibilidade dos camundongos BALB/c à infecção, uma vez que essa população promove a eliminação de *Y. enterocolitica* em camundongos C57BL/6 e exacerba a infecção em camundongos BALB/c (BOHN & AUTENRIETH, 1996).

Resultado semelhante, quanto à prevalência de células CD4+, foi observado por Autenrieth e colaboradores (1992). Neste trabalho 95% das células viáveis de camundongos C57BL/6 eram L3T4+ (CD4+) e apenas 5% eram Lyt2+ (CD8+).

Durante a cinética de infecção observamos o aparecimento de granulomas e abscessos purulentos no baço, fígado e pulmões, bem como a morte dos animais ao redor do 14° e 21° dia após a infecção, tanto nos animais BALB/c quanto nos C57BL/6. Macroscopicamente, em particular o baço, mostrou vários granulomas e abscessos e seu tamanho aumentou cerca de 5 a 6 vezes em relação aos animais controles, tanto na linhagem BALB/c quanto na C57BL/6.

Esses resultados estão em conformidade com os trabalhos existentes na literatura (AUTENRIETH et al., 1993; HANDLEY et al., 2004). Nestes trabalhos os

autores verificaram que, após a inoculação intravenosa dos animais com *Y. enterocolitica* observou-se um aumento do número de bactérias no baço, fígado e pulmões na fase inicial da infecção (1 a 7 dias), estando estes órgãos bastante comprometidos pela infecção. Na fase tardia, os camundongos BALB/c apresentaram um maior envolvimento dos pulmões e morreram entre o 10° e 14° dias p.i. em consequência dos abscessos pulmonares, enquanto os camundongos C57BL/6 foram capazes de se recuperar da infecção, mostrando que a eliminação da bactéria pode ser crítica para a sobrevivência. O trabalho de Autenrieth et al. (1993) revelou ainda a presença maciça das populações celulares de macrófagos Mac-1, linfócitos T CD4+ e CD8+, no entanto o influxo das respectivas populações celulares foi consideravelmente diferente nas duas linhagens. Durante a fase inicial da infecção, células T CD4+ predominaram dentro das lesões granulomatosas dos BALB/c, enquanto macrófagos Mac-1, monócitos e granulócitos eram mais freqüentes nas lesões dos animais C57BL/6, os quais apresentaram um acúmulo de linfócitos T CD8+ ao redor do 3° dia p.i. Poucos linfócitos T CD8+ foram detectados nas lesões dos camundongos BALB/c.

Nossos resultados demonstraram que *Y. enterocolitica* WA-2707 foi capaz de promover a ativação policlonal de linfócitos B, com predomínio dos isotipos IgG2a e IgG3 na linhagem suscetível e IgG2a na linhagem resistente à infecção, o que condiz com o diferente perfil de citocinas regulatórias e pró-inflamatórias observado nestas linhagens de camundongos. O perfil montado pelos animais resistentes e suscetíveis parece ter uma função crucial no estabelecimento do curso da infecção. Nos animais BALB/c, o perfil Th2, definido pelo predomínio das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , citocinas estas antagonistas, contribuiu para que a infecção se tornasse persistente, promovendo assim a exacerbação da infecção. O aumento de IL-10 observado nesta linhagem de camundongos favoreceu a inibição de uma resposta

Th1, o que provavelmente diminuiu a ação do IFN- γ produzido por macrófagos ativadas, células efectoras importantes na resposta protetora do hospedeiro à bactéria. Nos camundongos C57BL/6 estabeleceu-se um perfil Th1 a partir do 7º dia p.i., com predomínio de TNF- α e IFN- γ , os quais parecem inibir as respostas Th2, além de favorecer a ativação de células T CD4+.

