

Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

**“Avaliação da Resposta Imune de Células Dendríticas e
Subpopulações de Linfócitos T no Modelo Experimental de
Yersinia pseudotuberculosis”**

Aline Tansini

Araraquara

2012

Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

**“Avaliação da Resposta Imune de Células Dendríticas e
Subpopulações de Linfócitos T no Modelo Experimental de
Yersinia pseudotuberculosis”**

Aline Tansini

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como pré requisito para obtenção do título de doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara

2012

Ficha Catalográfica

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

T168a Tansini, Aline
Avaliação da resposta imune de células dendríticas e subpopulações de linfócitos T no modelo experimental de *Yersinia pseudotuberculosis* / Aline Tansini. – Araraquara, 2012
108 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1. *Yersinia pseudotuberculosis*. 2. Células dendríticas. 3. Linfócitos T. 4. Citocinas. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo n° 09/00984-5, e concessão de bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Elisa, que sempre me incentivaram e apoiaram ao longo do meu caminho, ao meu irmão André, sempre portador de alegria e carinho e ao meu namorado Bruno, pela paciência e companheirismo no decorrer desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e ao Bruno pelo apoio, paciência, confiança e amor.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pelo carinho nos momentos de tristeza e desabafo, pelos conselhos nas horas de dúvida e pelos sorrisos compartilhados ao longo dessa caminhada.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos pela confiança em mim depositada, paciência e atenção prestadas durante o desenvolvimento do estudo.

À amiga Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta pela colaboração na manutenção das amostras bacterianas, apoio nos momentos difíceis e companheirismo nas horas felizes.

Às funcionárias do Setor de Pós-graduação pela atenção e empenho sempre dedicados.

Aos professores da FCFar-UNESP por compartilharem seus conhecimentos durante as disciplinas e auxiliarem em nosso crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, pela oportunidade de
realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e ao Conselho
Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento
deste estudo. O caminho se torna menos árduo quando podemos dividir nossas preocupações
e ainda mais alegre quando compartilhamos nossas conquistas.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 11 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 13 |
| LISTA DE TABELAS..... | 15 |
| RESUMO..... | 16 |
| ABSTRACT..... | 18 |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| | |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 22 |
| 2.1 Espécies patogênicas de <i>Yersinia</i> e fatores de virulência..... | 22 |
| 2.2 Células dendríticas e a sua função na resposta imune..... | 26 |
| 2.3 Subpopulações de linfócitos Th17 e Treg na imunidade antimicrobiana..... | 29 |
| | |
| 3. OBJETIVOS..... | 35 |
| 3.2 Objetivo Geral..... | 36 |
| 3.3 Objetivos Específicos..... | 36 |
| | |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 4.1 Fluxograma de experimentos..... | 38 |
| 4.2 Animais..... | 39 |
| 4.3 Amostras bacterianas..... | 39 |
| 4.4 Infecção experimental dos animais..... | 39 |
| 4.4.1 Reativação da amostra de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 39 |
| 4.4.2 Determinação da dose infectante..... | 40 |
| 4.4.3 Preparo do inóculo..... | 40 |
| 4.4.4 Esquema de infecção..... | 40 |
| 4.5 Preparo do Antígeno de <i>Yersinia</i> – HKY (“Heat-killed <i>Yersinia</i> ”)..... | 41 |
| 4.6 Diferenciação de Células dendríticas a partir de precursores de Medula Óssea..... | 41 |
| 4.7 Determinação da produção de citocinas por ELISA..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 4.8 Quantificação das subpopulações de linfócitos T e determinação do padrão de citocinas através de citometria de fluxo..... | 42 |
| 4.8.1 Obtenção de células do baço..... | 42 |
| 4.8.2 Viabilidade celular..... | 43 |
| 4.8.3 Análise fenotípica dos linfócitos..... | 43 |
| 4.8.4 Determinação da produção de citocinas intracelulares..... | 43 |
| 4.9 Avaliação funcional das subpopulações de linfócitos Treg e Th17..... | 44 |
| 4.9.1 Linfócitos Tregs..... | 44 |
| 4.9.2 Linfócitos Th17..... | 45 |
| 4.10 Análise estatística..... | 45 |
| 5. RESULTADOS..... | 46 |
| 5.1 Dose infectante para as diferentes amostras de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 47 |
| 5.2 Cultura de Células dendríticas com diferentes estímulos..... | 48 |
| 5.3 Produção de citocinas por células dendríticas infectadas com <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 50 |
| 5.4 Subpopulações de linfócitos T após infecção por <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 53 |
| 5.5 Subpopulação de linfócitos CD4+ CD25+ FoxP3+..... | 56 |
| 5.6 Expressão de citocinas intracelulares por linfócitos T..... | 58 |
| 5.7 Detecção da expressão de IL-17 intracelular..... | 67 |
| 5.8 Avaliação funcional das subpopulações de linfócitos Th17 e Treg..... | 69 |
| 5.9 Representação dos principais resultados obtidos..... | 70 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 73 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 81 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 83 |

CAPÍTULO 2

| | |
|-------------------------|-----------|
| MANUSCRIPT | 95 |
|-------------------------|-----------|

“Yop effector proteins from *Yersinia pseudotuberculosis* impair dendritic cells activation”

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Célula apresentadora de antígeno

BAB - do inglês “Blood Agar Base”

BOD - Demanda bioquímica de oxigênio

BSA - Albumina de soro bovino

CD - do inglês “Cluster of Differentiation”

CO₂ - Dióxido de Carbono

CTLA-4 - do inglês “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4”

D.O. - Densidade óptica

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

ELISA - do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

FBS - Soro fetal bovino

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

Foxp3 - do inglês “forkhead box P3”

GM-CSF - Fator estimulante de colônia granulocítica e monocítica

HKY - do inglês “heat-killed *Yersinia*”

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

IDC - Célula dendrítica intersticial

IFN- γ - Interferon-gama

IL - Interleucina

LC - Célula de Langerhans

LPS - Lipopolissacarídeo

LcrV - Antígeno V

MHC - Complexo de Histocompatibilidade Principal

MIF - Mediana da intensidade de fluorescência

MNL - Linfonodo mesentérico

moDC - Células dendríticas derivadas de monócitos

MOI - Multiplicidade de infecção

NK - do inglês “Natural Killer”

PAMP - Padrões moleculares associados ao patógeno

PBS - Solução salina tamponada de fosfatos

PE - Ficoeritrina

PE-Cy-7 - Ficoeritrina-Ciano 7

PMA - Acetato de forbol miristato

PP - Placas de Peyer

PRR - Receptores de reconhecimento de padrão

pYV - do inglês “Yop virulon”

ROR γ t - do inglês “retinoic acid receptor-related orphan receptor”

SD - Desvio padrão

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta

Th - do inglês “T helper”

TLR - do inglês “Toll Like Receptor”

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Treg - T regulatório

TSB - do inglês “Tryptic Soy Broth”

T3SS - Sistema de secreção do tipo três

UFC - Unidades formadoras de colônia

Yops - do inglês “*Yersinia* outer proteins”

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Viabilidade de células dendríticas após infecção por linhagens de *Y. Pseudotuberculosis*.....49
- Figura 2** – Produção de citocinas IL-6, IL-12 e TNF- α por células dendríticas após infecção por linhagens de *Y. Pseudotuberculosis*.....51
- Figura 3** – Produção de citocinas IL-10 e TGF- β por células dendríticas após infecção por linhagens de *Y. Pseudotuberculosis*.....52
- Figura 4** – Representação das subpopulações de linfócitos CD3+, CD3+CD4+ e CD3+CD8+ obtidos por citometria de fluxo.....54
- Figura 5** – Determinação das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com amostras de *Y. pseudotuberculosis* e não infectados (controle).....55
- Figura 6** – Determinação das subpopulações de linfócitos CD4+ CD25+ FoxP3+ obtidos do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com amostras de *Y. pseudotuberculosis* e não infectados (controle).....57
- Figura 7** – Determinação de IL-2 intracelular em linfócitos T CD4+ e CD8+ do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. pseudotuberculosis* e controles.....60
- Figura 8** – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina IL-2 por linfócitos T CD4+ durante infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis*.....61
- Figura 9** – Determinação de TNF- α intracelular em linfócitos T CD4+ e CD8+ do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. pseudotuberculosis* e controles.....62

| | |
|--|----|
| Figura 10 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina TNF- α por linfócitos T CD4+ durante infecção com amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 63 |
| Figura 11 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina TNF- α por linfócitos T CD8+ durante infecção com amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 64 |
| Figura 12 – Determinação de IFN- γ intracelular em linfócitos T CD4+ e CD8+ do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e controles..... | 65 |
| Figura 13 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina IFN- γ por linfócitos T CD4+ durante infecção com amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 66 |
| Figura 14 – Determinação de IL-17 intracelular em linfócitos T CD4+ do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e controles..... | 67 |
| Figura 15 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina IL-17 por linfócitos T CD4+ durante infecção com amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 68 |
| Figura 16 – Determinação de CFU em baço de camundongos infectados com <i>Y. Pseudotuberculosis</i> tratados com anti-CD25 ou anti-IL-17..... | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Doses infectantes estabelecidas para as diferentes amostras bacterianas..... | 46 |
| Tabela 2: Diferentes estímulos utilizados na cultura de células dendríticas..... | 47 |
| Tabela 3: Produção de citocinas por células dendríticas infectadas com diferentes amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 70 |
| Tabela 4: Expressão de citocinas intracelulares por linfócitos T CD4+ obtidos de camundongos infectados com diferentes amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 71 |
| Tabela 5: Expressão de citocinas intracelulares por linfócitos T CD8+ obtidos de camundongos infectados com diferentes amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 71 |
| Tabela 6: Subpopulação de linfócitos T durante infecção com diferentes amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 72 |

RESUMO

A infecção por *Y. pseudotuberculosis* é uma causa de doenças intestinais e extraintestinais. A resolução da infecção está relacionada à ativação de células Th1, entretanto, pouco se conhece sobre a influência de outras subpopulações de linfócitos T, como Th17 e Treg, na regulação dessa infecção. Células dendríticas são capazes de orientar a resposta imune adaptativa através da produção de citocinas e apresentação de antígenos às células T, tornando essas células essenciais na ativação e diferenciação de linfócitos T. Desse modo, o presente trabalho avaliou o papel de distintas subpopulações de linfócitos T e a influência de células dendríticas no desenvolvimento da resposta imune contra a infecção por *Y. pseudotuberculosis*. Para tanto, foram avaliadas as subpopulações de linfócitos T CD4+, CD8+ e Foxp3+, presentes durante a infecção por *Y. pseudotuberculosis* e amostras bacterianas mutantes para fatores de virulência Yops, bem como a expressão de citocinas intracelulares (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α e TGF- β) por estas células. O papel de linfócitos Treg e Th17 no controle da bactéria foi analisado por meio de ensaio de depleção de células CD25+ e neutralização de IL-17. Além disso, a influência de células dendríticas na modulação da resposta imune contra *Y. pseudotuberculosis* foi estudada através da determinação da produção de citocinas (IL-6, IL-12, IL-10, IL-23, TNF- α e TGF- β) e cocultivo com linfócitos T obtidos de animais imunizados com antígenos de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostraram redução na produção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas infectadas com a amostra bacteriana portadora do plasmídeo de virulência, em ambas as linhagens de camundongos estudadas. Os fatores de virulência YopJ e YopE parecem ter influência sobre a secreção de IL-12 e TNF- α . A análise dos níveis de IL-10 mostrou uma considerável produção desta citocina após infecção por *Y. pseudotuberculosis*, mais evidente nas células obtidas dos camundongos BALB/c. A infecção também diminuiu a capacidade células dendríticas infectadas ativarem a proliferação de linfócitos T, com evidências da participação das YopJ e YopE. A fenotipagem e detecção de citocinas intracelulares de diferentes subpopulações de linfócitos T indicou maior influência da bactéria sobre a subpopulação TCD4+, com diminuição da expressão das citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ . Ensaio de depleção de células CD25+ e neutralização de IL-17 em camundongos infectados com amostra de *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência indicou a importância das subpopulações Treg e Th17 na eliminação da bactéria. As análises demonstraram que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* tem como alvo células dendríticas e linfócitos T, diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e prejudicando a ativação da resposta imune adaptativa. Os fatores de virulência Yops parecem

auxiliar no processo de subversão das defesas imunes, colaborando para evolução da infecção. Por outro lado, células Treg e Th17 mostraram importância no controle da infecção.

Palavras Chaves: *Yersinia pseudotuberculosis*, células dendríticas, linfócitos T, citocinas

ABSTRACT

Y. pseudotuberculosis infection is a cause of intestinal and extraintestinal diseases. Infection resolution is related to the activation of Th1 cells, however, little is known about the influence of other T cells subsets, like Th17 and Treg, in the control of this infection. Dendritic cells are capable of directing the adaptive immune response by producing cytokines and presenting antigens to T cells, making them essential to T lymphocytes activation and differentiation. Thus, this study evaluated the role of different T lymphocytes subsets and the influence of dendritic cells on the development of the immune response against *Y. pseudotuberculosis* infection. Here, we evaluated the T cells subsets CD4+, CD8+ and Foxp3+, present during *Y. pseudotuberculosis* infection and mutant samples bacterial virulence factors, and also the intracellular expression of cytokines (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α and TGF- β) by these cells. The role of Th17 and Treg cells in controlling the bacteria was analyzed by tests of depleted CD25+ cells and IL-17 neutralization. Furthermore, the influence of dendritic cells in modulating the immune response against *Y. pseudotuberculosis* was studied by determining the cytokine production (IL-6, IL-12, IL-10, IL-23, TNF- α and TGF- β) and co-culture with lymphocytes from animals immunized with *Y. pseudotuberculosis* antigens. The results showed a reduction in proinflammatory cytokines production by dendritic cells infected with bacteria carrying the bacterial virulence plasmid, in both mice strains studied. YopJ and YopE virulence factors seem to influence IL-12 and TNF- α release. Analysis of IL-10 levels showed a considerable production of this cytokine after *Y. pseudotuberculosis* infection, more evident in cells obtained from BALB/c mice. The infection also decreased the ability of infected dendritic cells to activate T lymphocyte proliferation, with evidence of YopJ and YopE involvement. The determination of the T lymphocytes subsets and intracellular cytokines indicated that the infection had a greater influence over the CD4+ subset, marked by decreased expression of IL-2, TNF- α and IFN- γ . Evaluation of CD25+ cells depletion and IL-17 neutralization in mice infected with *Y. pseudotuberculosis* carrying the virulence plasmid indicated the importance of Th17 and Treg subsets in infection resolution. Analysis showed that *Y. pseudotuberculosis* infection targets dendritic cells and T cells, decreasing the proinflammatory cytokines secretion and impairing the activation of adaptive immune response. The Yops virulence factors appear to help in the process of immune defenses subversion, contributing to the infection evolution. Moreover, Treg and Th17 cells were important in controlling infection.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, dendritic cells, T lymphocytes, cytokines

1. Introdução

O gênero *Yersinia* compreende três espécies que são patogênicas para roedores e humanos, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Todas as três espécies demonstram tropismo por tecidos linfóides, apresentam capacidade de proliferar extracelularmente e são capazes de resistir à resposta imune do hospedeiro (Cornelis e Wolf-Watz 1997). *Y. pestis* é o agente etiológico da peste, uma doença sistêmica fatal. *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* causam distúrbios gastrointestinais, enterite e linfadenite mesentérica, geralmente auto-limitados (Viboud e Bliska 2005).

Todas as cepas patogênicas albergam um plasmídeo de 70-kb, chamado pYV (“Yop virulon”), o qual codifica um sistema de secreção do tipo III (T3SS) e as “*Yersinia* outer proteins” (Yops), essenciais para a virulência bacteriana. As espécies patogênicas de *Yersinia* liberam seis diferentes proteínas efetoras no citosol da célula hospedeira: YpkA (denominada YopO em *Y. enterocolitica*), YopE, YopJ (chamada YopP em *Y. enterocolitica*), YopH, YopM and YopT, responsáveis pela inibição da resposta imune do hospedeiro. (Trülzsch et al., 2005, Navarro et al., 2005).

O modelo murino de yersiniose estabelecido por Carter e Collins (1975), ainda é o mais conveniente e amplamente utilizado para a investigação das interações desta bactéria com o hospedeiro, sendo o que mais se assemelha à infecção ocorrida em humanos. Diferentes linhagens de camundongos desenvolvem respostas distintas na presença de microrganismos patogênicos. Camundongos C57BL/6 apresentam um fenótipo de resistência frente à infecção por *Yersinia*, onde se observa produção de elevados níveis de interferon gama (IFN- γ). Em contraste, camundongos BALB/c exibem um perfil de suscetibilidade, com produção elevada de Interleucina (IL)-4 (Bohn e Autenrieth, 1996).

A resposta imune hospedeira contra yersiniose é mediada pela ativação de diferentes tipos celulares. Mecanismos da resposta imune inata, envolvendo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células “natural killer” (NK), desempenham um importante papel no controle do crescimento de *Yersinia* nos tecidos do hospedeiro (Autenrieth et al. 1993). Entretanto, a eliminação do patógeno está associada ao desenvolvimento de uma resposta imune celular Th1, caracterizada pela expansão de células T CD4+ específicas, secretoras de IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Autenrieth e Heeseman, 1992, Autenrieth et al. 1993).

Entretanto, pouco é conhecido sobre o papel de outras subpopulações de linfócitos T, distintas de Th1 e Th2, no controle da infecção por *Yersinia*. Respostas imunes protetoras desenvolvidas por células Th17 já foram determinadas em infecções contra fungos e patógenos extracelulares (Stockinger e Veldhoen, 2007). Linfócitos Th17 são caracterizados

por produzir IL-17 e IL-22, citocinas envolvidas com a estimulação de fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, bem como recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (Romagnani, 2006). Estudo recente demonstra que a citocina IL-17 pode desempenhar um importante papel na imunidade protetora contra *Y. pestis*, indicando uma possível função da subpopulação de linfócitos Th17 na defesa contra *Yersinia* (Jr-Shiuan et al., 2011).

Estudos anteriores têm descrito um grande número de citocinas pró-inflamatórias associadas com a resposta imune contra a infecção por *Yersinia* enteropatogênica (Bohn e Autenrieth 1996, Bohn et al. 1998, Matteoli et al. 2008), mas os mecanismos imunológicos que mantêm o equilíbrio entre os efeitos benéficos e negativos da inflamação durante o curso da infecção não estão claros. Uma subpopulação de linfócitos T, conhecidos como T regulatórios (Treg), desempenha uma importante função na manutenção da homeostasia do sistema imune, podendo influenciar o curso das infecções. Células Treg CD4⁺CD25⁺ representam 7% a 10% de todas as células T CD4⁺ presentes na periferia (Chen et al. 2005) e possuem um importante papel no controle da resposta inflamatória exacerbada, a qual pode conduzir à injúria tecidual e controle ineficiente das infecções. Zhong et al (2010) mostrou a depleção *in vivo* de células CD25⁺ conduz a maior suscetibilidade de camundongos à infecção aguda do trato gastrointestinal por *Y. enterocolitica*, evidenciando o papel das células Treg no controle da infecção.

A modulação das respostas de células T está diretamente relacionada ao reconhecimento e apresentação dos antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), que induzem a diferenciação dos linfócitos, dependendo do tipo de citocina secretada (Ueno et al., 2007). As células dendríticas são um importante grupo de APCs, encontradas em quase todos os tecidos periféricos. Desempenham papéis importantes em toda a resposta imune, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Por meio da apresentação de antígenos às células T e produção de diversas moléculas, células dendríticas podem orientar a resposta imune adaptativa, conduzindo a expansão e diferenciação de linfócitos específicos (Ueno et al., 2007).

A ativação de distintas subpopulações de linfócitos T gera diferentes tipos de respostas, que podem influenciar o curso de uma infecção. A determinação dos mecanismos de diferenciação e do papel de células T durante infecções pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas no combate aos patógenos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Espécies patogênicas de *Yersinia* e fatores de virulência

O gênero *Yersinia*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é constituído por cocos Gram-negativos, não esporulados, oxidase negativos e anaeróbios facultativos. São predominantemente extracelulares (Simonet et al., 1990), sendo que três espécies são patogênicas para o homem, *Y. pestis*, responsável pelo desenvolvimento da peste bubônica (Carniel, 2002), *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, que causam distúrbios gastrointestinais, geralmente auto limitados no homem (Bottone, 1999).

Lipopolissacarídeo (LPS) é um importante componente da membrana de bactérias Gram-negativas, formado por três regiões distintas: lipídeo A, oligossacarídeo e polissacarídeo específico O (antígeno O). Os genes responsáveis pela biossíntese do antígeno O são cromossômicos e altamente polimórficos (Skurnik e Zhang, 1996). Baseado nas diferenças estruturais do antígeno O, *Y. pseudotuberculosis* pode ser dividida em sorotipos, importantes para diagnóstico e caracterização epidemiológica. A caracterização estrutural desses sorotipos permite identificar subtipos, como: sorotipos O:1 e O:2 são divididos em subtipos a, b, e c e sorotipos O:4 e O:5 são divididos em subtipos a e b, respectivamente. Além disso, os sorotipos de O:1 a O:7 ainda são caracterizados pela presença de um sorogrupo específico, 3,6-dideoxyhexoses (DDHs), no antígeno O (Bogdanovich et al., 2003).

A ingestão *Yersinia* enteropatogênica através de água ou alimentos contaminados desencadeia enterites e linfadenites, geralmente autolimitadas no homem (Bottone, 1999). Em casos raros, principalmente em pacientes imunodeprimidos e portadores de hemocromatose, a bactéria pode disseminar-se sistemicamente, com elevadas taxas de mortalidade (Abbott et al. 1986, Paglia et al. 2005).

Na evolução da infecção causada por *Y. pseudotuberculosis*, o microrganismo adquirido por via oral invade as células M, localizadas no epitélio intestinal associado ao folículo e especializadas na defesa contra patógenos. Após algumas horas, a *Yersinia* coloniza folículos linfóides conhecidos como Placas de Peyer (PP), podendo expandir-se para os linfonodos mesentéricos (MLN) (Autenrieth e Firshing, 1996). As cepas virulentas proliferam no tecido linfóide associado ao intestino e lâmina própria, onde causam destruição tecidual localizada, com formação de micro abscessos. A bactéria pode também disseminar-se para o baço e fígado, causando infecção sistêmica, e podendo levar à morte do animal (Mecses et al., 2001).

Cepas virulentas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são usualmente encontradas na forma de agregados bacterianos extracelulares, em tecidos linfóides de animais infectados por mais de 12 horas. Cepas curadas do plasmídeo de virulência são capazes de colonizar transitoriamente os linfonodos mesentéricos e os baços dos animais, entre uma a 48 horas após a infecção oral, sendo posteriormente contidas em granulomas e eliminadas (Robins-Browne et al., 1985; Lian et al., 1987). Estudos recentes demonstram que a colonização do baço e fígado pode ocorrer antes da replicação nos tecidos linfóides intestinais, indicando que a infecção hepatoesplênica não requer, necessariamente, a disseminação prévia da bactéria para PP e MLN (Barnes et al., 2006).

Experimentos com camundongos infectados com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*, selvagem e mutantes com deleção no gene para produção de YopH e YopE, reafirmaram a capacidade do microrganismo de produzir infecção em sítios sistêmicos. Entretanto, os resultados mostraram que as cepas mutantes não foram capazes de colonizar o baço e fígado, ou seja, promover infecção sistêmica, sugerindo a importância desses fatores de virulência na disseminação do patógeno e evasão da resposta imune do hospedeiro (Logsdon e Meccas, 2006).

O modelo murino de yersiniose estabelecido por Carter & Collins (1975), ainda é o mais conveniente e amplamente utilizado para a investigação das interações desta bactéria com o hospedeiro, sendo o que mais se assemelha à infecção ocorrida em humanos.

As três espécies possuem tropismo por tecidos linfóides, além de habilidades para proliferação extracelular e escape da resposta imune. Essa evasão dos mecanismos de defesa imune deve-se à capacidade da bactéria de destruir células fagocíticas, suprimir produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e inibir a ativação da resposta imune adaptativa (Navarro et al., 2005). A evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro pelas espécies enteropatogênicas de *Yersinia* é possibilitada por fatores de virulência codificados por genes cromossomais (*inv*, *ail*, *yst*, *irp2* e *myf*) e por genes plasmídeos (*yadA* e *yop*), que promovem a invasão da bactéria, aquisição de ferro e paralisam especialmente as funções do sistema complemento e a fagocitose (Carniel, 2002). Todas as cepas patogênicas albergam um plasmídeo de 70-kb, chamado pYV, que é essencial para a virulência bacteriana (Cornelis et al., 1998), e permite que a mesma estabeleça seu nicho ecológico extracelularmente ou no interior de macrófagos (Bottone, 1999). Este plasmídeo codifica o T3SS, a proteína YadA, numerosas proteínas denominadas Yops e o LcrV (Cornelis et al., 1998).

O T3SS é responsável por “ejetar” as proteínas efetoras intracelulares do citoplasma da bactéria para o citosol do hospedeiro. No interior da célula hospedeira, as Yops efetoras interferem com as vias de sinalização envolvidas na regulação do citoesqueleto de actina, fagocitose, apoptose e resposta inflamatória (Navarro et al., 2005).

A proteína YadA é uma adesina não fimbrial que possui além da função na adesão celular, capacidade de proteger o patógeno contra a resposta imune humoral, bem como contra defensinas e lise por proteínas do sistema complemento (Heesemann et al., 2006).

O LcrV é secretado no meio extracelular, onde atua inibindo a inflamação, através da interação com o receptor Toll-like (TLR) do tipo 2, sendo que sua atividade imunomodulatória está associada à indução de IL-10, mediador que auxilia na supressão de citocinas pró-inflamatórias (Brubaker, 2003).

As Yops, um conjunto de onze proteínas, desempenham uma função central na virulência por permitir à bactéria evadir-se da fagocitose, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e desencadear a apoptose de fagócitos (Hartland e Robins-Browne, 1998; Cornelis, 2002). São sintetizadas em meio deficiente de cálcio e na fase exponencial de crescimento a 37°C, sendo, portanto, reguladas por estímulos extracelulares de cálcio e de temperatura (Bottone, 1997).

A principal função das Yops é inibir a resposta imune do hospedeiro, sendo que 6 diferentes Yops são efetoras intracelulares, YopH, YpkA (chamada de YopO em *Y. enterocolitica*), YopT, YopE, YopM e YopJ (chamada de YopP em *Y. enterocolitica*) (Navarro et al., 2005). Ao menos 4 Yops (YopH, YopE, YopT, YpkA/YopO) estão envolvidas com a inibição da fagocitose, por causar disfunções no citoesqueleto de leucócitos polimorfonucleares (Bliska e Black, 1995). YopH e YopE suprimem a produção de espécies reativas de oxigênio por inibir o “burst oxidativo” (Bliska e Black, 1995). YopM está associada com a depleção de células NK e modulação da expressão gênica das células infectadas do hospedeiro (Skrzypek et al., 2003). Por fim, a YopJ/YopP inibe o recrutamento de polimorfonucleares para os sítios de infecção (Denecker et al., 2001), induz apoptose em macrófagos (Monack et al., 1998).

Estudos realizados *in vitro*, evidenciaram a capacidade de *Y. enterocolitica* em induzir apoptose também em células dendríticas, indicando a YopP como importante fator de indução dessas mortes (Erfurth et al., 2004). Kramer e Wiedig (2005), em estudo *in vitro* com uma amostra selvagem (portadora do plasmídeo de virulência) e uma amostra mutante para YopP de *Y. enterocolitica*, concluíram que a porcentagem de células dendríticas mortas após as distintas infecções, foi 50% maior nos animais inoculados com a bactéria selvagem,

ou seja, aquela portadora do gene para expressão de YopP, indicando o papel dessa proteína na indução da apoptose

O controle da infecção por espécies de *Yersinia* enteropatogênica inicia-se com a primeira linha de defesa do sistema imune, envolvendo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células NK (Autenrieth et al., 1994). Subseqüentemente, uma importante resposta imune adaptativa é requerida para combater a infecção, sendo que a sua resolução está associada à ativação de células Th1 (Autenrieth et al., 1994). Desse modo, o balanço entre as citocinas produzidas por células Th1 e Th2 pode alterar a evolução da infecção. As respostas induzidas por células Th1 são importantes para eliminação da *Yersinia*, mediando recuperação e imunidade à bactéria; em oposição, as respostas mediadas por células Th2 estão relacionadas com a suscetibilidade à infecção (Autenrieth et al., 1994; Bohn e Autenrieth, 1996).

As células Th1 secretam IFN- γ , IL-2 e TNF- α , são responsáveis pela geração de uma resposta imune celular, incluindo a ativação de macrófagos. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, desencadeiam uma resposta imune humoral, ativação de eosinófilos e propriedades antiinflamatórias (Munder et al., 1999).

Diferentes linhagens de camundongos desenvolvem respostas distintas na presença de microrganismos patogênicos. Camundongos C57BL/6 apresentam um fenótipo de resistência frente à infecção por *Yersinia*, onde se observa produção de elevados níveis de IFN- γ . Em contraste, camundongos BALB/c exibem um perfil de suscetibilidade, com produção elevada de IL-4 (Bohn e Autenrieth, 1996).

Algumas citocinas, especialmente a IL-10, podem regular negativamente a resposta inflamatória. Durante a yersiniose, IL-10 parece agir antagonicamente a IL-12, aumentando a suscetibilidade de camundongos BALB/c (Bohn e Autenrieth, 1996).

2.2 Células dendríticas e a sua função na resposta imune

A modulação das respostas dos linfócitos T está diretamente relacionada com o reconhecimento e apresentação dos antígenos. APCs são responsáveis por capturar patógenos e apresentar seus antígenos para linfócitos T, fornecendo os sinais necessários para sua expansão e diferenciação (Ueno et al., 2007).

As células dendríticas são o principal grupo de APCs, encontradas em quase todos os tecidos periféricos, bem como em órgãos linfóides primários (timo e medula óssea) e secundários (linfonodos, PP e baço) e circulando no sangue (Guermontprez et al., 2002).

Desempenham papéis importantes em toda a resposta imune, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, como liberação de IFNs tipo I no combate à replicação viral, regulação da resposta Th e apresentação de antígenos às células T (Pulendran, 2005).

As células dendríticas humanas são leucócitos derivados de células progenitoras da medula óssea, originadas de 2 linhagens, mielóide e linfóide (Banchereau et al., 2000; Shortman e Liu, 2002, Heath e Carbone, 2009). Células dendríticas derivadas de linhagens distintas diferem na sua distribuição tecidual, produção de citocinas e condições de crescimento (Adams et al., 2005, Heath e Carbone, 2009).

A linhagem mielóide, caracterizada por expressar CD11c e pouco CD123, dá origem às células dendríticas convencionais ou “mielóides”, dentre elas: células de Langerhans (LCs), células dendríticas intersticiais (IDCs) e células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (Szabolcs et al., 1996; Gatti et al., 2000). As moDCs podem ser encontradas em órgãos linfóides periféricos e na circulação sanguínea, onde produzem grandes quantidades de TNF- α em resposta a patógenos e outras causas de inflamação (Rossi e Young, 2005).

As LCs e IDCs estão distribuídas em locais do organismo onde ocorre o primeiro encontro do antígeno com os mecanismos efetores do sistema imune. Assim, as LCs estão presentes na superfície epitelial da pele e mucosas, e as IDCs nos tecidos subepiteliais da derme e interstício de órgãos sólidos (Rossi e Young, 2005).

Células dendríticas “mielóides” são ainda subdivididas em subpopulações, porém informações precisas sobre as funções de cada subpopulação são obscuras (Heath et al., 2004). No baço murino duas principais populações de células dendríticas podem ser encontradas, CD11c⁺ CD8- α ⁺ e CD11c⁺ CD11b⁺. As distintas subpopulações diferem na produção de citocinas, sendo que células CD11b⁺ secretam maiores quantidades de IL-12 (Maldonado-Lopez et al., 2001), têm capacidade de capturar células apoptóticas e habilidade para apresentação cruzada de antígenos, onde peptídeos derivados de antígenos exógenos associam-se a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I (Jung et al., 2002; Heath et al., 2004). A linhagem linfóide, por sua vez, é precursora das células dendríticas plasmocitóides, reconhecidas por não expressarem CD11c e possuírem elevada expressão de CD123 (Grouard et al., 1997). Células dendríticas plasmocitóides são células importantes na imunidade inata antiviral e na autoimunidade. Encontradas no sangue e órgãos linfóides, são células produtoras de IFNs α e podem estar associadas a respostas imunes antitumorais (Adams et al., 2005).

Quando expostas aos produtos microbianos, as células dendríticas sofrem maturação e migram para órgãos linfóides secundários, locais de ativação de células T (Niess e

Reinecker, 2006). Células dendríticas utilizam diversos mecanismos para capturar os antígenos, como fagocitose, endocitose e pinocitose. As proteínas dos antígenos são processadas em peptídeos e apresentadas na superfície celular ligada a moléculas do MHC de classe I ou II, onde serão reconhecidas por células T antígeno-específicas (Adams et al., 2005). Antígenos adquiridos no ambiente extracelular são tipicamente processados e apresentados associados às moléculas de MHC de classe II, enquanto moléculas de MHC de classe I associam-se a antígenos presentes no compartimento citosólico (Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Ackerman et al., 2005).

O processo de maturação das células dendríticas estimula numerosas propriedades imunogênicas, como expressão de moléculas co-estimuladoras, secreção de citocinas e apresentação de antígenos (Scandella et al., 2002; Mailliard et al., 2004), que maximizam sua habilidade em produzir ativação e proliferação de linfócitos T (Granucci et al., 2005). Em contraste, na ausência de inflamação, as células mantêm-se no estágio imaturo, não sendo capazes de ativar efetivamente a resposta imune adaptativa, conduzindo a anergia das células T, mecanismo responsável pelo estabelecimento da tolerância periférica (Steinman et al., 2003).

Produtos microbianos constituem uma forma fisiológica de ativação das células dendríticas (Kadowaki et al., 2001). Assim como outras APCs, as células dendríticas expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que interagem com um limitado repertório de padrões moleculares conservados, denominados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), presentes em produtos microbianos e moléculas do tecido hospedeiro lesado (Ueno et al., 2007). Dentre esses receptores estão os TLRs. A interação com os diferentes ligantes de TLRs estimula a maturação das células dendríticas e induz a secreção de citocinas, modulando a ativação da resposta imune adaptativa de acordo com as interações microbianas.

Outro grupo de PRRs expressos por células dendríticas são os receptores de lectina tipo C, os quais interagem com carboidratos de glicoproteínas de antígenos próprios e alguns patógenos, que exploram essa interação para inibir a ativação da resposta imune mediada por células T. Células dendríticas residentes ou não ativadas expressam elevados níveis de receptores de lectina tipo C, enquanto células dendríticas ativadas e maduras têm baixa expressão (Ebner et al., 2004). Desse modo, TLRs e receptores de lectina tipo C estão envolvidos com o balanço entre tolerância imunológica e ativação celular (Hawiger et al., 2001; Liu et al., 2002).

Pesquisas demonstraram que a infecção *in vitro* de células dendríticas humanas com *Y. enterocolitica* determina uma regulação negativa transitória das moléculas de classe II do MHC e de moléculas CD80, acompanhada por uma capacidade diminuída de ativação de célula T (Schoppet et al., 2000). Posteriormente, Erfuth et al. (2004), utilizando um modelo de infecção *in vitro*, demonstraram que *Y. enterocolitica* pode afetar várias funções importantes de células dendríticas de camundongos, incluindo maturação e produção de citocinas, além de induzir a apoptose.

As células dendríticas são capazes de orientar a diferenciação dos linfócitos T por meio de suas citocinas secretadas (Ueno et al., 2007). Identificar quais citocinas estão sendo liberadas para diferenciação de determinadas subpopulações de linfócitos T, durante infecção por *Yersinia pseudotuberculosis*, permite melhor compreender o processo de ativação das células T, e assim, criar estratégias para manipulação da resposta imune visando combater a infecção.

2.3 Subpopulações de linfócitos Th17 e Treg na imunidade antimicrobiana

A imunidade a microrganismos depende da função de numerosos tipos celulares e seus produtos secretados. O desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, com ativação e diferenciação de linfócitos T antígeno específicos, é essencial para a defesa contra agentes infecciosos. Recentemente, estudos têm discutido o papel de subpopulações de linfócitos T, distintas de Th1 e Th2, no controle de processos infecciosos e eliminação de patógenos.

Nesse contexto, uma subpopulação de linfócitos T, denominada Th17, surge demonstrando influenciar a imunidade antimicrobiana, atuando principalmente contra bactérias extracelulares e fungos (Stockinger e Veldhoen, 2007). Os primeiros relatos sobre o papel da subpopulação Th17 ocorreram em 2005 em pacientes portadores de encefalomielite autoimune experimental (Park et al., 2005, Harrington et al., 2005), modificando o paradigma da diferenciação de células T CD4+ apenas em subpopulações Th1 e Th2.

Subsequentes estudos mostraram que a citocina denominada fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), anteriormente relacionada com a supressão da resposta imune, possui importante papel na indução de células Th17. Na presença de IL-6, TGF- β estimula a expressão de um fator de transcrição chamado “retinoic acid receptor-related orphan receptor” (ROR γ t), identificado como regulador do desenvolvimento da subpopulação Th17.

(Ivanov et al., 2006) Desse modo, dependendo do microambiente inflamatório TGF- β pode estimular uma resposta pró-inflamatória ou imunossupressora (Mangan et al., 2006, Carrier et al., 2007, Manel et al., 2008).

Enquanto o desenvolvimento de células Th17 está relacionado à presença de IL-6 e TGF- β , a manutenção das funções efetoras desta subpopulação de linfócitos T envolve o papel de outra citocina, chamada IL-23. Produzida por células da imunidade inata, principalmente células dendríticas, IL-23 é responsável pela expansão e manutenção da subpopulação Th17, além de recrutar este tipo celular para sítios inflamatórios (Stockinger e Veldhoen, 2007, Ahern et al., 2010). Células T naive não possuem receptores para IL-23, sua expressão é induzida após diferenciação em células Th17 (Louten et al., 2009), indicando que o papel de IL-23 se restringe ao suporte da subpopulação Th17 ativada, sendo que a ausência de IL-23 diminui o potencial inflamatório de células Th17. (Torchinsky e Blander, 2010).

Posteriormente, outra citocina, IL-21, foi identificada com função na diferenciação de células Th17. Em camundongos deficientes de IL-6, IL-21 tem a capacidade de regular positivamente a expressão de ROR γ t, promovendo a diferenciação em células Th17 (Korn et al., 2007). APCs não apresentam expressão de IL-21, sendo este mediador produzido por células NK e linfócitos T ativados, inclusive células Th17, (Parrish-Novak et al., 2000) sugerindo uma regulação autócrina da subpopulação Th17. Estudo indica que a IL-21 pode também estar relacionada com a manutenção de células Th17 de memória (Korn et al., 2007).

Durante a resposta imune Th17, células produtoras de IL-17A (também conhecida apenas como IL-17) e IL-17F são identificadas. Ambas as citocinas pertencem à família IL-17 e possuem propriedades pró-inflamatórias. IL-17A e IL-17F atuam sobre outros tipos celulares induzindo a expressão de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e quimiocinas (CXCL1, CXCL8, CXCL10), e recrutam neutrófilos para os sítios inflamatórios (Cua e Tato, 2010).

Outra importante citocina produzida por células Th17 é a IL-22. Células imunes não possuem receptores para IL-22, sendo assim este mediador tem importante função na manutenção da integridade das barreiras epiteliais durante a resposta inflamatória por regular a inflamação tecidual em células não imunes, como células epiteliais (Torchinsky e Blander, 2010). O bloqueio de IL-22 resulta em aumento da suscetibilidade a patógenos entéricos, indicando um papel para a citocina na imunidade das mucosas (Zheng et al., 2008).

Diferentes mediadores regulam negativamente a diferenciação de células Th17. Células da imunidade inata são capazes de produzir IL-27, um membro da família da citocina IL-12, que bloqueia a diferenciação Th17 por inibir diretamente a expressão de ROR γ t, além de estimular a produção de IL-10 por células T ativadas (Torchinsky e Blander, 2010). É conhecido que a citocina IL-10 pode controlar a resposta de ambas subpopulações Th1 e Th17. Estudo mostra que células T CD4⁺ produtoras de IL-17 expressam receptores para IL-10 (Huber et al., 2011), sugerindo um mecanismo direto mediado por IL-10 para supressão da resposta de células Th17. Em adição, é conhecido que algumas células da subpopulação Th17 têm a capacidade de produzir IL-10, podendo ser considerado um mecanismo de autorregulação para limitar os danos causados pela resposta inflamatória exacerbada (Torchinsky e Blander, 2010).

Células Th17 são uma subpopulação com elevada plasticidade fenotípica e funcional. A presença de células Th17 IFN- γ ⁺, IL-4⁺ ou Foxp3 (“forkhead box P3”)⁺ já foram reportadas em diferentes doenças, como asma, inflamação e câncer (Wilke et al., 2011). Estudos mostram que células produtoras de IL-17 poderiam ser repolarizadas em fenótipos Th1 ou Th2 na presença de IL-12 ou IL-4, respectivamente (Lexberg et al., 2008), ou ainda células Treg estimuladas com IL-6 poderiam alterar seu fenótipo e produzirem IL-17 (Xu et al., 2007). Assim, a diferenciação em células Th17 estaria fortemente relacionada com as citocinas secretadas no microambiente inflamatório.

Várias funções já foram descritas para células Th17. Desde sua identificação as células Th17 são associadas à patogênese de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, esclerose múltipla e psoríase. A supressão da ativação da subpopulação Th17 e o bloqueio das citocinas relacionadas a este tipo celular têm sido testados para auxiliar o tratamento de pacientes com doenças autoimunes, objetivando a redução do processo inflamatório por inibição de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Krueger et al., 2007).

Células Th17 podem ainda estar relacionadas com a imunidade antitumoral, porém contribuindo tanto para a imunidade protetora, especialmente em pacientes com tumores epiteliais, quanto podem estar relacionadas com a evolução de tumores, como em pacientes com câncer de colón associado à colite e carcinoma hepatocelular associado a hepatites, por aumentar o processo inflamatório (Wilke et al., 2011).

Respostas imunes protetoras e patológicas têm sido descritas relacionando células Th17 e doenças infecciosas. Em infecções causadas por bactérias extracelulares e fungos, a resposta imune desenvolvida por células Th17 aparece como importante mediador da defesa hospedeira, principalmente por induzir a secreção de peptídeos antimicrobianos nas células

epiteliais e sinalizar o recrutamento de neutrófilos. (Van de Veerdonk et al., 2009) Células T produtoras de IL-17 já mostraram influenciar no controle de infecções como *Helicobacter pylori* (Algood et al., 2009), *Citrobacter rodentium* e *Klebsiella pneumoniae*, mostrando função no recrutamento de neutrófilos e células B para o sítio da infecção (Korn et al., 2009).

Em infecções virais e parasitárias, o papel da resposta imune Th17 é pouco claro. Relatos apontam que células Th17 podem ser prejudiciais nesses casos por inibir a apoptose de células infectadas por vírus ou estimular a inflamação persistente em infecções com helmintos (Van de Veerdonk et al., 2009).

Existe carência de estudos sobre o papel da subpopulação de linfócitos Th17 na infecção por *Yersinia enterocolitica*. Dados recentes demonstram que a citocina IL-17 pode desempenhar um importante papel na imunidade protetora contra *Y. pestis*, indicando uma possível função da subpopulação de linfócitos Th17 na defesa contra as espécies patogênicas de *Yersinia* (Jr-Shiuan et al., 2011).

A eficácia da imunidade adaptativa contra patógenos não depende apenas do desenvolvimento de uma resposta imune pró-inflamatória. Outras subpopulações de células T contribuem para minimizar os danos causados pelos mecanismos efetores das reações inflamatórias. Estas células, denominadas Tregs, possuem funções regulatórias e atuam contra componentes do sistema imune (Suvas e Rouse, 2006).

Células Tregs desempenham um papel indispensável na manutenção da irresponsividade a antígenos próprios e na supressão de respostas imunes deletérias ao hospedeiro (Sakaguchi et al., 2008), sendo encontradas nos tecidos do organismo e órgãos linfoides periféricos mesmo na ausência de inflamação (Sather et al., 2007). Células Treg humanas foram primeiramente caracterizadas como células T CD4⁺CD25⁺ (Ng et al., 2001). Posteriormente, Foxp3 foi descrito como o principal gene que regula o desenvolvimento e função desta subpopulação (Hori et al., 2003, Fontenot et al., 2003).

As células Treg originadas no timo são denominadas células Treg naturais e expressam elevados níveis de Foxp3 e receptor de IL-2 (CD25) (Daniele et al., 2011). A presença de CD25 na superfície das células Treg promove um controle das respostas imunes por secreção desta citocina. Portanto, IL-2 produzida por células T ativadas contribui tanto para diferenciação de células T CD4⁺ e expansão de células T de memória e células NK, quanto para estimulação da subpopulação Treg (Sakaguchi et al., 2008). O desenvolvimento de células Treg naturais é essencialmente citocina independente e acontece após interação do

TCR com complexo MHC de classe II e peptídeos próprios expressos no estroma tímico (Daniele et al., 2011).

Outra subpopulação de células Treg, chamadas células Treg induzidas, tem origem no timo como células T CD4⁺ e diferenciam-se em células Treg após exposição a um antígeno, na presença de sinais específicos como IL-10 e TGF- β . (Suvas e Rouse, 2006; Daniele et al., 2011). Dentre os componentes dessa subpopulação estão as células T regulatórias 1 (Tr1), secretoras de IL-10 e células T auxiliares 3 (Th3) produtoras de TGF- β (O'Garra e Vieira 2004).