A produção de TGF- β , considerada uma molécula inibitória, por parte dos animais suscetíveis e a ausência de produção nos animais resistentes, é um outro importante fator de regulação da resposta imune do hospedeiro. A ação desta citocina na yersiniose experimental murina parece estar relacionada à suscetibilidade e exacerbação da infecção nos animais BALB/c, por inibir as respostas protetoras do perfil Th1 de secreção de citocinas, além de inibir outros mecanismos importantes de defesa do hospedeiro infectado, como a ativação de células citotóxicas.

Apesar dos nossos resultados mostrarem uma tendência à montagem de um padrão de citocinas Th1 nos animais C57BL/6 e um padrão de citocinas Th2 nos animais BALB/c, não foi possível estabelecer claramente essa polarização.

VI - Conclusões

- 1- A infecção experimental das linhagens BALB/c e C57BL/6 com *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-2707 foi capaz de induzir a ativação policlonal de linfócitos B.
- 2- Os camundongos BALB/c desenvolvem uma resposta imune celular com uma maior produção de citocinas inibitórias como IL-4, IL-10 e TGF- β .
- 3- Os camundongos C57BL/6 desenvolvem uma resposta imune celular com uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IFN- γ .
- 4- As citocinas IL-10 e TGF- β parecem favorecer a progressão da infecção por *Yersinia* nos animais BALB/c.
- 5- Não foi possível estabelecer claramente uma polarização Th1 ou Th2 nos animais infectados BALB/c e C57BL/6.

VII- Referências Bibliográficas

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.; HEESEMANN, 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.; TINGLE, A., RESKE-KUNZ, A., HEESEMANN, J. T lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cells clones specific for *Y. enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.60, n.3, p.1140-1149, 1992.

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.; 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, 1993.

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.

BARRAL NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A. ELLINGSWORTH, L. R. TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v. 257, p. 545-548, 1992.

BIRBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

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.

BOHN, E.; SING, A.; ZUMBIHL, R.; BIELELDT, C.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; HEESEMANN, J.; AUTENRIETH, I. B. IL-18 (IFN- γ -inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. **J. Immunol.**, v. 160, p. 299-307, 1998.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. **Microb. Infect.**, v. 1, p. 323-333, 1999.

BRUNDA, M.J. Interleukin-12. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55. p.280, 1994.

CARTER, P.B.; COLLINS, F.M. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in mice: kinetics of growth. **Infect. Immun.**, v.9, p.851-857, 1974.

CARTER, P. B.; VARGA, C. F.; KEET, E. E. New strain of *Yersinia enterocolitica* pathogenic for rodents. **Appl. Microbiol.** , v. 26, p. 1016-1018, 1973.

CAZAC, B. B.; ROES, J. TGF- β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. **Immunity**, v. 13, p. 443-451, 2000.

COVER, T. L.; ABE, R. C. *Yersinia enterocolitica*. **N. Engl. J. Med.**, v.321, p. 16-24, 1989.

CRESPO, A. M. C.; FALCÃO, D. P.; ARAÚJO, P. M. F.; MEDEIROS, B. M. M. Effects of *Yersinia enterocolitica* O:3 derivatives on B lymphocyte activation *in vivo*. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, p. 95-100, 2002

CRISPIM, J. C.; VARGAS, M. I.; VARELA, J. A. Immunoregulatory T cells in autoimmunity. **Autoimm. Rev.**, n. 3, p. 45-51, 2004.

CUROTTO de LAFAILLE, M. A .; LAFAILLE, J. J. CD4+ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14 , n.6 , p. 771-778, 2002.

CZERKINSKI, C. C.; NILSSON, L. A.; NYGREN, H.; OUCHTERLONY, O.; TARKOWSI, A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.109-121, 1983.

DELVES, P.J.; ROITT, I. M. The immune system. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, p. 37-49, 2000

DENIS, M.; GHADIRIAN, E. Transforming growth factor beta (TGF- 1) plays a detrimental role in the progression of experimental *Mycobacterium avium* infection: in vivo and in vitro evidence. **Microb. Pathog.**, v. 11, p. 367-372, 1991.