A função de células Treg ainda pode ser potencializada na presença de TNF- α , através da ligação desta citocina pró-inflamatória com o TNFR2 altamente expresso na superfície da subpopulação de linfócitos Treg (Campbell e Koch, 2011), sugerindo um mecanismo de controle da resposta imune inflamatória.

Vários estudos têm relatado a contribuição de diferentes moléculas na função supressora das Tregs (Yamaguchi et al., 2011), porém a importância e o papel preciso de cada molécula não estão claros. A diferenciação de células T naive em células T efetoras pode ser suprimida por células Treg através da privação de sinais de ativação. A proteína CTLA-4 ("Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4"), altamente expressa nas células Treg, compete com a molécula CD28, presente nas células T convencionais, pelo sítio de ligação com as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 durante a ativação da resposta imune adaptativa (Yokosuka et al., 2010). A ausência de sinalização por falta de interação entre CD28 e as moléculas co-estimuladoras impede a ativação das células T convencionais e ainda, a ligação do CTLA-4 pode induzir a conversão de células T naive em células T Foxp3⁺, processo dependente de TGF- β (Zheng et al., 2006).

Estudo indica que a imunossupressão mediada por células Treg CD4⁺ CD25⁺ exige o contato direto entre células e ocorre através da interação de TGF- β presente na superfície celular de células Treg e TGF- β R nas células alvo (Nakamura et al, 2011). Deficiências na sinalização de TGF- β conduzem a doenças linfoproliferativas similares àquelas observadas em camundongos deficientes de células Treg Foxp3⁺ (Yamaguchi et al., 2011).

Em ambientes inflamatórios, como nos casos de infecção microbiana, células Treg adquirem a capacidade para destruir ou inativar células T efetoras e APCs, através de granzima/perforina e produção de IL-10, reduzindo a resposta inflamatória exacerbada. IL-10 também pode estimular a diferenciação de células T CD4⁺ naive em células produtoras de IL-10 (Yamaguchi et al., 2011).

A plasticidade fenotípica e funcional de células Treg é pouco conhecida. Zhou et al. (2009) reportou que células Treg podem diminuir a expressão de Foxp3 e adquirir a capacidade de produzir citocinas como IFN- γ , sugerindo que o microambiente pode influenciar nas funções deste tipo celular.

Estudos demonstram que células Treg podem modular a resposta imune adaptativa, podendo causar consequências benéficas ou destrutivas ao hospedeiro. Células Treg aparecem em grande número no sítio tumoral e linfonodos drenantes de pacientes portadores de diversos tumores, como trato gastrointestinal, pulmão e fígado. Entretanto, células Treg podem suprimir a resposta imune antitumoral, contribuindo para evolução da patologia (Nishikawa et al., 2010). Por outro lado, a deficiência de células Treg tem sido associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes, incluindo esclerose múltipla, artrite reumatóide e diabetes tipo I (Viglietta et al., 2004; Ehrenstein et al., 2004; Lindley et al., 2005;).

No caso de processos infecciosos, células Treg parecem conter os danos causados pela inflamação. A depleção de células Treg CD4⁺ CD25⁺ em camundongos infectados com *H. pylori* conduz a aumento da resposta imune à bactéria, porém eleva a inflamação gástrica, prejudicial ao hospedeiro (Raghavan et al., 2003).

Existe deficiência de estudos sobre o papel das células Treg na yersiniose. Um único estudo relaciona a depleção de células T CD25⁺ com aumento da suscetibilidade à infecção por *Yersinia* enteropatogênica, indicando a importância da desta subpopulação no controle da fase aguda da infecção do trato gastrointestinal (Zhong et al., 2010).

A infecção por *Y. pseudotuberculosis* pode influenciar a resposta de linfócitos T e células dendríticas, sendo que, as alterações observadas nessas células podem prejudicar a resolução da infecção. Estudos adicionais são necessários para identificar a contribuição destes tipos celulares na evolução da infecção.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel de distintas subpopulações de linfócitos T e a influência de células dendríticas no desenvolvimento da resposta imune contra a infecção por *Y. pseudotuberculosis*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a secreção de citocinas (IL-6, IL-12, IL-10, IL-23, TNF- α , TGF- β) por células dendríticas pulsadas com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*.

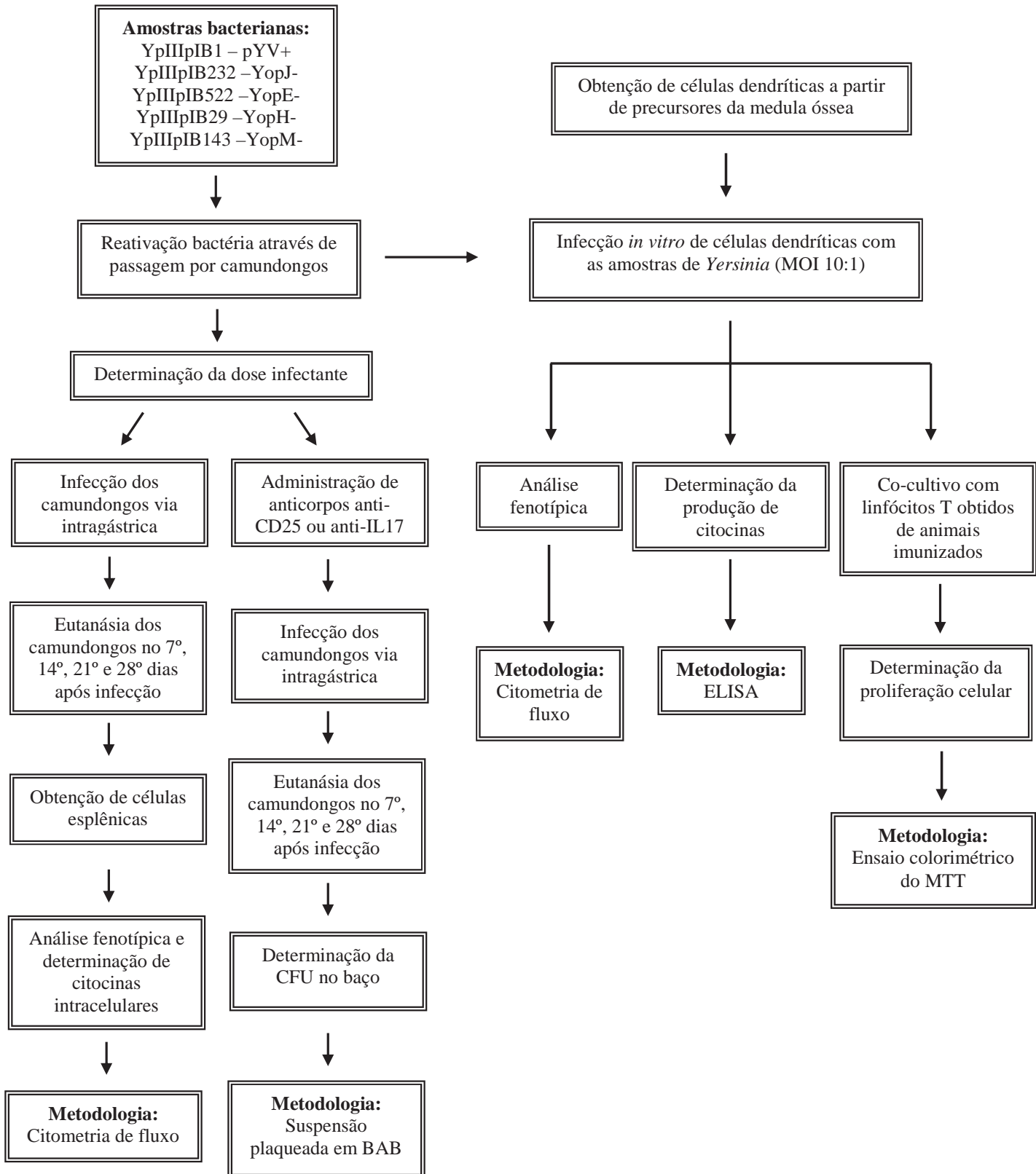
- Determinar a capacidade de células dendríticas pulsadas com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* ativar ou não linfócitos T provenientes de animais imunizados com os antígenos bacterianos.

- Avaliar a expressão de citocinas intracelulares (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α , TGF- β) por linfócitos T de camundongos infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*.

- Analisar fenotipicamente as subpopulações linfócito T presentes no baço de animais infectados ou não com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*

4. Material e métodos

4.1 Fluxograma de experimentos



4.2 Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6, SPF (“Specific Pathogen Free”), com idade entre 6 e 8 semanas, adquiridas do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP). Após a retirada das condições originais (SPF), os animais foram transportados em mini-isoladores e alojados no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, onde foram mantidos em isoladores, com acesso à ração e água esterilizadas em autoclave a 120°C por 15 minutos. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo ao Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (CEP/FCF/CAr 04/2009).

4.3 Amostras bacterianas

Yersinia pseudotuberculosis YPIIIpIBI (portadora do plasmídeo de virulência) e diferentes amostras deficientes para determinados fatores de virulência Yop: YpIIIpIB232 (YopJ-), YpIIIpIB143 (YopM-), YpIIIpIB29 (YopH-), YpIIIpIB522 (YopE-). Amostras cedidas gentilmente pelo Dr. Hans Wolf-Watz do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Umea, Suécia, e estocada a -80°C, em TSB (“Tryptic Soy Broth”) e glicerol.

4.4 Infecção experimental dos animais

4.4.1 Reativação da amostra de *Yersinia pseudotuberculosis*

Previamente à inoculação dos animais, a amostra bacteriana foi reativada através da passagem em camundongos. Para tanto, uma alçada da amostra em estoque foi semeada em meio TSB (“Tryptic Soy Broth”), incubada a 25°C por 24 horas e, posteriormente, plaqueada em meio BAB (“Blood Agar Base”) e incubada novamente a 25°C durante 48 horas, para a obtenção de crescimento bacteriano e preparo de uma suspensão contendo 10^{10} UFC/mL, padronizada em escala 3 de Mac Farland e apresentando densidade ótica igual a 0,36 em 550 nm, ajustada com auxílio de espectrofotômetro (Du^R 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer – BECKMAN). A partir dessa suspensão, foi preparada uma suspensão a 10^8 UFC/mL para inoculação de 2 camundongos por via intravenosa (0,2 mL de suspensão bacteriana). Decorrido um período de 24 horas da inoculação, os animais foram eutanasiados, seus baços retirados e macerados em 1 mL de solução estéril de NaCl 0,85%.

O produto resultante dessa maceração foi semeado em meio de cultura BAB e incubado a 25°C por 48 horas. A partir deste crescimento foi preparado o inóculo para os experimentos.

4.4.2 Determinação da dose infectante

Para determinar a dose infectante de cada amostra bacteriana usada neste trabalho, grupos de cinco camundongos foram inoculados por via intragástrica com três suspensões de diferentes concentrações e observados por um período de trinta dias. O crescimento bacteriano obtido no meio de cultura BAB, devidamente reativado, foi ressuspenso em solução salina 0,85% estéril e padronizado em espectrofotômetro a 550nm, conforme já descrito. A partir da suspensão contendo 10^{10} UFC/mL foram feitas diluições do inóculo a fim de se ajustar o número de UFC/mL a serem inoculadas. Grupos de 5 camundongos foram inoculados por via intragástrica com cada uma das diluições a serem testadas (três diluições de cada amostra) baseadas em dados da literatura (Mecses et al., 2001) e observados diariamente por um período de 30 dias. O número de mortes dentro deste intervalo foi devidamente anotado.

Para a amostra portadora do plasmídeo de virulência foram testadas as concentrações de 10^9 , 10^8 ou 10^7 CFU/mL. Após o período de observação, foi possível escolher a concentração de 10^8 CFU. Para a determinação da dose infectante das amostras mutantes os camundongos foram inoculados com suspensões bacterianas contendo 10^9 , 10^8 ou 10^7 UFC/mL.

4.4.3 Preparo do inóculo

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

4.4.4 Esquema de infecção

Lotes de 4 animais por grupo de experimento foram infectados por via intragástrica com a amostra de *Yersinia pseudotuberculosis* YpIIIpIB1 e as mutantes deficientes para os fatores de virulência, mantendo-se o mesmo número de animais não infectados como controle. Grupos de animais infectados e controles foram eutanasiados e os baços obtidos (em condições assépticas) no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção.

4.5 Preparo do Antígeno de *Yersinia* – HKY (“Heat-killed *Yersinia*”)

As amostras bacterianas foram cultivadas como descrito anteriormente, mortas pelo calor através de incubação a 60°C por 1 hora, coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com PBS (“Phosphate-Buffered Saline”), pH 7,2, e ressuspensa no mesmo. Estas suspensões bacterianas foram congeladas e posteriormente liofilizadas para que, na forma de pó, fosse possível a sua utilização.

Os antígenos liofilizados das amostras bacterianas foram utilizados no processo de imunização dos camundongos, possibilitando a obtenção de linfócitos T antígeno específicos.

4.6 Diferenciação de células dendríticas a partir de precursores de Medula Óssea

As células dendríticas foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea isolados de fêmur e tíbia dos animais segundo protocolo descrito por Malowany et al. (2006). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (“Fetal Bovine Serum” – FBS), 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 50 mM mercaptoethanol, 1 mM piruvato de sódio, 40 pg/ml de GM-CSF (Fator estimulante de colônias granulocítica e monocítica) (para diferenciação de células dendríticas) recombinante murino (BD Pharmigem). Três e cinco dias após a cultura inicial, o meio da cultura foi trocado e suplementado com GM-CSF. No sexto dia, 1×10^6 células dendríticas foram cultivadas com *Y. pseudotuberculosis* durante 24h horas para captura dos antígenos.

Células dendríticas foram infectadas com as amostras bacterianas de *Y. pseudotuberculosis* utilizadas no estudo (MOI 10:1) por 60 min., em seguida foi adicionado às culturas 100µg/mL de gentamicina, com posterior incubação de 24 horas. Outra parte das células dendríticas obtidas foi cultivada por 24 horas, em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂, na presença de 10 µg/mL de LPS (*Escherichia coli* O111B4 – Sigma), ou mesmo na presença apenas de RPMI-1640. O sobrenadante das culturas foi coletado e armazenado a -80°C para posterior determinação das citocinas secretadas (IL-6, IL-12, IL-10, IL-23, TNF- α , TGF- β).

4.7 Determinação da produção de citocinas por ELISA

A determinação das citocinas foi realizada em sobrenadante de cultura de células dendríticas, utilizando kits comerciais, IL-6, IL-12, IL-10, TNF- α , TGF- β (OptEIA ELISA set, BD PharMingen) e IL-23 (ELISA READY SET GO, eBioscience) seguindo as instruções do fabricante.

Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram adsorvidas com um anticorpo de captura para cada respectiva citocina pesquisada, e incubadas “overnight” à 4°C. As placas foram lavadas com PBS 0,05% Tween-20 e bloqueadas com PBS + 10% de FBS, pH 7.0, e novamente lavadas. Foram adicionados à placa os padrões das diversas citocinas ou o sobrenadante teste, incubadas à temperatura ambiente, e lavadas. Posteriormente, foram adicionados anticorpo de detecção e reagente enzimático em cada cavidade, seguido de incubação e lavagens. Foi, então, adicionado o substrato nas cavidades. A reação foi interrompida adicionando-se solução stop (H₂SO₄ 2N). As absorbâncias foram lidas a 450nm em leitor de ELISA (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div), e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas.

4.8 Quantificação das subpopulações de linfócitos T e determinação do padrão de citocinas através de citometria de fluxo (Morita et al., 1998)

4.8.1 Obtenção de células do baço

Os camundongos do grupo controle e infectados foram eutanasiados em câmara de CO₂, os baços e linfonodos retirados em condições assépticas e macerados em 5 mL de PBS gelado. As suspensões celulares obtidas foram transferidas para tubos de polietileno e lavadas 2 vezes por centrifugação a 350g. Após a centrifugação, as células foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente em cloreto de amônio 0,83% e FBS (3:1) para que ocorra a lise das hemácias. As células foram lavadas com 5 mL de RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 5x10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol, 10 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Em seguida as células foram ressuspendidas em 1 mL RPMI, igualmente suplementado, para contagem do número de células viáveis.

4.8.2 Viabilidade celular

O número de células viáveis presente no baço e linfonodos de cada camundongo foi avaliado através da técnica de exclusão do Azul Trypan. Para isso as células foram diluídas 1:100 no respectivo corante e contadas em Câmara de Neubauer.

4.8.3 Análise fenotípica dos linfócitos

Para cada animal foi preparada uma suspensão contendo 1×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 suplementado. Esta suspensão de células foi usada para realização da análise fenotípica e para detecção intracitoplasmática das citocinas.

Uma parte desta suspensão, destinada à incubação com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular, foi centrifugada a 350g por 5 minutos. O sedimento celular foi solubilizado em solução de PBS contendo 1% de BSA e 1 μ L de Mouse FcBlock (BD PharMingen) foi adicionado a cada tubo. Após incubação de 20 minutos a 4°C iniciou-se a marcação dos antígenos CD3, CD4, CD8. Para isso, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com quantidades saturantes dos anticorpos específicos para cada antígeno.

Ao término desta incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA (350g / 5 minutos) e ressuspendidas em PBS contendo 1% de formol. As células permaneceram na solução de PBS 1% de formol, a 4°C e no escuro até o momento da análise no citômetro de fluxo FACSCanto (BD). As imunoglobulinas isotipo-específicas, não reagentes, marcadas com os mesmos fluorocromos foram utilizadas como controles (isotipo controle). Para análise dos dados foi utilizado o programa FACSDiva (BD).

4.8.4 Determinação da produção de citocinas intracelulares por citometria de fluxo

A suspensão de células destinadas à detecção das citocinas intracitoplasmáticas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ e TGF- β) foi distribuída em uma placa de 24 cavidades. Parte destas células foi estimulada com 25 ng/mL de forbol miristato acetato (PMA) (Sigma) e 1 μ g/mL de ionomicina (Sigma), e a outra parte não recebeu estímulo. As células foram incubadas por 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 10 μ g /mL de brefeldina A (Sigma) a todas as cavidades e a placa foi incubada, nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO₂, por mais duas horas. A brefeldina A foi utilizada para melhorar a análise das citocinas intracelulares devido ao seu efeito inibitório na secreção de proteínas, o que permite um acúmulo das citocinas no complexo de Golgi e conseqüentemente um aumento do sinal detectado pelo citômetro de fluxo. Ao final

do período total de seis horas de incubação, as suspensões de células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1% de BSA (350g / 5 minutos). Foi adicionada às suspensões celulares 1µL da solução Mouse FcBlock. (BD PharMingen) e as células foram incubadas a 4°C por 20 minutos. Terminada esta incubação, as células foram distribuídas nos respectivos tubos de citometria e iniciou-se a marcação das moléculas de superfície. Para isto, foram adicionados os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, marcados com fluorocromos, e incubados por 30 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS 1% BSA (350g / 5 minutos) e ressuspensas em solução CytoFix/CytoPerm (BD PharMingen) a fim de proporcionar a fixação e permeabilização das células. Após uma incubação de 20 minutos a 4°C e ao abrigo da luz, as células foram lavadas com o tampão Perm Wash (BD PharMingen). As células foram ressuspensas em 50µL de Perm Wash e então foram adicionados os anticorpos monoclonais citocina-específicos e anticorpos monoclonais isotipo-controles. Seguiu-se nova incubação a 4°C e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com Perm Wash, em todos os tubos foi adicionado PBS 1% de formol e acondicionados a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo. A análise dos dados foi feita em citômetro FACSCanto usando o programa FACSDiva (BD).

4.9 Avaliação funcional das subpopulações de linfócitos Treg e Th17

4.9.1 Linfócitos Tregs

Para o estudo da subpopulação Treg foi realizado ensaio de depleção *in vivo* de linfócitos com anticorpo purificado anti-CD25 (Biolegend) (Zhong et al., 2010) e posterior determinação do número de CFU no baço dos animais infectados e controles. Camundongos C57BL/6 foram infectados por via intragástrica com amostra de *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência (YpIIIpIB1). Uma semana anterior à infecção, os camundongos começaram a ser tratados com inoculações intraperitoneais de 250µg de anti-CD25, com intervalos de 2 dias, tratamento que manteve-se durante toda cinética de infecção. Grupos de 4 animais infectados e controles foram eutanasiados no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção e seus baços foram retirados em condições assépticas. Parte da suspensão (0,1mL) resultante da maceração do baço foi semeada em meio de cultura BAB e incubada à 25°C por 48 horas. O número de CFU foi determinado após observação do crescimento bacteriano. A depleção foi acompanhada durante todo o período por análises em citômetro de fluxo BD FACsCanto.

4.9.2 Linfócitos Th17

Para o estudo da subpopulação Th17 foi realizado ensaio de neutralização *in vivo* da citocina IL-17 com anticorpo purificado anti-IL-17 (R&D Systems) (Guedes et al., 2010) e posterior determinação do número de CFU no baço dos animais infectados e controles. Camundongos C57BL/6 foram infectados por via intragástrica com amostra de *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência (YpIIIpIB1). Uma semana anterior à infecção, os camundongos iniciaram o tratamento com inoculações intraperitoneais de 100µg de anti-IL-17 com intervalos de 2 dias, realizado durante toda cinética de infecção. Grupos de 4 animais infectados e controles foram eutanasiados no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção e seus baços foram retirados em condições assépticas. Parte da suspensão (0,1mL) resultante da maceração do baço foi semeada em meio de cultura BAB e incubada à 25°C por 48 horas. O número de CFU foi determinado após observação do crescimento bacteriano. A neutralização foi acompanhada por análises em citometro de fluxo BD FACsCanto.

4.10 Análise estatística

As diferenças entre os resultados obtidos nas células dendríticas e subpopulações de linfócitos T foram analisadas através do teste *t* de Student. A variabilidade da bactéria no baço dos camundongos e a expressão de citocinas intracelulares constituíram dados não paramétricos, assim estes dados foram comparados usando o teste Mann-Whitney. As análises foram realizadas utilizando o programa Origin 8.0. As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Dose infectante para as diferentes amostras de *Yersinia pseudotuberculosis*

Após observação dos camundongos inoculados com diferentes doses das amostras bacterianas, foram escolhidas as concentrações indicadas na tabela 1 para a inoculação dos lotes de animais.

Tabela 1: Doses infectantes estabelecidas para as diferentes amostras bacterianas

| Amostra bacteriana | Dose infectante (CFU) |
|----------------------------------|------------------------------|
| YpIIIpIB1 | 10⁸ CFU/mL |
| YpIIIpIB232 (YopJ ⁻) | 10⁹ CFU/mL |
| YpIIIpIB143 (YopM ⁻) | 10⁹ CFU/mL |
| YpIIIpIB29 (YopH ⁻) | 10⁹ CFU/mL |
| YpIIIpIB522 (YopE ⁻) | 10⁹ CFU/mL |

A observação dos sinais de doença e mortalidade durante a determinação das doses infectantes mostrou que a amostra portadora do plasmídeo de virulência é a mais patogênica para os camundongos. Entre as amostras deficientes para as proteínas Yops, YopJ demonstrou ser a mais virulenta.

5.2 Cultura de Células dendríticas com diferentes estímulos

Células dendríticas foram originadas por diferenciação de precursores de medula óssea obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, rendimento de aproximadamente 76±1.8% e 74±2.2% de células CD11c⁺, respectivamente, determinado por citometria de fluxo.

Depois de ajustada a concentração de 10⁶ células/mL, 1 mL da suspensão celular foi adicionada a placas de poliestireno estéreis de 24 cavidades e incubadas por 24 horas, em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂, na presença de diferentes estímulos, representados na tabela 2.

Tabela 2: Diferentes estímulos utilizados na cultura de células dendríticas

| Grupos | Estímulo | Concentração |
|-------------------|---------------------------|------------------------------|
| controle negativo | Somente RPMI-1640 | - |
| controle positivo | LPS | 10 µg/mL |
| Bactérias vivas | YpIIIpIB1 | 10⁷ CFU/mL |
| | YpIIIpIB232 (YopJ) | 10⁷ CFU/mL |
| | YpIIIpIB143 (YopM) | 10⁷ CFU/mL |
| | YpIIIpIB29 (YopH) | 10⁷ CFU/mL |
| | YpIIIpIB522 (YopE) | 10⁷ CFU/mL |

Decorrido o período de incubação o sobrenadante da cultura foi coletado e determinado o número de células viáveis com objetivo de avaliar a ocorrência de morte celular após a infecção. A avaliação mostrou diminuição na quantidade de células dendríticas viáveis em todas as amostras provenientes da infecção com as bactérias vivas. Sendo que, YpIIIpIB1 foi a amostra que provocou maior porcentagem de morte celular, aproximadamente 40% do número total de células comparado com o controle negativo. Em contraste, as células infectadas pela amostra deficiente de YopJ, apresentaram o menor número de células mortas (figura 1).

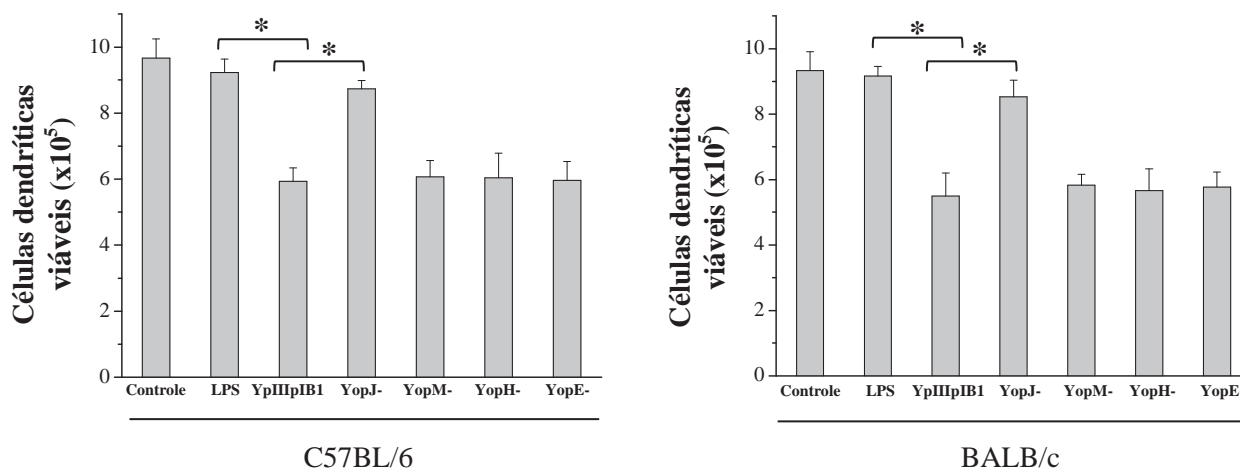


Figura 1 – Viabilidade de células dendríticas após infecção por linhagens de *Y. Pseudotuberculosis*

Células dendríticas de camundongos C57BL/6 e BALB/c foram incubadas com as diferentes amostras de *Yersinia* (MOI 10:1), 10 µg/mL lipopolissacarídeo (LPS) e meio (controle). Antibiótico (gentamicina 100µg/mL) foi adicionado à cultura com bactérias vivas com objetivo de matar todas as bactérias restantes 1 h após a infecção, seguida por 24 h de incubação. O número de células viáveis foi determinado por ensaio de exclusão com azul de trypan. Resultados são representativos de dois experimentos independentes e são apresentados como média ± SD de observações em triplicata. * Significativo a partir de $p < 0,05$

5.3 Produção de citocinas por células dendríticas infectadas com *Y. pseudotuberculosis*

O sobrenadante obtido da incubação das células dendríticas foi utilizado para determinação das citocinas IL-6, IL-12, IL-10, TNF- α , TGF- β e IL-23.

A análise dos resultados mostrou que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* interfere na produção de citocinas por células dendríticas em diferentes linhagens de camundongos. Células dendríticas obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectadas *in vitro*, apresentaram diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF- α) comparadas àquelas ao controle positivo. Enquanto que, observou-se elevação dos níveis de IL-10, mais significativo nas células obtidas dos camundongos BALB/c (Figuras 2 e 3).

A determinação da produção de IL-6 pelas células dendríticas diferenciadas das linhagens C57BL/6 e BALB/c, infectadas com as amostras YpIIIpIB1 e mutantes para as Yops, mostrou que a infecção estimula a produção da citocina de maneira semelhante entre todos os grupos.

Resultados da dosagem de IL-10 indicaram que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB1 induz aumento na produção desta citocina. Os maiores níveis foram encontrados nas células infectadas por YpIIIpIB232 (YopJ-) obtidas dos camundongos BALB/c. A infecção pela bactéria YopM mutante provocou diminuição nos níveis de IL-10 comparado à quantidade produzida por células infectadas com YpIIIpIB1.

A análise dos níveis de IL-12 e TNF- α realizadas nas culturas de células dendríticas infectadas com YpIIIpIB1 mostrou pouca produção das citocinas, significativamente menor que as quantidades produzidas por células cultivadas com o controle positivo (LPS). Células dendríticas infectadas pela amostra bacteriana deficiente de YopJ apresentaram os maiores níveis de IL-12 e TNF- α . A infecção por YpIIIpIB522 (YopE-) resultou em produção significativa de TNF- α .

A determinação da produção de TGF- β após infecção por *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB1, e amostras mutantes para Yop, mostrou produção considerável de TGF- β .

Não houve produção detectável de IL-23 por células dendríticas infectadas pelas diferentes amostras bacterianas utilizadas no estudo.

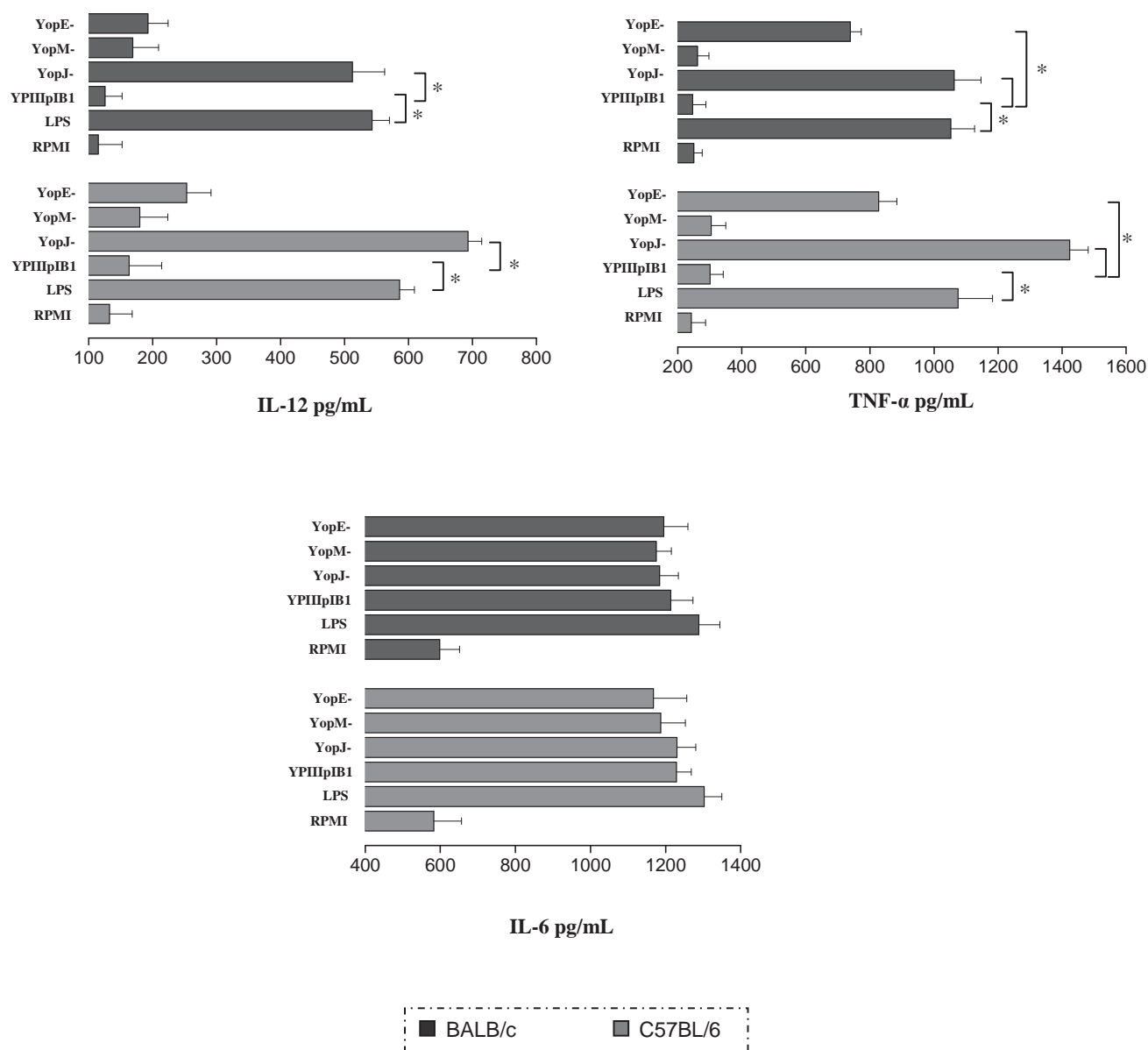


Figura 2 – Produção de citocinas IL-6, IL-12 e TNF- α por células dendríticas após infecção por linhagens de *Y. Pseudotuberculosis*

Células dendríticas de camundongos C57BL/6 e BALB/c foram diferenciados de precursores de medula óssea e infectadas *in vitro* com as diferentes amostras de *Yersinia* (MOI 10:1) ou expostas a 10 μ g/mL lipopolissacarídeo (LPS) ou apenas meio (controle). Antibiótico (gentamicina 100 μ g/mL) foi adicionado à cultura com bactérias vivas com objetivo de matar todas as bactérias restantes 1 h após a infecção, seguida por 24 h de incubação. A produção de citocinas foi determinada em sobrenadante de cultura por ELISA. Resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média \pm SD de observações em triplicata. * Principais diferenças estatísticas são mostradas nos gráficos (p < 0,05).

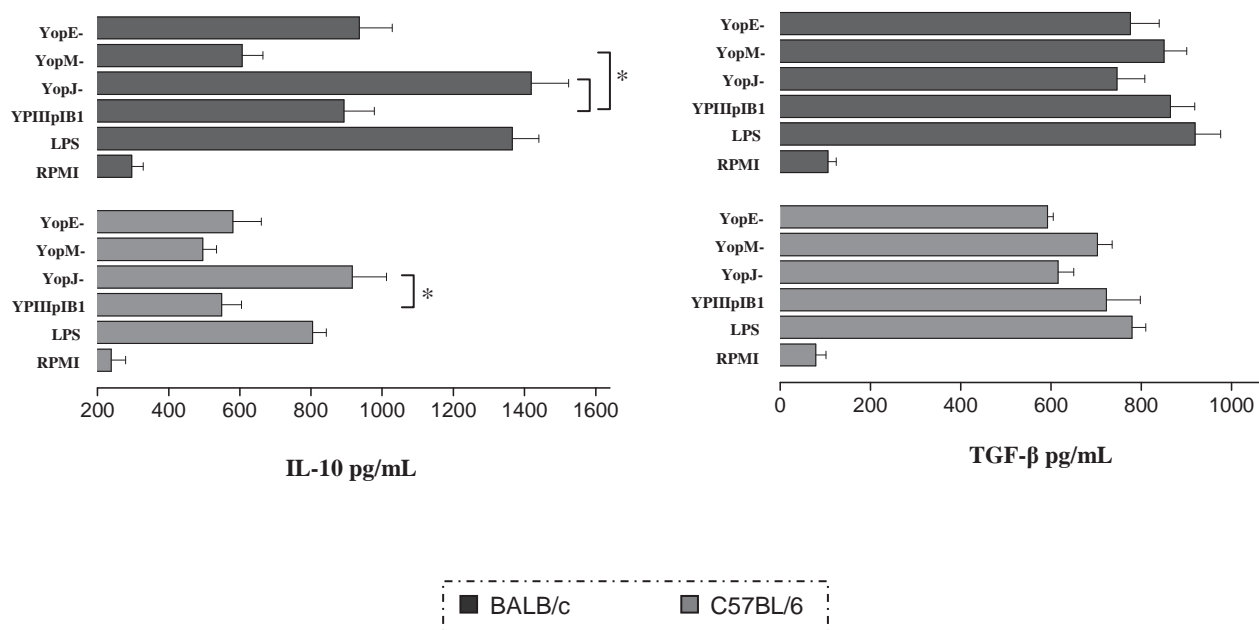


Figura 3 – Produção de citocinas IL-10 e TGF-β por células dendríticas após infecção por linhagens de *Y. Pseudotuberculosis*

Células dendríticas de camundongos C57BL/6 e BALB/c foram diferenciadas de precursores de medula óssea e infectadas *in vitro* com as diferentes amostras de *Yersinia* (MOI 10:1) ou expostas a 10 µg/mL lipopolissacarídeo (LPS) ou apenas meio (controle). Antibiótico (gentamicina 100µg/mL) foi adicionado à cultura com bactérias vivas com objetivo de matar todas as bactérias restantes 1 h após a infecção, seguida por 24 h de incubação. A produção de citocinas foi determinada em sobrenadante de cultura por ELISA. Resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média ± SD de observações em triplicata. * Principais diferenças estatísticas são mostradas nos gráficos (p < 0,05).

5.4 Subpopulações de linfócitos T após infecção por *Y. pseudotuberculosis*

As populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram determinadas no 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias pós-infecção com a amostra YPIIIpIB1 de *Y. pseudotuberculosis* e com as amostras deficientes na secreção da YopJ, YopM, YopH e YopE por citometria de fluxo, conforme esquema ilustrado na Figura 4. Animais não infectados foram utilizados como grupo controle. Os resultados apresentados correspondem aos números absolutos de linfócitos.

A amostra YPIIIpIB1 causou diminuição nas populações analisadas, contudo com redução mais relevante na subpopulação de linfócitos T CD4⁺, em ambas linhagens de camundongos estudadas. Durante a infecção com a amostra YPIIIpIB1 observou-se uma diminuição no número dos linfócitos T CD4⁺ no 14^o e 21^o dias pós-infecção. Os menores valores ocorreram nos camundongos BALB/c. A partir do 28^o dia pós-infecção observou-se elevação na proliferação destas células T. O número de linfócitos T CD4⁺ dos animais infectados com as amostras deficientes para YopM e YopH apresentaram elevações em ambas linhagens de camundongos. Camundongos C57BL/6 mostraram elevações também no número de linfócitos T CD8⁺ (Figura 5).

De maneira geral, a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ foi predominante sobre a população de células T CD8⁺ durante todo período de infecção analisado, fato observado também no grupo não infectado (controle). Células obtidas de camundongos BALB/c apresentaram as maiores reduções após a infecção, contudo também mostraram significativos aumentos no número de linfócitos obtidos dos animais infectados com as amostras mutantes.

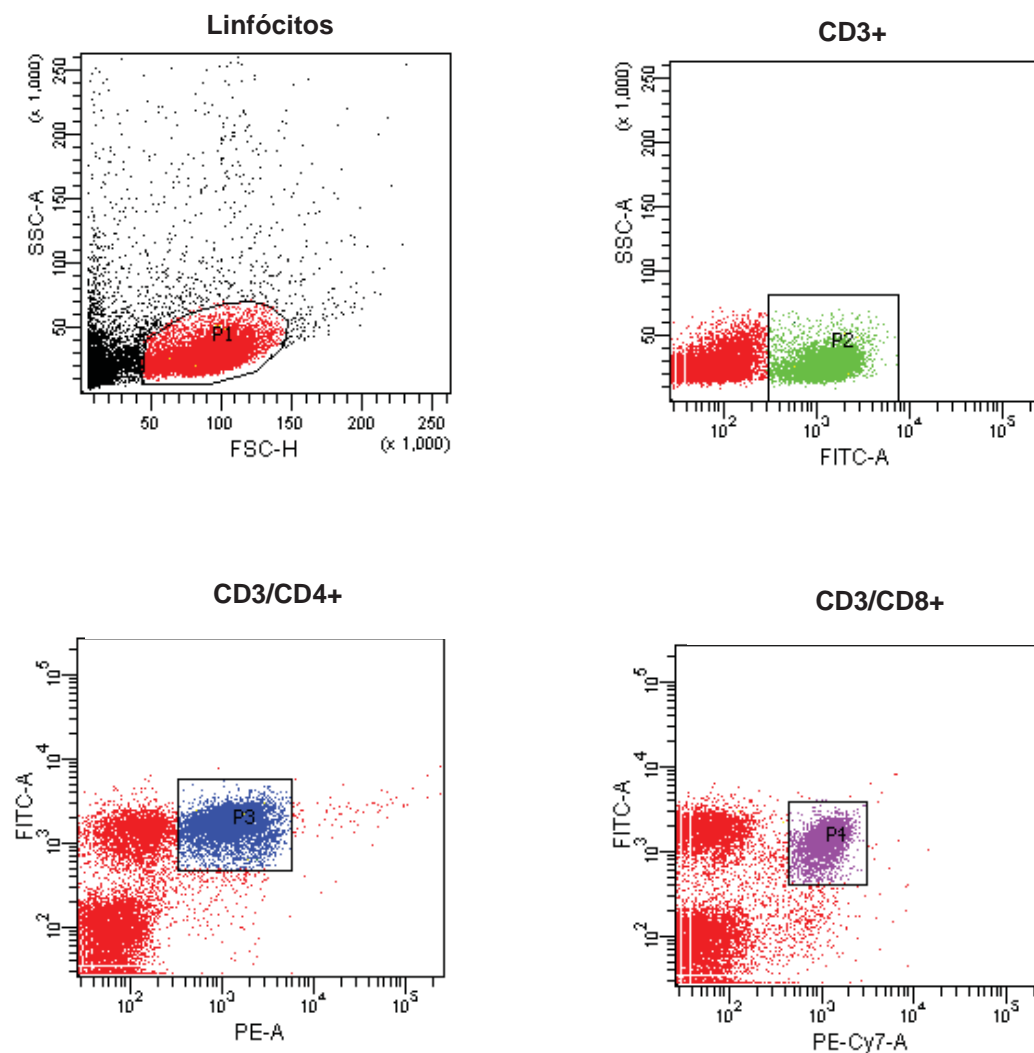


Figura 4 – Representação das subpopulações de linfócitos CD3+, CD3+CD4+ e CD3+CD8+ obtidos por citometria de fluxo

Células esplênicas foram obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6 no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção por amostras de *Yersinia pseudotuberculosis*, e o número de linfócitos CD3, CD4 e CD8 foi determinado por citometria de fluxo utilizando os anticorpos: anti CD3-FITC, anti CD4-PE e anti CD8-PECy7 em citômetro de fluxo FACS Canto, BD.

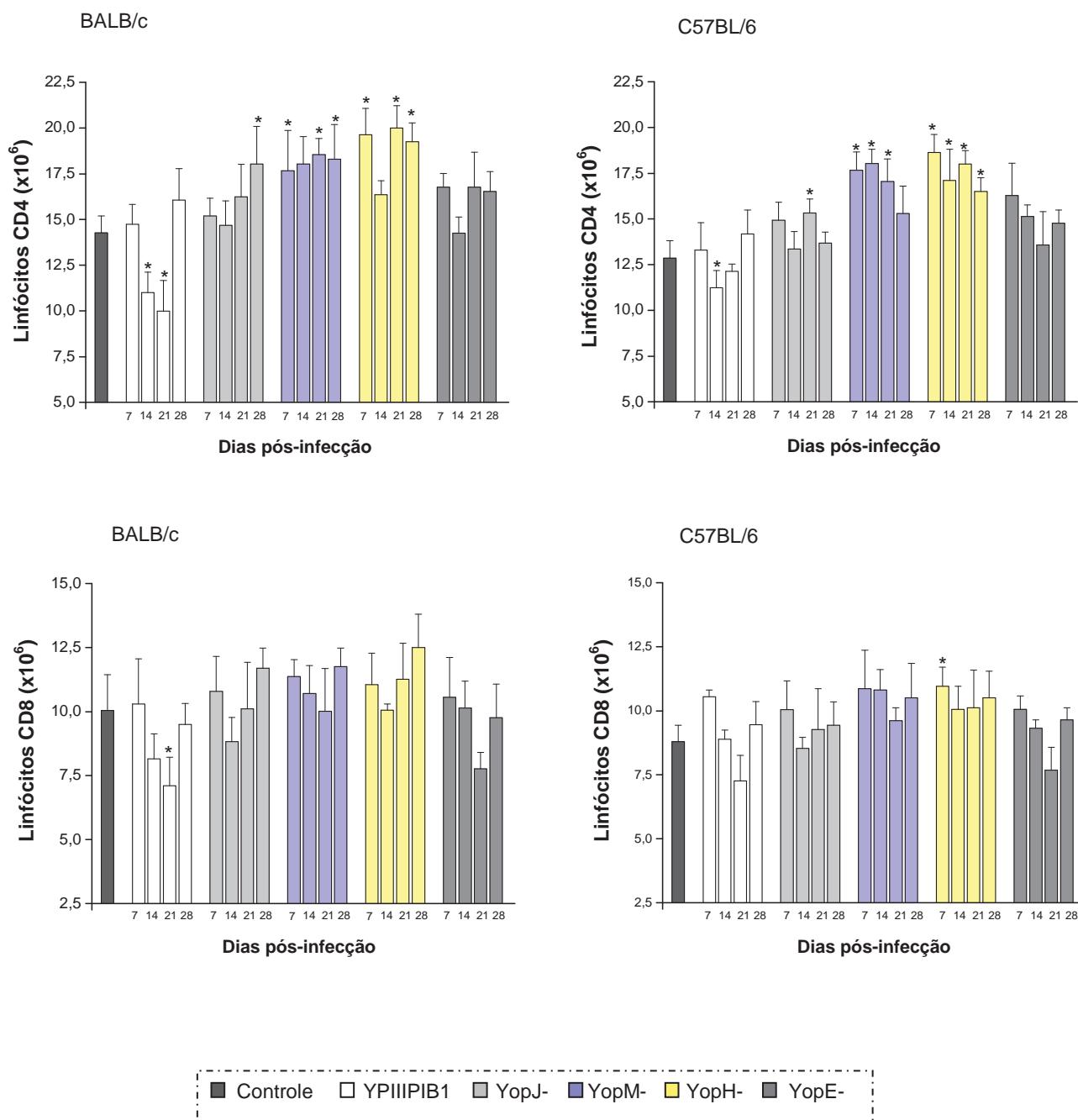


Figura 5 – Determinação das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com amostras de *Y. pseudotuberculosis* e não infectados (controle)

Suspensões celulares foram obtidas do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por amostras de *Y. pseudotuberculosis* e não infectados (controle). O número absoluto de linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+ ($\times 10^6$) foi determinado no 7º, 14º, 21º e 28º dias pós-infecção em ambas as linhagens de camundongos estudadas, através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e apresentados como valores médios do número absoluto + SD. * Significativo em relação ao controle ($p < 0.05$).