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 on inflammatory cytokines. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 6, p. 3561-3570, 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.

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.

FEARON, T.F.; CARROLL, M. C. Regulation of B lymphocyte response to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 393-422, 2000.

GATELY, M. K.; WARRIER, R. R.; HONASOGE, S.; CARVAJAL, D. M.; FAHERTY, D. A.; CONNAUGHTON, S. E.; ANDERSON, T. D.; SARMIENTO, U.; HUBBARD, B. R.; MURPHY, M. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytotoxic lymphocytes activity and induces production of IFN-gamma in vivo. **Int. Immunol.**, v. 6, p. 157-167, 1994.

GRANFORS, K.; VUENTO, R.; TOIVANEN, A. Host-microbe interaction in reactive arthritis. In: TOIVANEN, A.; TOIVANEN, P. (Ed.). **Reactive arthritis**. Boca Raton, CRS Press, 1988. p.15-49.

GRANFORS, K.; JALKANEN, S.; Von ESSEN, R.; LAHEAMAA-RANTALA, R.; ISOMAKI, O.; PEKKOLA-HEINO, K.; MERILAHTI-PALO, R.; SAARIO, R.; ISOMAKI, H.; TOIVANEN, A. *Yersinia* antigens in synovial fluid cells from patients with reactive arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v.320, p.216-221, 1989.

- GRIPENBERG, M.; MIETTINEN, A.; KURKI, P.; LINDER, E. Humoral immune stimulation and antiepithelial antibodies in *Yersinia* infection. **Arthritis Rheum.**, v.21, p.904-908, 1978.
- HANCOCK, G. E.; SCHAEGLER, R.; MacDONALD, T. T. *Yersinia enterocolitica* infection in resistant and susceptible strains of mice. **Infect. Immun.**, v. 53, n. 1, p. 26-31, 1986.
- HANDLEY, S. A.; DUBE, P. H.; REVELL, P. A.; MILLER, V. L. Characterization oral *Yersinia enterocolitica* infection in three different strains of inbred mice. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1645-1656, 2004.
- 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.
- HEESEMAN, J.; GAEDE, K. Mechanisms involved in the pathogenesis of *Yersinia* infections. **Rheumatol. Int.**, v.9, p.213-7, 1989.
- HERMANN-MÄRKER, E.; HÖHLER, T. Pathogenesis of human leukocytes antigen B27- positive arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**,v.24, p. 865-881, 1998.
- 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.

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.

KAYE, P. M.; CURRY, A. J.; BLACKWELL, J. M. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, n. 146, p. 2763-2770, 1991.

KEHRL, J. H.; WAKEFIELD, L. M.; ROBERTS, A. B.; JAKOWLEW, S.; ALVAREZ MON, M.; DERYNCK, R.; SPORN, M. B.; FAUCI, A. S. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J. Exp. Med.**, v. 163, p. 1037-1050, 1986.

KINDLER, V.; SAPPINO, A. P.; GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; VASSALLI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, v. 56, p. 731-734, 1989

KÜHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; and MÜLLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, p. 263-274, 1993.

LAHESMAA, R.; SHANAFELT, M. C.; STEINMAN, L.; PELTZ, G. Immunopathogenesis of human inflammatory arthritis: lessons from Lyme and reactive arthritis. **J. Infect. Dis.**, v. 170, p.978-985, 1994.

LEIRISALO-REPO, M.; SUORANTA, H. Ten-year followup study of patients with *Yersinia* arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.31, p.533-537, 1988.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 137-161, 1998.

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.

MALOY, K. J.; SALAUN, L.; CHAHILL, R. CD4+CD25+ TR cells suppress innate immune pathology through cytokin-dependent mechanisms. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 111-119, 2003.

MARTINEZ, R.J. Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.41, p.921-930, 1983.