5.5 Subpopulação de linfócitos CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ após infecção por *Y. pseudotuberculosis*

Os números absolutos de linfócitos Tregs, obtidos do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6, foram determinados no 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias pós-infecção com a amostra YPIIIpIB1 e com as amostras deficientes na secreção de YopJ, YopM, YopH e YopE, através da metodologia de citometria de fluxo. Animais não infectados foram utilizados como controle.

A amostra YPIIIpIB1 induziu aumento na população analisada a partir do 21^o dia pós-infecção, em ambas linhagens de camundongos estudadas. As amostras YopM- e YopH- mostraram significativo aumento no número de células Treg comparado à infecção pela amostra portadora do plasmídeo de virulência, mais predominante no 14^o, 21^o e 28^o dias pós-infecção (Figura 6).

Camundongos BALB/c infectados com a amostra YPIIIpIB1 apresentaram discreto aumento no número de células Treg na fase inicial da infecção, quando comparados aos camundongos C57BL/6. Contudo, durante o curso da cinética de infecção o número de células Treg encontrado foi semelhante nas duas linhagens.

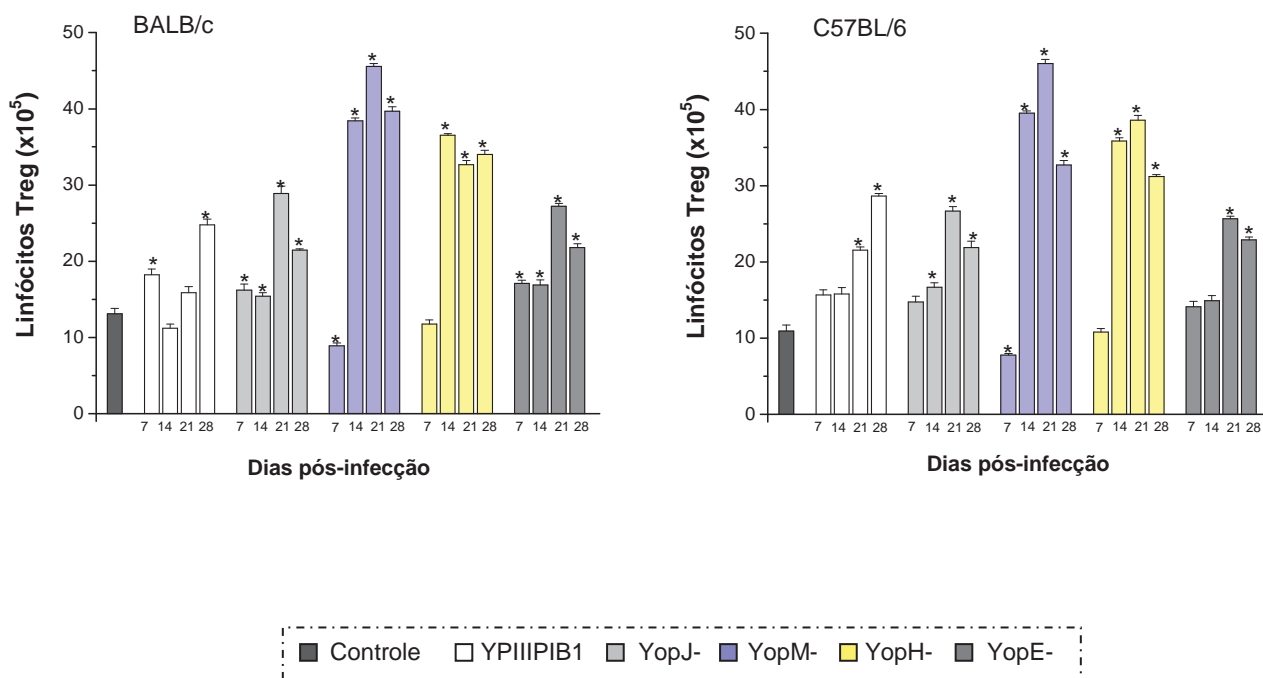


Figura 6 – Determinação das subpopulações de linfócitos CD4+ CD25+ Foxp3+ obtidos do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com amostras de *Y. pseudotuberculosis* e não infectados (controle)

Suspensões celulares foram obtidas do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por amostras de *Y. pseudotuberculosis* e não infectados (controle). O número absoluto de linfócitos CD4+CD25+Foxp3+ ($\times 10^5$) foi determinado no 7º, 14º, 21º e 28º dias pós-infecção, em ambas as linhagens de camundongos estudadas, através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e apresentados como valores médios do número absoluto + SD. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.6 Expressão de citocinas intracelulares por linfócitos T

Suspensões celulares foram obtidas do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com diferentes amostras bacterianas de *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle, ambas estimuladas *in vitro* com PMA e ionomicina. A expressão das citocinas intracelulares nas células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ foi determinada por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados a partir das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) das respectivas citocinas, IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ e TGF- β . As figuras 7-9 mostram os resultados mais relevantes obtidos após as determinações das citocinas.

A infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 por *Y. pseudotuberculosis* YPIIIpIB1 resultou em diminuição nos níveis de IL-2 por células T CD4+, no 14º dia pós-infecção. As amostras deficientes dos fatores de virulência YopM e YopH mostraram aumentos nos níveis de IL-2 no 21º dia pós-infecção, em ambas linhagens de camundongos estudadas. Linfócitos T CD4+ obtidos de camundongos infectados com as amostras YPIIIpIB1 e deficientes de YopJ e YopE apresentaram elevações nas intensidades de fluorescência nos últimos dias da cinética de infecção. Todas as amostras bacterianas estudadas induziram elevações na expressão de IL-2 em células T CD8+ a partir do 14º dia pós-infecção, em camundongos BALB/c e C57BL/6.

Não observamos alterações significativas nos níveis de IL-4 determinados em linfócitos T CD4+ e CD8+ após a infecção com *Y. pseudotuberculosis* YPIIIpIB1 e amostras mutantes. De modo semelhante, a determinação da expressão de IL-10 não mostrou alterações significativas em camundongos BALB/c e C57BL/6. Apenas camundongos BALB/c infectados com amostras deficientes dos fatores YopM, YopH e YopE apresentaram discreta elevação nas determinações de IL-10 no 21º pós-infecção, porém não significativa.

A avaliação da expressão de TNF- α mostrou redução desta citocina nas células T CD4+ dos camundongos infectados com YPIIIpIB1 no 7º e 14º dias pós-infecção, em ambas as linhagens de camundongos analisadas. A análise de TNF- α nos linfócitos T CD8+ também mostrou diminuição na determinação do mediador. O estudo de TNF- α obtido dos animais infectados com as amostras mutantes mostrou reduções apenas no 7º dia pós-infecção. Os maiores aumentos foram observados nas amostras deficientes para YopM e YopH a partir do 21º dia pós-infecção.

A determinação da MIF de IFN- γ reforçou os relatos de que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* suprime a produção desta citocina em linfócitos T CD4+, e ainda,

mostra a menor influência sobre as células T CD8+. A expressão de IFN- γ das células T CD4+ apresentou diminuição no 14º dia pós-infecção em todas as amostras bacterianas estudadas, em ambas as linhagens de camundongos. Com a evolução da infecção os níveis da citocina foram elevando-se. Células T obtidas de animais infectados com as amostras YopJ-, YopM- e YopH- também produziram mais IFN- γ que os animais controles no 28º dia pós-infecção.

Não foi observada alteração significativa nos níveis de TGF- β determinados nos linfócitos T CD4+ e CD8+ após a infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*.

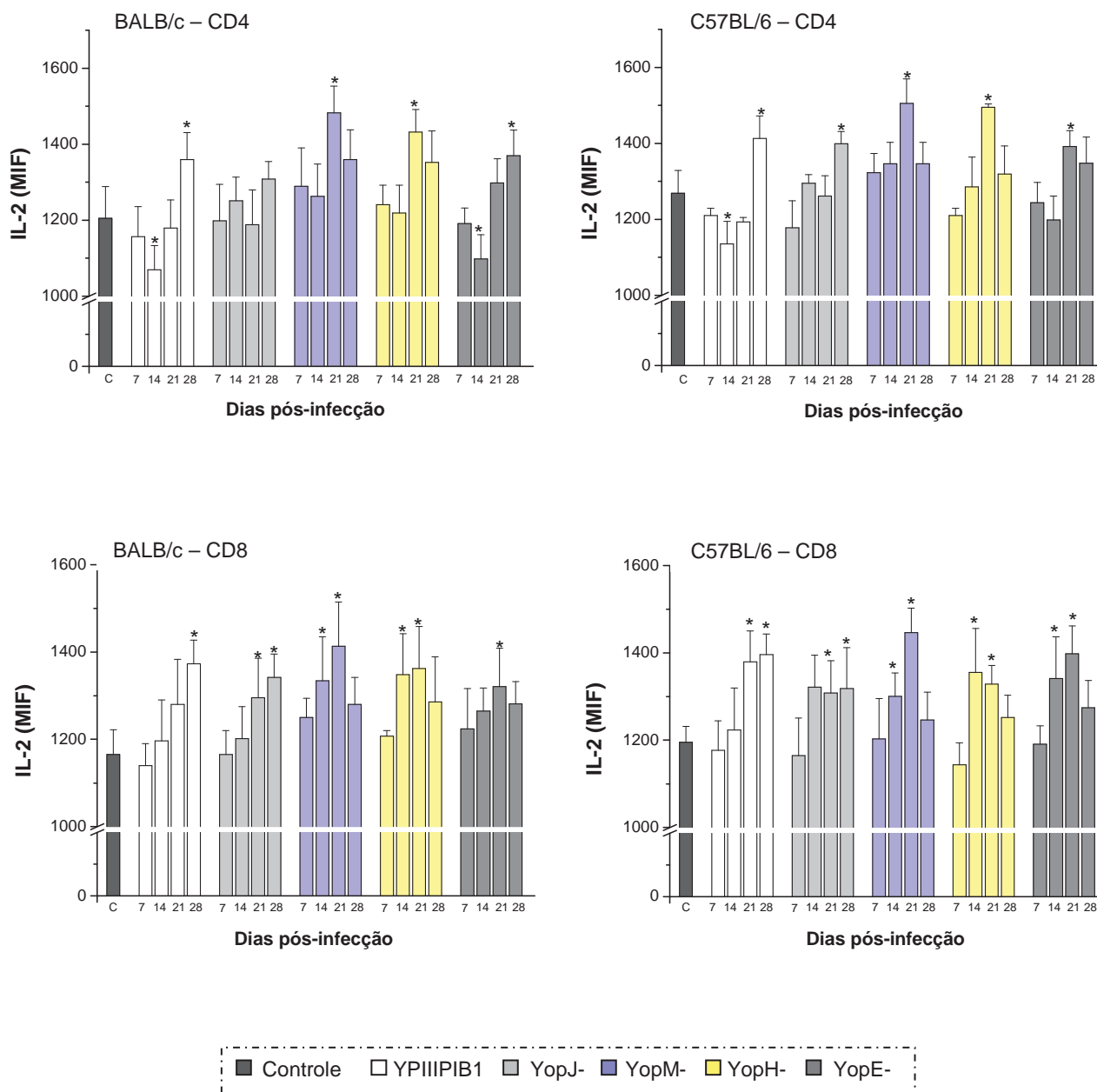


Figura 7 – Determinação de IL-2 intracelular em linfócitos T CD4+ e CD8+ do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. pseudotuberculosis* e controles.

Camundongos foram eutanasiados no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis*, tiveram seus baços retirados e as citocinas foram detectadas e quantificadas intracelularmente nas células identificadas como linfócitos T CD4+ e CD8+ através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e apresentados como valores médios das medianas de intensidade de fluorescência (MIF) + SD. *Significativo em relação aos animais controles ($p < 0,05$).

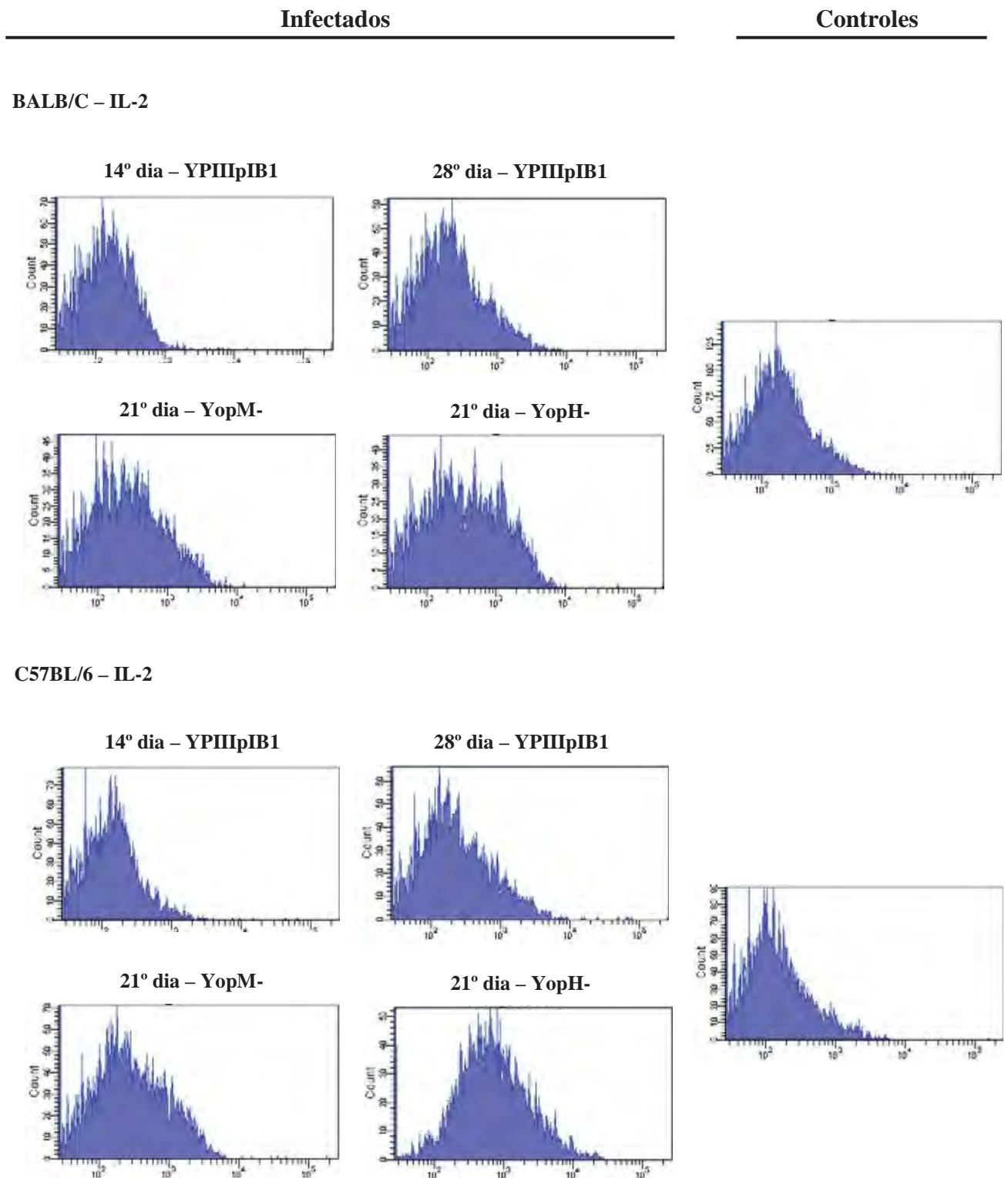


Figura 8 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina IL-2 por linfócitos T CD4⁺ durante infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência e mutantes para as proteínas Yops.

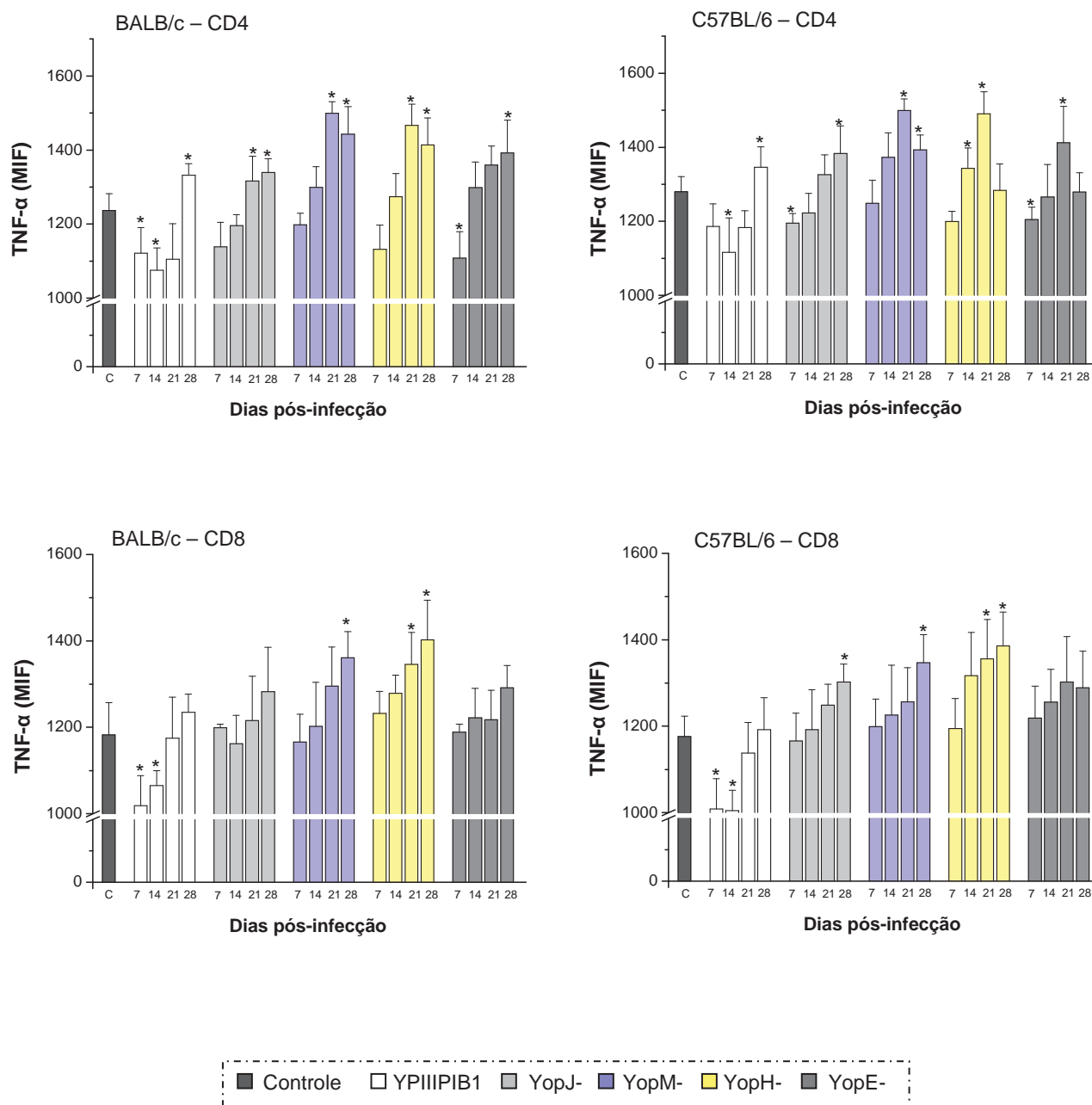


Figura 9 – Determinação de TNF- α intracelular em linfócitos T CD4+ e CD8+ do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. pseudotuberculosis* e controles.

Camundongos foram eutanasiados no 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias após a infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis*, tiveram seus baços retirados e as citocinas foram detectadas e quantificadas intracelularmente nas células identificadas como linfócitos T CD4+ e CD8+ através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e apresentados como valores médios das medianas de intensidade de fluorescência (MIF) + SD. *Significativo em relação aos animais controles ($p < 0,05$).