MEDEIROS, B.M.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FALCÃO, D.P. Immunoglobulin isotypes produced by mice experimentally infected with *Yersinia* sp. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v. 12, p.177-22, 1991.

MEDEIROS, B.M.M.; COSTA, A.M.; ARAUJO, P.M.F.; FALCÃO, D.P. Occurrence of Polyclonal B-cell Activation after Experimental Infection with *Yersinia enterocolitica* O:3. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v.13, p.207-210, 1995.

MEDEIROS, B.M.M.; COSTA, A.M.; ARAUJO, P.M.F.; FALCÃO, D.P. Association between polyclonal B cell activation and the presence of autoantibodies in mice infected with *Yersinia enterocolitica* O:3. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.30, p.401-405, 1997.

MEDEIROS, B. M. M.; MALMEGRIM, K. C. R.; QUEIROZ, C. A.; CANGIANI, E. E. Humoral immune response in *Yersinia enterocolitica* O:3 – infected BALB/c mice. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 21, n. 1, p. 45-55, 2000.

MEDEIROS, B.M.M.; RAMOS, O.P.; SILVA, E.E.C.; FALCÃO, D.P. Polyclonal B-cell activation in mice infected by intragastric route with *Yersinia enterocolitica* O:8. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.529, p.147-149, 2003.

MIELKE, M. E.; ROSEN, H.; BROCKE, S.; PETERS, E.; HAHN, H. Protective immunity and granuloma formation are mediated by two distinct tumor necrosis factor alpha and gamma interferon-dependent T-cell-phagocyte interactions in murine listeriosis: dissociation on the basis of phagocyte adhesion mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1875-1882, 1992.

MISHELL, B. B.; SHIIGI, S.M. (Ed.) **Selected methods in cellular immunology.** New York: W.H. Freeman, 1980. p.16.

MONTPLAISIR, S.; GAGNÉ, M.; DUBOIS, R.; GENGOUX, P.; PELLETIER, M. Brush border membrane antibodies in *Yersinia* infection and other diseases.

Contrib. Microbiol. Immunol., v.5, p.351-358, 1979.

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, L.; AEBISCHER, T.; HANDMAN, E.; KELSO, A. Resistance of BALB/c mice to *Leishmania major* infection is associated with a decrease in the precursor frequency of antigen-specific CD4⁺ cells secreting interleukin-4. **Int. Immunol.**, v. 5, p. 761-767, 1993.

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.

MOSSMAN, T. R.; COFFMAN R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.**, v.7, p. 145-173, 1989.

MULLER, I.; KROPF, P.; ETGES, R. J.; LOUIS, J. A. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8⁺ cells. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3730-3738, 1993.

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.

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.

NELSON, B. J.; RALPH, P.; GREEN, S. J.; NACY, C. A. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1. **J. Immunol.**, v. 146, p.1849-1857, 1991.

NURMINEN, M.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; MAKELA, P.H. The genus-specific antigen of *Chlamydia*: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria. **Science**, v.220, p.1279-1281, 1983.

ORANGE, J.S.; WOLF, S.F.; BIRON, C. A. Effects of IL-12 on the response and susceptibility to experimental viral infections. **J. Immunol.**, v. 152, p. 1253-1264, 1994.

ORANGE, J.S.; SALAZAR M. T. P.; OPAL, S.M.; SPENCER, R.L.; MILLER, A. H. McEWEN, B. S.; BIRON, C. A. Mechanisms of interleukin 12-mediated toxicities

during experimental viral infections: role of tumor necrosis factor and glucocorticoids.

J. Exp. Med., v. 181, p. 901-914, 1995.

OZMEN, L.; PERICIN, M.; HAKIMI, J.; CHIZZONITE, R. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; GATELY, M.; GAROTTA, G. Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 907-915, 1994.

POWRIE, F. T. Cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles.

Immunity, v.3, p. 171-174, 1995.