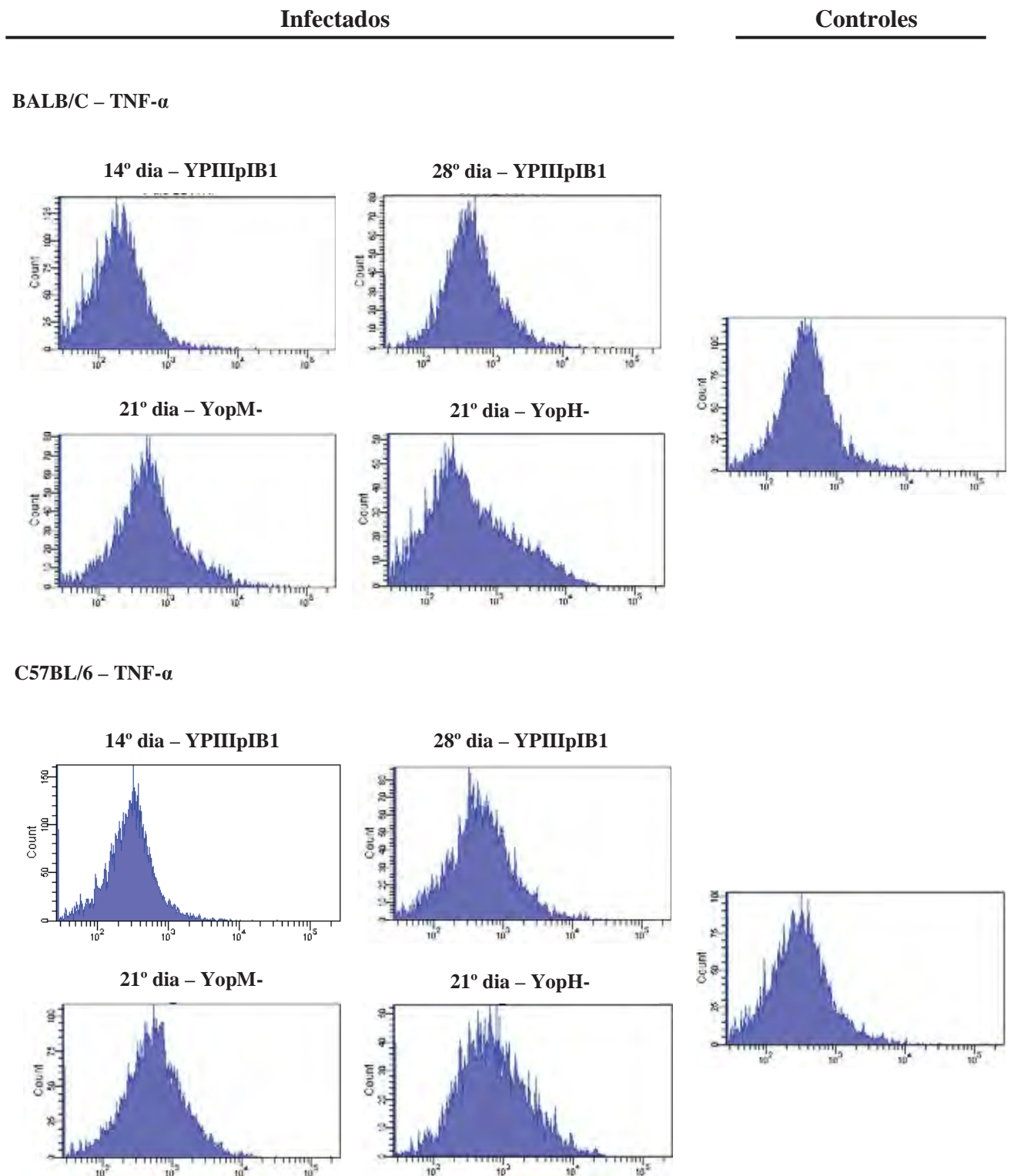


Figura 10 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina TNF- α por linfócitos T CD4+ durante infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência e mutantes para as proteínas Yops.

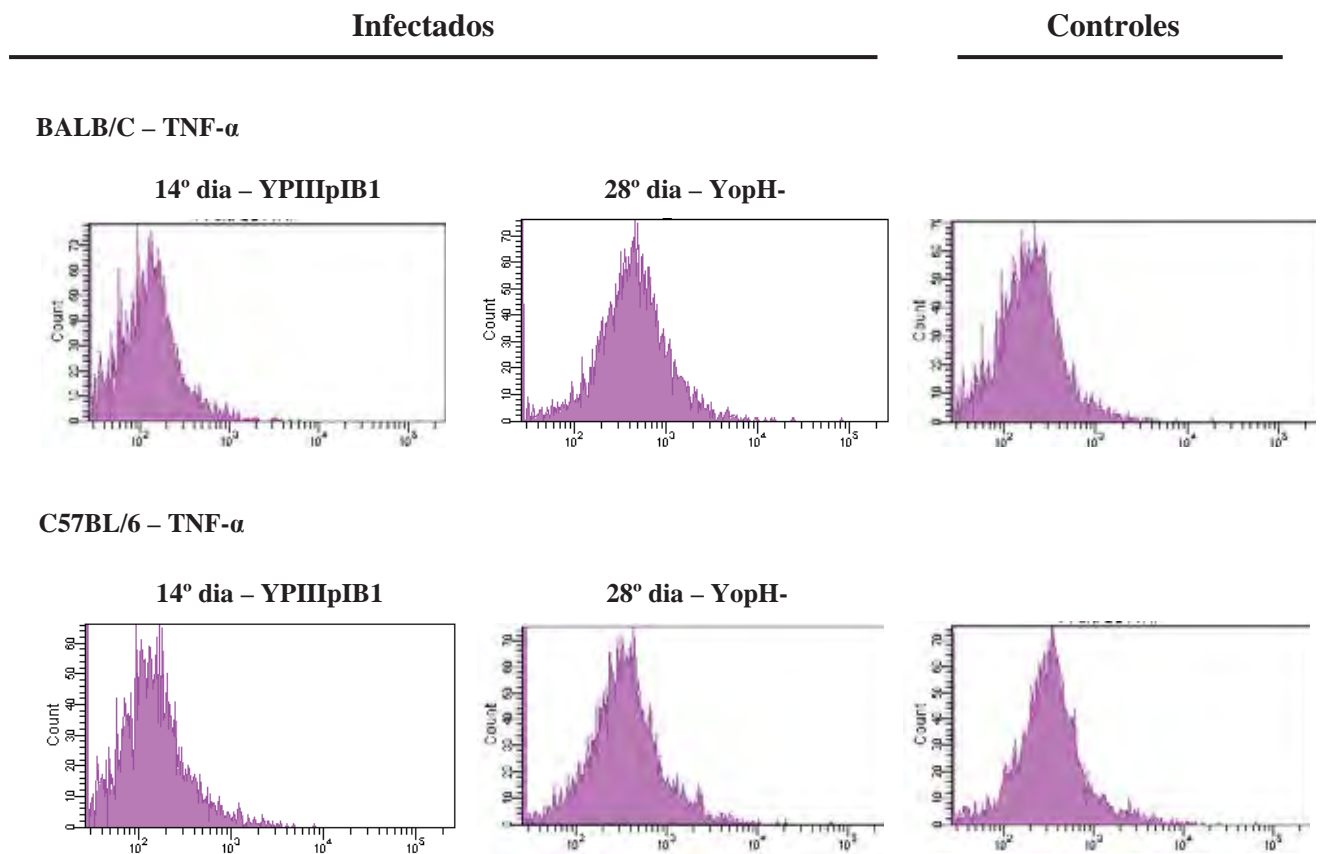


Figura 11 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina TNF- α por linfócitos T CD8⁺ durante infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência e mutantes para as proteínas Yops.

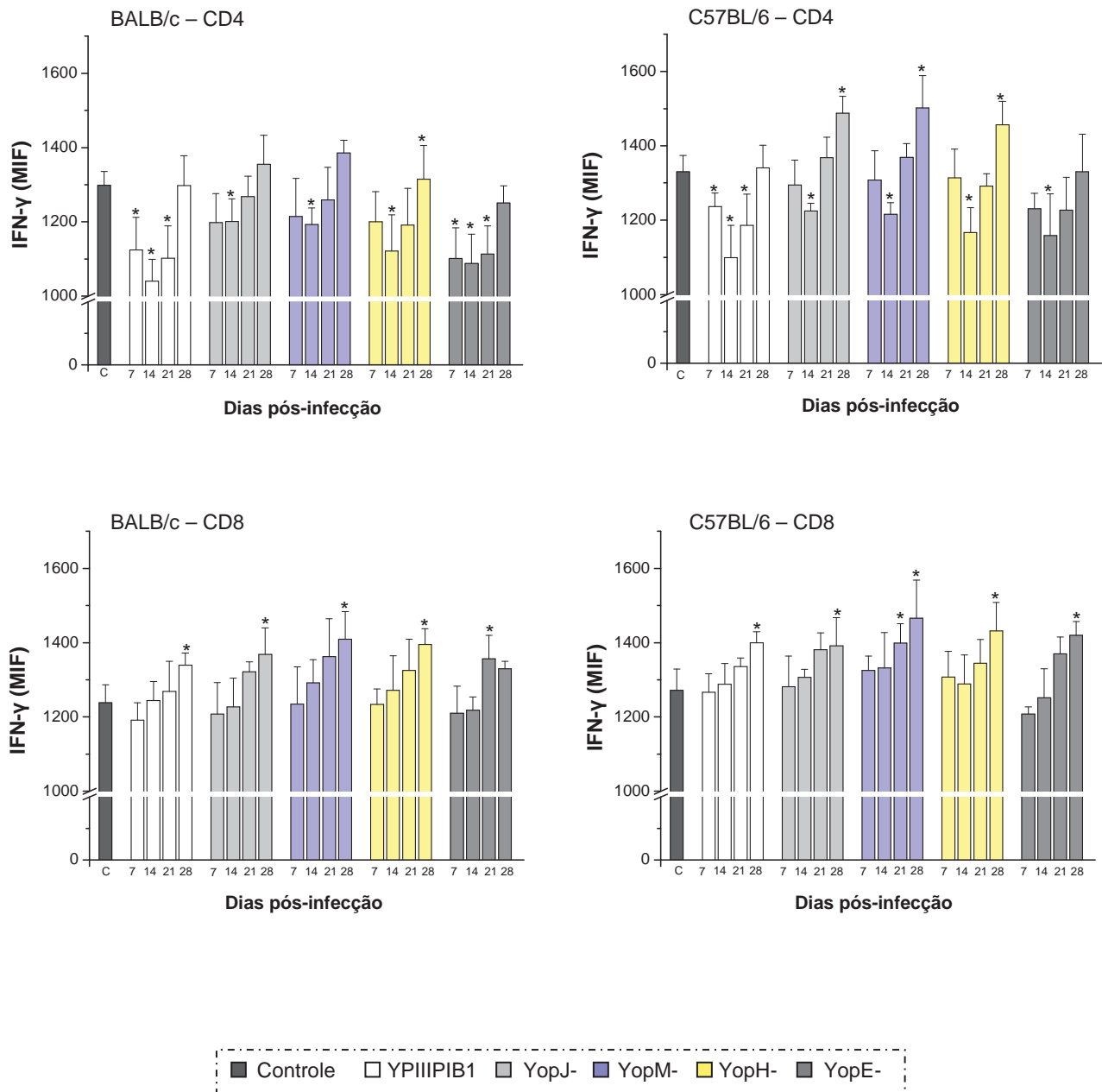


Figura 12 – Determinação de IFN- γ intracelular em linfócitos T CD4+ e CD8+ do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. pseudotuberculosis* e controles.

Camundongos foram eutanasiados no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis*, tiveram seus baços retirados e as citocinas foram detectadas e quantificadas intracelularmente nas células identificadas como linfócitos T CD4+ e CD8+ através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e apresentados como valores médios das medianas de intensidade de fluorescência (MIF) + SD.

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

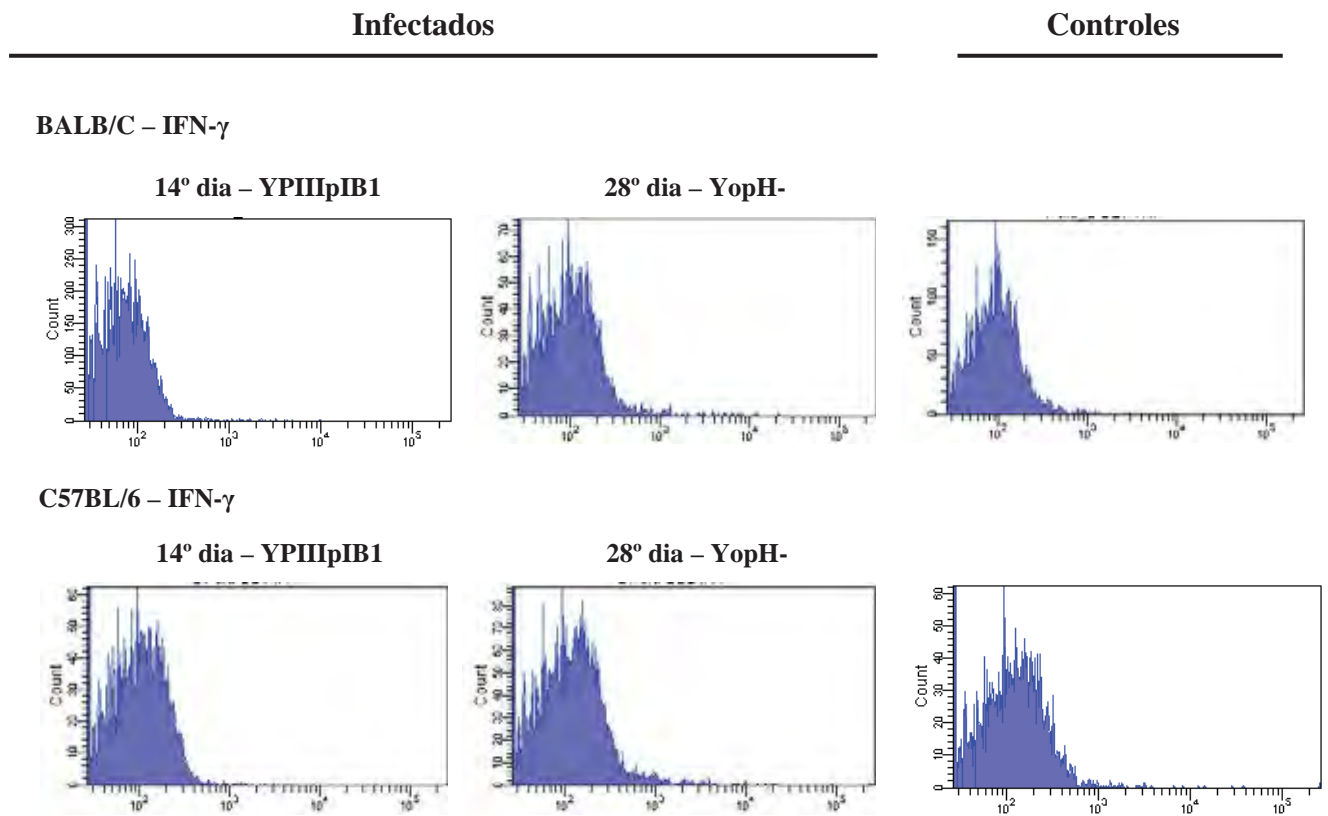


Figura 13 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina IFN- γ por linfócitos T CD4+ durante infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência e mutantes para as proteínas Yops.

5.7 Detecção da expressão de IL-17 intracelular

A infecção de ambas as linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, pela amostra portadora do plasmídeo de virulência desencadeou diminuição nos níveis de IL-17 por células T CD4+, provenientes do baço. Fato semelhante foi observado nos linfócitos T obtidos dos animais infectados com a amostra mutante para YopE. As amostras deficientes dos fatores de virulência YopM e YopH apresentaram discretas elevações na expressão de IL-17, tanto nos camundongos BALB/c quanto nos camundongos C57BL/6 (Figura 10). Não foi observada alteração nas células T CD8+.

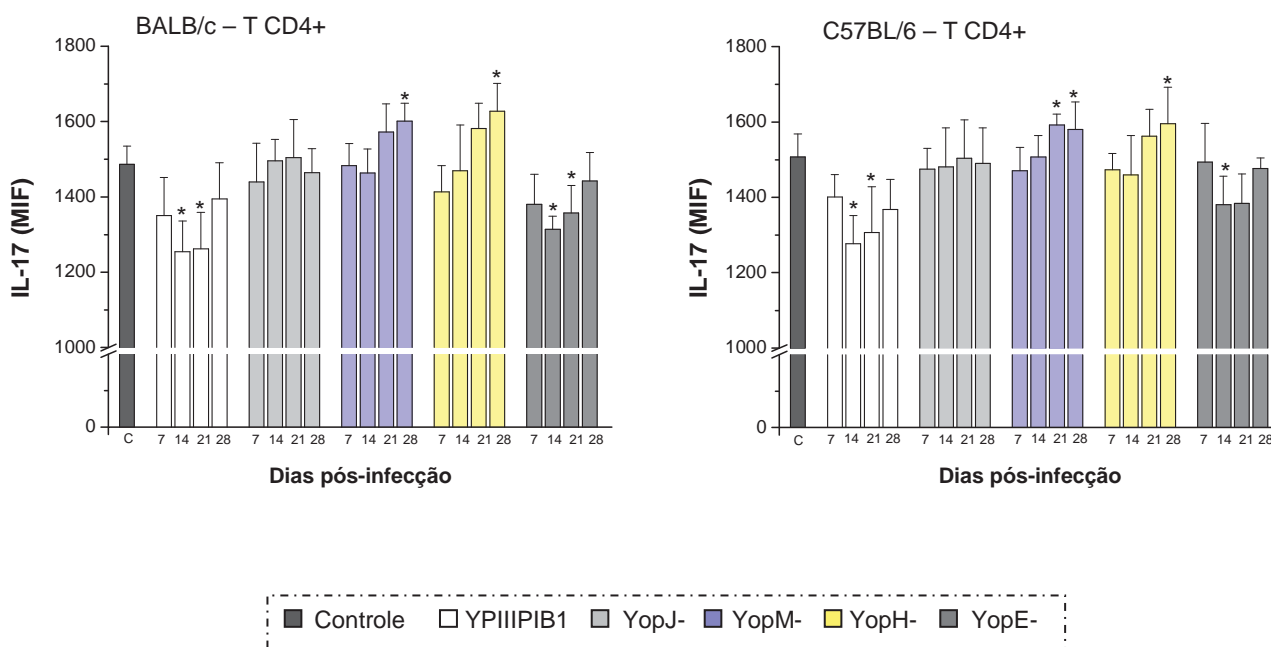


Figura 14 – Determinação de IL-17 intracelular em linfócitos T CD4+ do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. pseudotuberculosis* e controles.

Camundongos foram eutanasiados no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis*, tiveram seus baços retirados e as citocinas foram detectadas e quantificadas intracelularmente nas células identificadas como linfócitos T CD4+ através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e apresentados como valores médios das medianas de intensidade de fluorescência (MIF) + SD. *Significativo em relação aos animais controles ($p < 0,05$).

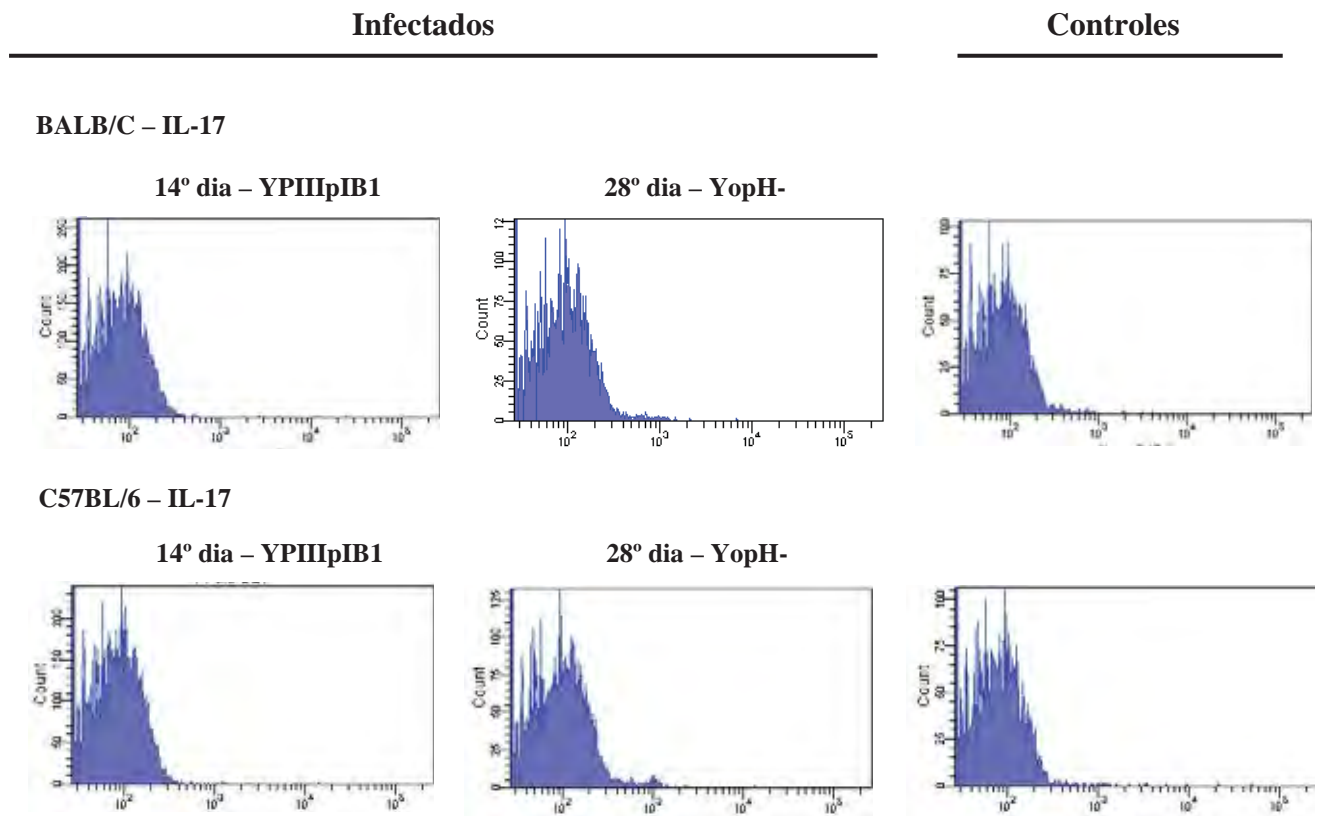


Figura 15 – Histogramas representativos das alterações mais significativas na expressão da citocina IL-17 por linfócitos T CD4+ durante infecção com amostras de *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência e mutantes para as proteínas Yops.

5.8 Avaliação funcional das subpopulações de linfócitos Th17 e Treg

Para o estudo do papel das subpopulações Th17 e Treg durante infecção por *Y. pseudotuberculosis* portadora do plasmídeo de virulência foram realizados: ensaio de depleção de células T CD25+ e ensaio de neutralização da citocina IL-17.

Os resultados da determinação do número de CFU no baço dos camundongos mostraram que ambas as subpopulações de células estudadas são importantes no controle de *Y. pseudotuberculosis* (Figura 11). O tratamento com anti-IL-17 promoveu um aumento de CFU comparado aos animais controles, principalmente nos dias iniciais da cinética de infecção. De modo semelhante, camundongos tratados com anti-CD25 demonstraram ser mais suscetíveis à infecção, contudo, apresentaram um interessante aumento no número de CFU nos dias finais da cinética de infecção comparado com o controle, quando a quantidade de bactérias observada no baço dos animais controle havia reduzido significativamente.