PUJOL, C.; BLISKA, J. B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. **Clin. Immunol.**, v.114, p. 216-226, 2005.

RAMOS, O.P.; SILVA, E.E.C.; MAIA, J.M.L.; MEDEIROS, B.M.M. Ativação de linfócitos B das placas de Peyer de camundongos infectados por via gástrica com *Yersinia enterocolitica* O:8. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 22, n.1, p. 79-93 , 2001.

RAMOS, O.P.; SILVA, E.E.C.; FALCÃO, D. P.; MEDEIROS, B.M.M. Production of autoantibodies associated with polyclonal activation in *Yersinia enterocolitica* O:8-infected mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 49, n. 2, p. 129-137, 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.

ROOK, A. H.; KEHRL, J. H.; WAKEFIELD, L. M.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B.; BURLINGTON, D. B.; LANE, H. C.; FAUCI, A. S. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. **J. Immunol.**, v. 136, p. 3916-3920, 1986.

RÜSSMANN, H.; BUCKDESCHEL, K.; HEESEMANN, J. Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an endothelial monolayer by polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 3, p. 1016-1019, 1996.

SCHIMITT, E.P.; HOEHN, P.; HUELS, C.; GOEDERT, S.; PALM, N.; RUDE, E.; GERMANN, T. T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-2 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.**, v.24, p.793, 1994.

SHENKMAN, L.; BOTTONE, E.J. The occurrence of antibodies to *Yersinia enterocolitica* in thyroid diseases. In: BOTTONE, E.J. (Ed.) ***Yersinia enterocolitica***. Boca Raton: CRC Press, 1981. p.135-44.

SHEVACH, E. M. Regulatory T cells in autoimmunity. **Annu Rev. Immunol.**, v. 18, p. 423-449, 2000.

SHER, A.; GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M.; PEARCE, E. J.; BERZOFKY, J. A.; MOSMANN, T. R.; JAMES, S. L.; and MORSE, H. C. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunol. Rev.**, v. 127, p. 183-204, 1992.

SHULL, M. M.; ORMSBY, I.; KIER, A. B.; PAWLOWSKI, S.; DIEBOLD, R. J.; YIN, M.; ALLEN, R.; SIDMAN, C.; PROETZEL, G.; CALVIN, D. et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v. 359, p. 693-699, 1992.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in vitro by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 539-545, 1991.

SILVA, E.E.C.; RAMOS, O.P.; BAUAB, T. M.; FALCÃO, D.P.; MEDEIROS, B.M.M. *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from patients with or without reactive arthritis induces polyclonal activation of B cells and autoantibodies production *in vivo*. **Autoimmunity**, v.36, n.5, p.261-268, 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.

SPACCAPELO, R.; ROMANI, L.; TONNETTI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; TOGNELLINI, R.; REED, S. G.; PUCCHETTI, 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.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 783-793, 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.

TOYOS, J.R. de LOS; MENENDEZ, P. J.; SAMPEDRO, A.; HARDISSON, C. *Yersinia enterocolitica* serotype O:3-induced arthritis for mice. Microbiological and histopathological information. **APMIS**. V.100, p. 455-464, 1992.

TOYOS, J.R. de LOS; VASQUEZ, J.; SAMPEDRO, A.; HARDISSON, C. *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is arthritogenic for mice. **Microb. Pathog.**, v.8, p. 363-370, 1990.

VALTONEN, V.V.; LEIRISALO, M.; PENTIKAINEN, P.J.; RASANEN, T.; SEPPALA, I.; LARINKALI, U.; RANKI, M. Triggering infections in reactive arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.44, p.399-405, 1985.

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.

WUORELA, M.; GRANFORS, K. Infectious agents as triggers of reactive arthritis. **Am. J. Med. Sci.**, v.316, n.4, p. 264-270, 1998.

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.

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 resistnace. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1243-1251, 2000.