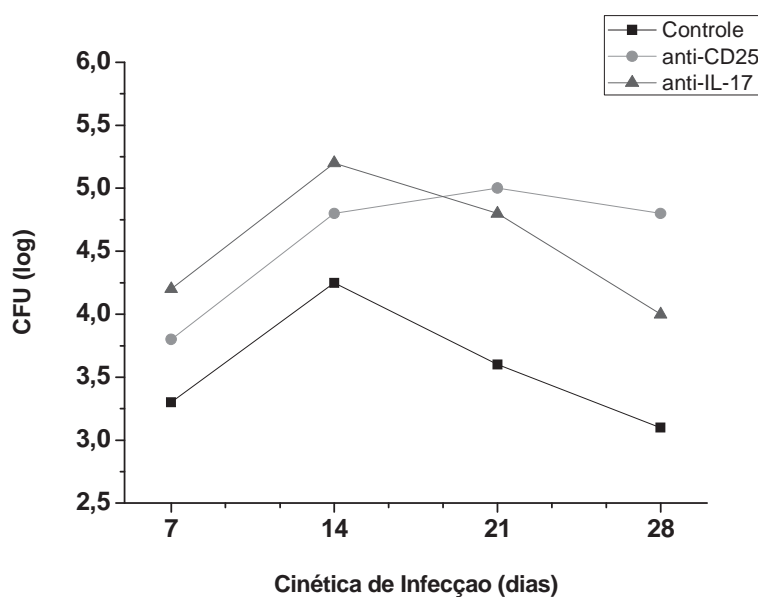


Figura 16 – Determinação de CFU em baço de camundongos infectados com *Y. Pseudotuberculosis* tratados com anti-CD25 ou anti-IL-17.

Camundongos C57BL/6 foram infectados por via intragástrica com amostra de *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB1 e diferentes grupos tratados com 0,250mg de anti-CD25 ou 0,100mg de anti-IL-17 a cada 2 dias, durante toda cinética de infecção. Camundongos infectados tratados com PBS ou isotipo controle formaram o grupo controle. A determinação da CFU foi realizada em meio de cultura BAB após 48 horas de incubação. Os resultados são expressos em \log_{10} .

5.9 Representação dos principais resultados obtidos

As tabelas abaixo resumem as principais consequências causadas por *Y. pseudotuberculosis* e os fatores de virulência Yops determinadas neste estudo.

Tabela 3: Produção de citocinas por células dendríticas infectadas com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*

| Estímulo | Citocinas BALB/c | | | | | Citocinas C57BL/6 | | | | |
|-----------|------------------|-------|-------|---------------|--------------|-------------------|-------|-------|---------------|--------------|
| | IL-6 | IL-10 | IL-12 | TNF- α | TGF- β | IL-6 | IL-10 | IL-12 | TNF- α | TGF- β |
| YpIIIpIB1 | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ | ↑ |
| YopJ- | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| YopM- | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ | ↑ |
| YopH- | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ | ↑ |
| YopE- | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ |

* ↑ - aumento
 ↓ - diminuição

Tabela 4: Expressão de citocinas intracelulares por linfócitos T CD4+ obtidos de camundongos infectados com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*

| Estímulo | Citocinas BALB/c | | | | Citocinas C57BL/6 | | | |
|----------|------------------|---------------|---------------|-------|-------------------|---------------|---------------|-------|
| | IL-2 | TNF- α | IFN- γ | IL-17 | IL-2 | TNF- α | IFN- γ | IL-17 |
| YpIIIpB1 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| YopJ- | NA | ↑ | ↓ | NA | NA | ↓ | ↓↑ | NA |
| YopM- | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓↑ | ↑ |
| YopH- | ↑ | ↑ | ↓↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓↑ | ↑ |
| YopE- | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | NA | ↓ | ↓ | ↓ |

* NA – não altera

↑ - aumento

↓ - diminuição

Tabela 5: Expressão de citocinas intracelulares por linfócitos T CD8+ obtidos de camundongos infectados com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*

| Estímulo | Citocinas BALB/c | | | | Citocinas C57BL/6 | | | |
|----------|------------------|---------------|---------------|-------|-------------------|---------------|---------------|-------|
| | IL-2 | TNF- α | IFN- γ | IL-17 | IL-2 | TNF- α | IFN- γ | IL-17 |
| YpIIIpB1 | ↑ | ↓ | ↑ | NA | ↑ | ↓ | ↑ | NA |
| YopJ- | ↑ | NA | ↑ | NA | ↑ | NA | ↑ | NA |
| YopM- | ↑ | ↑ | ↑ | NA | ↑ | ↑ | ↑ | NA |
| YopH- | ↑ | ↑ | ↑ | NA | ↑ | ↑ | ↑ | NA |
| YopE- | ↑ | NA | ↑ | NA | ↑ | NA | ↑ | NA |

* NA – não altera

↑ - aumento

↓ - diminuição

Tabela 6: Subpopulação de linfócitos T durante infecção com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*

| Estímulo | Linfócitos T - BALB/c | | | Linfócitos T - C57BL/6 | | |
|-----------|-----------------------|------|--------|------------------------|------|--------|
| | CD4+ | CD8+ | Foxp3+ | CD4+ | CD8+ | Foxp3+ |
| YpIIIpIB1 | ↓ | ↓ | ** ↑ | ↓ | NA | ** ↑ |
| YopJ- | NA | NA | ↑ | NA | NA | ↑ |
| YopM- | ↑ | NA | ↑ | ↑ | NA | ↑ |
| YopH- | ↑ | NA | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| YopE- | NA | NA | ** ↑ | NA | NA | ** ↑ |

** período final da cinética de infecção

* NA – não altera

↑ - aumento

↓ - diminuição

6. *Discussão*

O sistema imune é responsável pela defesa do organismo contra patógenos e substâncias estranhas. Através da apresentação de antígenos às células T e produção de diversas moléculas, as células dendríticas podem orientar a resposta imune adaptativa (Ueno et al., 2007) e influenciar na evolução de infecções. Estudos prévios indicam que a infecção por *Yersinia* pode ter como alvo células dendríticas, o que contribuiria para uma diminuição dos mecanismos efetores do sistema imune contra a bactéria (Brodsky e Medzhitov, 2008). Neste trabalho, observamos que *Y. pseudotuberculosis* é capaz de diminuir a viabilidade de células dendríticas, sendo que as células infectadas com a amostra deficiente do fator de virulência YopJ, apresentaram a menor mortalidade. Inibir a funções das células dendríticas pode indicar um importante mecanismo bacteriano de subversão da resposta imune, prejudicando o controle do patógeno. Os dados apresentados concordam com relatos de Kramer e Wiedig (2005), que após estudo em *in vitro* com uma amostra selvagem (portadora do plasmídeo de virulência) e uma amostra mutante para YopP de *Y. enterocolitica*, concluíram que a porcentagem de células dendríticas mortas após as distintas infecções foi 50% maior nos animais inoculados com a bactéria selvagem, ou seja, aquela portadora do gene para expressão de YopP, indicando o papel dessa proteína na indução da apoptose. Em outro estudo, YopJ de *Y. pseudotuberculosis* também demonstrou capacidade de promover a apoptose em células dendríticas obtidas de precursores de medula óssea, porém sua capacidade de desencadear morte celular foi mais reduzida que aquela comparada à YopP de *Y. enterocolitica* (Brodsky e Medzhitov, 2008).

Bactérias patogênicas podem ainda evadir-se das respostas imunes por interferir com a secreção de citocinas por APCs e linfócitos T. A determinação da produção de citocinas por células dendríticas infectadas com as amostras YpIIIpIB1 e mutantes para as Yops, mostrou que *Y. pseudotuberculosis* pode influenciar a resposta imune deste tipo celular em ambas as linhagens de camundongos estudadas.

A análise dos níveis de IL-6 demonstrou relevante produção desta citocina, próximo ao controle positivo, sugerindo possível ação deste mediador na defesa contra *Yersinia*. Matteoli et al. em 2008 fizeram análises da expressão gênica por microarray de células CD11b⁺ coletadas do baço de camundongos infectados com *Y. enterocolitica* e encontraram que a expressão de genes que codificam IFN- γ e IL-6 estavam elevados. Estudos da evolução da infecção por *Y. enterocolitica* em camundongos deficientes de IL-6 evidenciaram um papel protetor desta citocina no controle do patógeno. Relatos indicam que camundongos IL-6^{-/-} infectados com *Yersinia* enteropatogênica apresentam septicemia, aumento da inflamação e mortalidade (Dube et al., 2004). A IL-6 é uma citocina com

múltiplas funções, sua presença pode regular a ativação de respostas inflamatórias, principalmente aumento da diferenciação de células Th17 e diminuição da função de células Treg (Campbell e Koch, 2011).

A determinação da produção de TGF- β por células dendríticas mostrou que a infecção com YpIIIpIB1 e mutantes para os fatores de virulência Yops induzem produção considerável da citocina. Existem poucos estudos relacionando a infecção por *Yersinia enterocolitica* e a produção de TGF- β . Tumitan et al. (2007) mostraram elevação na produção de TGF- β após infecção *in vivo* de macrófagos por *Y. enterocolitica*, utilizando camundongos BALB/c. TGF- β desempenha importante papel na indução de resposta imunossupressora, por auxiliar a diferenciação de células Treg (Carrier et al., 2007). Contudo, na presença de IL-6, essa citocina estimula a diferenciação de células T naive em células Th17 (Manel et al., 2008). Neste estudo, mostramos que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* conduz à produção de ambas citocinas, IL-6 e TGF- β , sugerindo uma possível diferenciação da subpopulação Th17.

Entretanto, não houve produção detectável de IL-23 por células dendríticas infectadas pelas diferentes amostras bacterianas utilizadas no estudo. IL-23 é uma citocina importante na manutenção de células Th17. A ativação de células Th17 na presença de IL-23 conduz a expansão desta subpopulação (Bettelli et al., 2007).

No presente estudo, observamos que a exposição de células dendríticas à amostra bacteriana portadora do plasmídeo de virulência conduziu a uma elevada produção de citocina anti-inflamatória (IL-10). Células dendríticas de camundongos BALB/c infectados apresentaram maior expressão de IL-10 do que as observadas em células dendríticas infectadas obtidas de camundongos C57BL/6. A IL-10 desempenha um papel importante na limitação da resposta inflamatória (Asadullah et al., 2003). Entretanto, bactérias patogênicas podem estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias para inibir a resposta imune do hospedeiro (Brubaker, 2003), contribuindo para a suscetibilidade à infecção.

Diferentes fatores de virulência têm sido associados com o aumento da expressão de IL-10 após a infecção por *Yersinia*. O tratamento de macrófagos com os recombinantes de LcrV ou YopB mostrou a capacidade destes fatores em estimular a produção de IL-10 (Sing et al., 2002, Sodhi et al., 2005). Do mesmo modo, macrófagos infectados com uma amostra mutante aflagelada de *Yersinia* apresentaram diminuição na produção de TNF- α associada com a secreção aumento de IL-10, indicando que a flagelina pode agir como agente anti-inflamatório (McNally et al., 2007). Neste estudo, verificamos que células dendríticas infectadas com a amostra deficiente do fator de virulência YopM conduziu a menor

produção de IL-10 em comparação com a infecção por *Y. pseudotuberculosis* YPIIIpIB1, sugerindo uma possível colaboração de YopM na secreção desta citocina.

Nossos resultados mostraram uma pequena produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF- α) após a infecção de células dendríticas com a amostra YPIIIpIB1. Estudos anteriores demonstraram um papel protetor das citocinas IL-12 e TNF- α na defesa contra a infecção por *Yersinia* enteropatogênica (Bohn e Autenrieth, 1996, Zhao et al., 2000). A supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias pode ser uma maneira das bactérias subverterem a resposta imune do hospedeiro. Embora camundongos BALB/c apresentem maior produção de IL-10 do que camundongos C57BL/6 após a infecção com *Y. pseudotuberculosis*, não houve diferença significativa na produção de IL-12 e TNF- α entre as linhagens de camundongos estudadas. Estudo anterior demonstra que camundongos C57BL/6 infectados com *Y. enterocolitica* respondem de forma mais eficiente à IL-12 que camundongos BALB/c, mesmo em quantidades semelhantes da citocina (Bohn e Autenrieth, 1996).

No presente trabalho, observamos que células dendríticas infectadas com YopJ mutante perderam a capacidade para inibir a produção de IL-12 e TNF- α . De forma semelhante, a infecção com a amostra deficiente para o fator de virulência YopE induziu um aumento na produção de TNF- α em comparação com a infecção com a amostra YPIIIPIB1. O fator de virulência YopJ é conhecido por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias de células hospedeiras (Erfurth et al., 2004). Aqui observamos que YopE também pode interferir com o perfil de citocina de células dendríticas, indicando uma possível colaboração de YopE na supressão da resposta pró-inflamatória.

No presente estudo, encontramos redução da proliferação de células T devido à infecção de células dendríticas com YPIIIpIB1 (resultados apresentados no manuscript 1), indicando uma diminuição da capacidade imunoestimuladora de células dendríticas. A redução da proliferação de células T não foi observada em igual número após a infecção de células dendríticas com YopJ, YopE e YopH mutantes. Respostas de células T são essenciais para a resolução da infecção por *Y. pseudotuberculosis*. A modulação da função de células dendríticas durante o processo infeccioso pode prejudicar a ativação de células T e, posteriormente, a eliminação das bactérias.

Bactérias patogênicas, como *Yersinia*, possuem fatores de virulência que possibilitam a subversão dos mecanismos imunológicos. A evasão da resposta imune adaptativa pode influenciar a evolução da infecção por *Y. pseudotuberculosis*, visto que a resposta Th1 é importante para resolução da mesma (Autenrieth et al, 1994). Para análise da ativação das

subpopulações de linfócitos T, camundongos foram inoculados via intragástrica com diferentes doses infectantes das amostras bacterianas utilizadas no estudo. Estudo anterior demonstrou que a inoculação de *Y. pseudotuberculosis* por via intragástrica com doses infectantes semelhantes às utilizadas neste trabalho causa infecção sistêmica no modelo murino (Barnes et al., 2006). Curiosamente, a observação dos sinais de doença e mortalidade durante a cinética de infecção mostrou que camundongos infectados com amostra deficiente para o fator de virulência YopJ, conhecido por suprimir a resposta imune hospedeira, apresentavam maior acometimento pela infecção e mortalidade comparada aos animais infectados com amostras deficientes para as outras proteínas Yop. Este dado pode sugerir um papel da proteína YopJ na ativação das respostas imunes. As amostras bacterianas deficientes para YopH e YopE mostraram as menores virulências, indicando a importância destes fatores na patogenicidade de *Y. pseudotuberculosis*.

A avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ durante a infecção por *Y. pseudotuberculosis* mostrou que a amostra YPIIIpIB1 diminui o número absoluto da subpopulação de linfócitos T CD4+ nos primeiros dias de cinética. As bactérias deficientes para fatores de virulência mostraram perfis diferentes, com pouca ou nenhuma diminuição de células T. As amostras deficientes na secreção de YopJ, YopM e YopH apresentaram aumentos no número de linfócitos T CD4+ e CD8+, indicando provavelmente uma função destes fatores na inibição da resposta imune adaptativa. O efeito inibitório *in vitro* da YopH sobre a ativação de linfócitos, mediado pelo receptor de células T, já foi descrito anteriormente (Yao et al., 1999).

Células T CD4+ desempenham um papel essencial na imunidade antimicrobiana, principalmente por ativar outros tipos celulares, como linfócitos B, macrófagos e células NK. A evasão dos mecanismos efetores desenvolvidos por esta subpopulação de linfócitos T por *Y. pseudotuberculosis* pode contribuir para a falha no controle do patógeno e evolução da infecção. Os resultados obtidos demonstraram papel das proteínas Yops na supressão da ativação de células T, entretanto, mesmo nas amostras deficientes destes fatores de virulência, a expansão das subpopulações de linfócitos T não foi muito elevada, sugerindo que outros mecanismos de inibição da resposta imune adaptativa possam estar agindo.

No presente trabalho, também observamos alteração no número absoluto de linfócitos Tregs. A infecção por *Y. pseudotuberculosis* YPIIIpIB1 eleva esta população celular de maneira discreta no 7º dia pós-infecção nos camundongos BALB/c. Contudo, amostras mutantes para os fatores YopM e YopH apresentaram aumentos bastante elevados deste tipo celular. Estas elevações coincidem com o aumento de citocinas pró-inflamatórias,

o que pode indicar um efeito modulador desta população celular sobre a resposta imune. Linfócitos denominados Tregs são conhecidos por possuírem funções regulatórias e atuam contra componentes pro-inflamatórios do sistema imune (Suvas e Rouse, 2006).

A manutenção da homeostasia do sistema imunológico ocorre por meio de múltiplos mecanismos de regulação. Células Treg CD4⁺ CD25⁺ representam 7% a 10% de todas as células T CD4⁺ na periferia (Chen et al. 2005) e desempenham um papel essencial no controle de respostas inflamatórias exacerbadas (O'Garra & Vieira 2004). No presente estudo, a expansão das células Treg não foi muito significativa nas fases iniciais da infecção, o que é consistente com a inibição da resposta de células T induzida por *Y. pseudotuberculosis* (Yao et al. 1999, Cantwell et al. 2010). Nossos resultados mostraram uma proliferação de células Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ no baço de camundongos infectados com amostra portadora do plasmídeo de virulência a partir de 21 dias de infecção. Estes dados demonstram a ativação de outra subpopulação de células T CD4⁺ diferente da Th1, durante a infecção por *Yersinia*, sugerindo um papel para respostas imunes reguladoras na patogênese de doenças gastrointestinais.

O papel protetor da imunidade celular do tipo 1 para a eliminação da infecção por *Yersinia* está bem estabelecido, no entanto, pouco se sabe sobre a ativação de outras subpopulações de linfócitos T CD4⁺ envolvidas na defesa contra infecção por *Y. pseudotuberculosis*. Neste estudo, nós investigamos um papel para células Treg no auxílio à resposta imune do hospedeiro contra infecção por *Y. pseudotuberculosis*. O ensaio de depleção de células CD25⁺ mediada por anticorpos, durante infecção por *Y. pseudotuberculosis* YPIIIpIB1, conduziu a aumento na colonização do baço, sugerindo um papel para células Treg no controle à infecção por *Yersinia* enteropatogênicas. Estudos concordantes têm mostrado um papel protetor para células Treg na patogênese de várias doenças infecciosas (Suvas e Rouse 2006), incluindo a infecção por *Y. enterocolitica* (Zhong et al 2010).

A determinação das citocinas intracelulares de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ obtidos do baço de camundongos infectados evidenciou a capacidade da amostra bacteriana YPIIIpIB1 suprimir citocinas como IL-2, TNF- α , IFN- γ e IL-17 com influência do plasmídeo de virulência na modulação dessa resposta imune.

Análises da expressão de IL-2 nos camundongos infectados com as diferentes amostras bacterianas não mostrou diferença significativa entre as linhagens estudadas, indicando que a citocina não está relacionada com a conhecida maior suscetibilidade da linhagem BALB/c. Os resultados demonstraram pouca expressão de IL-2 no início da

cinética de infecção nos animais infectados com a amostra portadora do plasmídeo de virulência. Yao et al. (1999), mostraram que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* suprime a produção de IL-2 por linfócitos T antígeno específicos, sendo que experimentos com bactérias mutantes para Yops indicaram a participação de YopH nessa inibição. Estudos também demonstraram que a proteína YopH de *Y. pestis* diminui consideravelmente a produção de IL-2 induzida pela estimulação do TCR (Liang et al., 2003). Em nosso estudo, observamos que além da função do fator de virulência YopH, a proteína YopM pode influenciar a supressão da produção de IL-2, o que indica uma possível cooperação de diferentes fatores de virulência na inibição da expressão do mediador. IL-2 é um componente das respostas imunes reconhecido pelo importante papel na estimulação da proliferação de linfócitos T antígeno específicos, dessa maneira a inibição da produção desta citocina pode subverter a expansão dos clones de linfócitos T e interferir com a resposta imune adaptativa. Coerente com esta hipótese, a baixa expressão de IL-2 foi observada no mesmo período em que os linfócitos T mostraram pouca proliferação, com o decorrer da cinética de infecção, observou-se elevação nos níveis de IL-2 e no aumento do número de linfócitos T CD4+ e CD8+.

A infecção por YPIIIpIB1 e demais bactérias estudadas não alteraram os níveis de IL-4 após a infecção em ambas linhagens de camundongos. Da mesma forma, a determinação dos níveis de IL-10 não mostrou alteração significativa na expressão da citocina nos linfócitos T CD4+ de camundongos BALB/c e C57BL/6. Não se verificou alterações significativas nas células T CD8+ obtidas durante a infecção quanto à expressão de IL-10. Esses dados indicam que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* não altera a produção de citocinas anti-inflamatórias em linfócitos T.

A determinação da MIF de TNF- α mostrou diminuição da expressão desta citocina após infecção pela amostra portadora do plasmídeo de virulência. O TNF- α é uma importante citocina na defesa contra bactérias extracelulares, desempenhando função na ativação da resposta imune celular. Estudos anteriores já demonstraram o papel protetor do TNF- α durante a infecção por *Yersinia* enteropatogênica (Autenrieth & Heeseman, 1992), indicando que a inibição da expressão desta citocina pode prejudicar o controle da infecção. Nossas análises mostraram que as Yops estão relacionadas com a diminuição dos níveis de TNF- α . A infecção com a amostra bacteriana deficiente para o fator de virulência YopH, conhecido por inibir a ativação de células T, conduziu a aumento na expressão da citocina comparado à amostra portadora do plasmídeo de virulência. Contudo, outras proteínas Yops

mostraram influenciar na expressão de TNF- α , como a YopM. O resultado é mais uma evidência da ação conjunta das Yops na supressão da resposta imune adaptativa.

Nosso estudo mostrou que a expressão de IFN- γ foi prejudicada por *Y. pseudotuberculosis*. A produção de IFN- γ durante a resposta imune está relacionada com a ativação da resposta imune celular e recrutamento de células, como macrófagos. A inibição desta citocina pode comprometer a defesa contra a bactéria, contribuindo para sua disseminação. Após infecção com as amostras mutantes para os fatores de virulência, encontramos que as proteínas YopJ, YopM e YopH podem influenciar os níveis de IFN- γ . Kerschen et al. (2004) mostraram que a YopM de *Y. pestis* está associada com a produção diminuída de varias citocinas pró-inflamatórias, inclusive IFN- γ . Desse modo, as Yops mostram atuar de forma direta na modulação da resposta de linfócitos T.

Estudo prévio mostrou que a administração do antígeno LcrV recombinante em camundongos causou a inibição da produção de TNF- α e IFN- γ (Motin et al., 1994; Nedialkov et al., 1997), indicando que não apenas as proteínas Yops possuem papel na supressão da resposta imune inflamatória e modulação das citocinas.

Existe carência de estudos relacionando a infecção por *Yersinia* e a produção de IL-17. Neste estudo, observamos que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* pode interferir na ativação da subpopulação Th17, notado principalmente pela pouca expressão de IL-17 observada durante a infecção por YPIIIpIB1. A ausência na produção de IL-23 por células dendríticas infectadas por YpIIIpIB1, descrita anteriormente, sugere que células Th17 podem não estar sendo ativadas adequadamente. Não foram observadas relevantes influências das Yops sobre a expressão de IL-17.

Estudo recente demonstra que a citocina IL-17 pode desempenhar um importante papel na imunidade protetora contra *Y. pestis*, indicando uma possível função da subpopulação de linfócitos Th17 na defesa contra *Yersinia* (Jr-Shiuan et al., 2011). Neste estudo, observamos uma elevação no número de CFU obtida no baço de camundongos após ensaio de neutralização de IL-17, sugerindo uma possível função protetora desta citocina no controle da infecção por *Y. pseudotuberculosis*. Outros estudos são necessários para esclarecer a relação entre Th17 e a infecção.

Identificar os diferentes tipos celulares presentes durante a ativação das respostas imunes efetoras, bem como seus produtos secretados, permite o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controle e prevenção dos processos infecciosos.

7. Conclusão

A infecção por *Y. pseudotuberculosis* mostrou influenciar na resposta imune de células dendríticas e linfócitos T, diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e reduzindo a proliferação de células T.

Os fatores de virulência Yops parecem auxiliar no processo de subversão das defesas imunes, colaborando para evolução da infecção.

Células Treg e Th17 mostraram possuir papel importante no controle da infecção.

8. Referências Bibliográficas

- ABBOTT, M.; GALLOWAY, A.; CUNNINGHAM, J. L. Haemochromatosis presenting with a double *Yersinia* infection. **J Infect**, v.13, p.143-145, 1986.
- ACKERMAN, A. L.; KYRITSIS, C.; TAMPE, R.; CRESSWELL, P. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. **Nat Immunol**, v.6, p.107-113, 2005.
- ADAMS, S.; O'NEILL, D.W.; BHARDWAJ, N. Recent advances in dendritic cell biology. **J Clin Immunol**, v.25, p.87-98, 2005.
- AHERN, P. P.; SCHIERING, C.; BUONOCORE, S.; MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J.; MALOY K. J.; POWRIE, F. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. **Immunity**, v.33, p.279–288, 2012.
- ALGOOD, H. M.; ALLEN, S. S.; WASHINGTON, M. K.; PEEK, R. M.; JR MILLER, G. G.; COVER, T. L. Regulation of gastric b cell recruitment is dependent on IL-17 receptor a signaling in a model of chronic bacterial infection. **J Immunol**, v.183, p.5837-5846, 2009.
- ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy – review of a new approach. **Pharmacol Rev**, v.55, p.241–269, 2003.
- AUTENRIETH, I. B.; BEER, M.; BOHN, E.; KAUFMANN, S. H.; HEESEMANN, 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, n.6, p.2590-2599, 1994.
- AUTENRIETH, I. B.; HANTSCHMANN, P.; HEYMER, B.; HEESEMAN, 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.
- AUTENRIETH, I. B.; HEESEMAN, J. In vivo neutralization of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* in mice. **Med Microbiol Immunol**, v.181, p.333-338, 1992.
- AUTENRIETH, I. B.; FIRSHING, 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.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v.18, p.767-811, 2000.
- BARNES, P. D.; BERGMAN, M. A.; MECSAS, J.; ISBERG, R. R. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. **J Exp Med**, v.203, p.1591-1601, 2006.
- BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Curr Opin Immunol**, v.19, p.652-657, 2007.

- BLISKA, J. B.; BLACK, D. S. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. **Infect Immun**, v.63, p.681-685, 1995.
- BOGDANOVICH, T.; CARNIEL, E.; FUKUSHIMA, H.; SKURNIK, M. Use of O-Antigen Gene Cluster-Specific PCRs for the Identification and O-Genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. **J Clin Microbiol**, v.41, p.5103-5112, 2003.
- 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.; 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, p.2213-2220, 1998.
Tatiana Bogdanovich,¹ Elisabeth Carniel,² Hiroshi Fukushima,³ and Mikael Skurnik^{1,4*}
- BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. **Clin Microbiol Rev**, v.10, p.257-276, 1997.
- BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. **Microbes Infect**, v.1, p.323-333, 1999.
- BRODSKY, I. E.; MEDZHITOV, R. Reduced Secretion of YopJ by *Yersinia* Limits *In Vivo* Cell Death but Enhances Bacterial Virulence. **PLoS Pathog**, v.4, p.1-14, 2008.
- BRUBAKER, R. R. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). **Infect Immun**, v.71, p.3673-3681, 2003.
- CAMPBELL, D. J.; KOCH, M. A. Phenotypic and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**, v.2, p.119-130, 2011.
- CANTWELL, A. M.; BUBECK, S. S.; DUBE, P. H. YopH inhibits early pro-inflammatory cytokine responses during plague pneumonia. **BMC Immunol**, v.11, p.29, 2010.
- CARNIEL, E. The plague. **CR BIOL**, v.325, p.851-853, 2002.
- CARRIER, Y.; YUAN, J.; KUCHROO, V. K.; WEINER, H. L. Th3 cells in peripheral tolerance. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. **J Immunol**, v.178, p.179-185, 2007.
- CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. Animal models for human disease. **Am J Pathol**, v.81, p.703-705, 1975.
- CHEN, X.; OPPENHEIM, J. J.; HOWARD, O. M. BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25-responder T cells than C57BL/6 mice. **J Leukoc Biol**, v.78, p.114-121, 2005.

- CORNELIS, G. R.; BOLAND, A.; BOYD, A. P.; GEUIJEN, C.; IRIARTE, M.; NEYT, C.; SORY, M-P.; STAINER, I. The virulence plasmid of *Yersinia*, na antihost genome. *Microbiol. Mol Biol Ver*, v.62, p.1315-1352, 1998.
- CORNELIS G. R; WOLF-WATZ H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol*, v23: p861-867, 1997.
- CORNELIS, G. R. The *Yersinia* Ysc-Yop 'Type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.3, p.742-752, 2002.
- CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*, v.7, p.479-489, 2010.
- DANIELE, N.; SCERPA, M. C.; LANDI, F.; CANIGLIA, M.; MIELE, M. J.; LOCATELLI, F.; ISACCHI, G.; ZINNO, F. T (reg) cells: collection, processing, storage and clinical use. *Pathol Res Pract.*, v.4, p.209-215, 2011.
- DENECKER, G.; DECLERCQ, W.; GEUIJEN, C. A.; BOLAND, A.; BENABDILLAH, R.; VAN, G. M. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J Biol Chem*, v.276, p.19706-14, 2001.
- DEPAOLO, R.W; TANG, F.; KIM, I.; HAN, M.; LEVIN, N.; CILETTI, N.; LIN, A.; ANDERSON, D.; SCHNEEWIND, O.; JABRI, B. Toll-like receptor 6 drives differentiation of tolerogenic dendritic cells and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis. *Cell Host Microbe*, v.4, p.350-361, 2008.
- DI GENARO, M. S.; CARGNELUTTI, D. E.; ELICABE, J. R.; LACOSTE, M. G.; VALDEZ, S.; GOMEZ, N.; DE GUZMAN, A. M. S. Role of TNFRp55 in *Yersinia enterocolitica* O:3-induced arthritis: triggering bacterial antigens and articular immune response. *Rheumatology*, v.46, p.590-596, 2007.
- DUBE, P. H.; HANDLEY, S. A.; LEWIS, J.; MILLER, V. L. Protective Role of Interleukin-6 during *Yersinia enterocolitica* Infection Is Mediated through the Modulation of Inflammatory Cytokines. *Infect Immun*, v.72 p. 3561-3570, 2004.
- ERFURTH, S. E.; GROBNER, S.; KRAMER, U.; GUNST, D. S. J.; SOLDANOVA, I.; SCHALLER, M.; AUTENRIETH, I. B.; BORGMANN, S. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun*, v.72, p.7045-7054, 2004.
- EHRENSTEIN, M. R.; EVANS, J. G.; SINGH, A.; MOORE, S.; WARNES, G.; ISENBERG, D. A.; MAURI, C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Biol Med*, v.200, p.277-285, 2004.
- FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, v.4, p.330-336, 2003.
- GATTI, E.; VELLECA, M. A.; BIEDERMANN, B. C.; MA, W.; UNTERNAEHRER, J.; EBERSOLD, M. W. ; MEDZHITOV, R.; POBER, J. S.; MELLMAN, I. Large-scale culture

and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factormobilized CD34+ progenitors. **J Immunol**, v.164, p.600-607, 2000.

GRANUCCI, F.; FOTI, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cell biology. **Adv Immunol**, v.88, p.193-233, 2005.

GROUARD, G.; RISSOAN, M. C.; FILGUEIRA, L.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J.; LIU, Y. J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with IL-3 and CD40-ligand. **J Exp Med**, v.185, p.1101-1111, 1997.

GUEDES, P.M.M.; GUTIERREZ, F.R.S.; MAIA, F.L.; MILANEZI, C.M.; SILVA, G.K.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.S. IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, e604, 2010.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THERY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.621-667, 2002.

HAASE, R.; RICHTER, K.; PFAFFINGER, G.; GILLES COURTOIS, G.; RUCKDESCHEL, K. *Yersinia* Outer Protein P Suppresses TGF- β -Activated Kinase-1 Activity to Impair Innate Immune Signaling in *Yersinia* enterocolitica-Infected Cells. **J Immunol**, v.175, p.8209-8217, 2005.

HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY, T. L.; WEAVER, C. T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v. 6, p.1123–1132, 2005.

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

HEATH, W. R.; BELZ, G. T.; BEHRENS, G. M.; SMITH, C. M.; FORECHAN, S. P.; PARISH, I. A.; DAVEY, G. M.; WILSON, N. S.; CARBONE, F. R.; VILLADANGOS, J. A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. **Immunol Rev**, v.199, p.9-26, 2004.

HEESEMAN, J.; SING, A.; TRÜLSCH, K. *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptative immune defense. **Curr Opin Immunol**, v.9, p55-61, 2006.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v.299, p.1057-1061, 2003.

HOUDE, M.; BERTHOLET, S.; GAGNON, E.; BRUNET, S.; GOYETTE, G.; LAPLANTE, A.; PRINCIOTTA, M. F.; THIBAUT, P.; SACKS, D.; DESJARDINS, M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. **Nature**, v.425, p.402-406, 2003.

HUBER, S.; GAGLIANI, N.; ESPLUGUES, E.; O'CONNOR JR, W.; HUBER, F J.; CHAUDHRY, A.; KAMANAKA, M.; KOBAYASHI, Y.; BOOTH, C. J.; RUDENSKY, A. Y.; BATTAGLIA, M.; RONCAROLO, M. G.; FLAVELL, R. A. Th17 cells express

- interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10 dependent manner. **Immunity**, v.34, p.554-565, 2011.
- IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 T helper cells. **Cell**, v.126, p.1121-1133, 2006.
- JR-SHIUAN, L.; LAWRENCE, W. K.; FRANK, M. S.; STEPHEN, T. S. IL-17 Contributes to Cell-Mediated Defense against Pulmonary *Yersinia pestis* Infection. **J Immunol**, v.186, p.1675-1684, 2011.
- JUNG, S.; UNUTMAZ, D.; WONG, P.; SANO, G.; DE LOS SANTOS, K.; SPARWASSER, T.; WU S.; VUTHOORI S.; KO, K.; ZAVALA, F.; PAMER, E. G.; LITTMAN, D. R.; LANG, R. A. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. **Immunity**, v.17, p.211-220, 2002.
- KADOWAKI, N.; HO, S.; ANTONENKO, S.; WAAL MALEFYT, R. DE.; KASTELEIN, A.; BAZAN, F.; LIU, Y. J. Subsets of human dendritic cell precursors express different Tolllike receptors and respond to different microbial antigens. **J Exp Med**, v.194, p.863-869, 2001.
- KERSCHEN, E. J.; COHEN, D. A.; KAPLAN, A. M.; STRALEY, S. C. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. **Infect Immun**, v.72, p.4589-4602, 2004.
- KRAMER, U.; WIEDIG, C. A. *Y. enterocolitica* translocated Yops impair stimulation of T-cells by antigen presenting cells. **Immunol Lett**, v.100, p.130-138, 2005.
- KRUEGER, G. G. LANGLEY, R. G.; LEONARDI, C.; YEILDING, N.; GUZZO, C.; WANG, Y.; DOOLEY, L. T.; LEBWOHL, M. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. **N Engl J Med**, v.356, p.580-592, 2007.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A.; JAGER, A.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. **Nature**, v.448, p.484-487, 2007.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, v.27, p.485-517, 2009.
- LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses: lineages, plasticity and kinetics. **Curr Opin Immunol**, v.13, p.291-298, 2001.
- LEXBERG, M. H.; TAUBNER, A.; FORSTER, A.; ALBRECHT, I.; RICHTER, A.; KAMRADT, T.; RADBRUCH, A.; CHANG, H. D. Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. **Eur J Immunol**, v.38, p.2654-2664, 2008.
- LIAN, C. J.; HWANG, W. S.; PAI, C. H. Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in *Yersinia enterocolitica*. **Infect Immun**, v.55, p.1176-1183, 1987.

- LIANG, F.; HUANG, Z.; LEE, S. Y.; LIANG, J.; IVANOV, M. I. Aurintricarboxilic acid blocks in vitro and in vivo activity of YopH, an essential virulent factor of *Yersinia pestis*, the agent of plague. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.41734-41741, 2003.
- LINDLEY, S.; DAYAN, C. M.; BISHOP, A.; ROEP, B. O.; PEAKMAN, M.; TREE, T. I. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v.54, p.92-99, 2005.
- LOGSDON, L. K.; MECSAS, J. the proinflammatory response induced by wild-type *Yersinia pseudotuberculosis* infection inhibits survival of yop mutants in the gastrointestinal tract and peyer's patches **Infect Immun**, v.74, p.1516-1527, 2006.
- LOUTEN, J.; BONIFACE, K.; DE WAAL MALEFYT R. Development and function of TH17 cells in health and disease. **J Allergy Clin Immunol**, v.5, p.1004-1011, 2009.
- MCNALLY, A.; LA RAGIONE, R.M.; BEST, A.; MANNING, G.; NEWELL, D.G. An aflagellate mutant *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain displays altered invasion of epithelial cells, persistence in macrophages, and cytokine secretion profiles in vitro. **Microbiology**, v.153, p.1339-1349, 2007.
- MAILLIARD, R. B.; WANKOWICZ-KALINSKA, A.; CAI, Q.; WESA, A.; HILKENS, C. M.; KAPSENBERG, M. L.; KIRKWOOD, J. M.; STORKUS, W. J.; KALINSKI, P. Type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. **Cancer Res**, v.64, p.5934-5937, 2004.
- MALDONADO-LOPEZ, R.; MALISZEWSKI, C.; URBAIN, J.; MOSER, M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. **J Immunol**, v.167, p.4345-4350, 2001.
- MALLOWANY, J. I.; MCCORMICK, S.; SANTOSYOSSO, M.; ZHANG, X.; AOKI, N.; NAGAI, P.; WANG J.; LEITCH, J.; WNA, Y. Development of cell-based tuberculosis vaccines: genetically modified dendritic cell vaccine is a much more potent activator of CD4 and CD8 T cells than peptide- or protein-loaded counterparts. **Mol Ther**, v.13, p.766-75, 2006.
- MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D. R. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. **Nat. Immunol.**, v.9, p.641-649, 2008.
- MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WAHL, S. M.; SCHOEB, T. R.; WEAVER, C. T. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v.441, p.231-234, 2006.
- MATTEOLI, G.; FAHL, E.; WARNKE, P.; MÜLLER, S.; BONIN, M.; AUTENRIETH, I. B.; BOHN, E. Role of IFN-gamma and IL-6 in a protective immune response to *Yersinia enterocolitica* in mice. **BMC Microbiology**, v.8, p. 1-12, 2008.
- MECSAS, J.; BILIS, I.; FALKOW, S. Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice

- on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. **Infect Immun**, v.69, p.2779-2787, 2001.
- MONACK, D. M.; MECSAS, J.; BOULEY, D.; FALKOW, S. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. **J Exp Med**, v.188, p.2127-2137, 1998.
- 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, p.1669-1676, 1998.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, p.55, 1983.
- MOTIN, V.L.; NAKAJIMA, R.; SMIRNOV, G. B.; BRUBAKER, R. R. Passive immunity to yersiniae mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide. **Infect Immun**, v.62, p.4192-4201, 1994
- MUKHERJEE, S.; ORTH, K. *In Vitro* Signaling by MAPK and NFkB Pathways Inhibited by *Yersinia* YopJ. **Methods Enzymol**, v.438, p.343-353, 2008.
- NAVARRO, L.; ALTO, N. M.; DIXON, J. E. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. **Curr Opin Microbiol**, v.8, p.21-27, 2005.
- NEDIALKOV, Y.A.; MOTIN, V. L.; BRUBAKER, R. R. Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. **Infect Immun**, v.65, p.1196-1203, 1997.
- NIESS, J. H.; REINECKER, H. C. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. **Cell Microbiol**, v.8, p.558-564, 2006.
- NISHIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in tumor immunity. **Int J Cancer**, v.127, p.759-767, 2010.
- NG, W. F.; DUGGAN, P. J.; PONCHEL, F.; MATARESE, G.; LOMBARDI, G.; EDWARDS, A. D.; ISAACS, J. D.; LECHLER, R. I. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. **Blood**, v.9, p.2736-2744, 2001.
- O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat Med**, v.10, p.801-805, 2004.
- PAGLIA, M.G.; D'AREZZO, S.; FESTA, A.; DEL BORGIO, C.; LOIACONO, L.; ANTINORI, A.; ANTONUCCI, G.; VISCA P. *Yersinia pseudotuberculosis* septicemia and HIV. **Emerg Infect Dis**, v.11, p.1128-1130, 2005.
- PARK, H.; LI, Z.; YANG, X.O.; CHANG, S.H.; NURIEVA, R.; WANG, Y.H.; WANG, Y.; HOOD, L.; ZHU, Z.; TIAN, Q.; DONG, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol**, v.6, p.1133-1141, 2005.

- PARRISH-NOVAK, J.; DILLON, S.R.; NELSON, A.; HAMMOND, A.; SPRECHER, C.; et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. **Nature**, v.408, p.57-63, 2000.
- PULENDRAN, B. Variagation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. **J Immunol**, v.173, p.2457-2465, 2005.
- RAGHAVAN, S.; FREDRIKSSON, M.; SVENNERHOLM, A. M.; HOLMGREN, J.; SURI-PAYER, E. Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in Helicobacter pylori-infected mice. **Clin Exp Immunol**, v.132, p.393-400, 2003.
- ROBINS-BROWNE, R. M.; TZIPORI, S.; GONIS, G.; HAYES, J.; WITHERS, M.; PRPIC, J. K. The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. **J Med Microbiol**, v.19, p.297-308, 1985.
- ROMAGNANI, S. Regulation of the T cell response. **Clin Exp Allergy**, v.36, p.1357–1366, 2006.
- ROSSI, M.; YOUNG, J. W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. **J Immunol**, v.175, p.1373-1381, 2005.
- SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, v.133, p.775-787, 2008.
- SATHER, B. D.; TREUTING, P.; PERDUE, N.; MIAZGOWICZ, M.; FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y.; CAMPBELL, D. J. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. **J Exp Med**, v.204, p.1335-1347, 2007.
- SODHI, A.; SHARMA, R. K.; BATRA, H. V. *Yersinia* rLcrV and rYopB inhibits the activation of murine peritoneal macrophages in vitro. **Immunol Lett**, v.99, p.146–152, 2005.
- SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Rev Immunol**, v.2, p.151-161, 2002.
- SIMONET, M.; RICHARD, S.; BERCHE, P. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. **Infect Immun**, v.58, p.841-845, 1990
- SING, A.; ROGGENKAMP, A.; GEIGER, A. M.; HEESEMANN, J. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. **J Immunol**, v.168, p.1315-1321, 2002
- SKRZYPEK, E.; MYERS-MORALES, T.; WTHITEHEARTS, S. W.; STRALEY, S. C. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eukaryotic cells. **Infect Immun**, v.71, p.937-947, 2003.
- SKURNIK, M.; ZHANG, L. Molecular genetics and biochemistry of *Yersinia* lipopolysaccharide. **APMIS**, v.104, p.849-872, 1996.

- STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v.21, p.685-711, 2003.
- STOCKINGER, B.; VELDHUEN, M. Differentiation and function of Th17 T cells. **Curr Opin Microbiol**, v.19, p.281–286, 2007.
- SUVAS, S.; ROUSE, B. T. Treg control of antimicrobial T cell responses **Curr Opin Microbiol**, v.18, p.344–348, 2006.
- SZABOLCS, P.; AVIGAN, D.; GEZELTER, S.; CIOCON, D. H.; MOORE, M. A. S.; STEINMAN, R. M.; YOUNG, J. W. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-CFU intermediate. **Blood**, v.87, p.4520-4530, 1996.
- TORCHINSKY, M. B.; BLANDER, J. M. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger. **Cell Mol Life Sci.**, v.9, p.1407-1421, 2010.
- TRINCHIERI, G.; Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu Rev Immunol**, v.13, p.251-276, 1995.
- TRÜLZSCH, K.; SPORLEDER, T.; RUCKDESCHEL, K.; HOFFMANN, R.; HEESEMANN, J.; RUSSMANN, H. *Yersinia* outer protein p inhibits cd8 t cell priming in the mouse infection model. **J Immunol**, v.174, p.4244-4251, 2005.
- TUMITAN, A. R. P.; MONNAZZI, L. G. S.; GHIRALDI, F. R.; CILLI, E. M.; MEDEIROS, B. M. M. Pattern of macrophage activation in *Yersinia*-resistant and *Yersinia*-susceptible strains of mice. **Microbiol Immunol**, v.51, p.1021-1028, 2007.
- UENO, H.; KLECHEVSKY, E.; MORITA, R.; ASPORD, C.; CAO, T.; MATSUI, T.; DI PUCCHIO, T.; CONNOLLY, J.; FAY, J. W.; PASCUAL, V.; PALUCKA, A. K.; BANCHEREAU, J. Dendritic cell subsets in health and disease. **Immunol Rev**, v.219, p.118-142, 2007.
- VAN DE VEERDONK, F. L.; GRESNIGT, M. S.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. **BMB Rep**, v.12, p.776-787, 2009.
- VIBOUD, G. I.; BLISKA, J. B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. **Annu Rev Microbiol**, v.59, p.69–89, 2005
- VIGLIETTA, V.; BAECHER-ALLAN, C.; WEINER, H. L.; HAFLER, D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **J Exp Biol Med**, v.199, p.971–979, 2004.
- WILKE, C. M.; BISHOP, K.; FOX, D.; ZOU, W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. **Trends Immun**, v.32, p. 603-611, 2011.
- XU, L.; KITANI, A.; FUSS, I.; STROBER, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are selfinduced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGFbeta. **J Immunol**, v.178, p.6725-6729, 2007.

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

ZHENG, Y.; VALDEZ, P. A.; DANILENKO, D. M.; HU, Y.; SA, S. M.; GONG, Q.; ABBAS, A. R.; MODRUSAN, Z.; GHILARDI, N.; DE SAUVAGE, F. J.; OUYANG, W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. **Nat Med**, v.14, p.282-289, 2008.

ZHENG, S. G.; WANG, J. H.; STOHL, W.; KIM, K. S.; GRAY, J. D.; HORWITZ, D. A. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. **J Immunol**, v.176, p.3321–3329, 2006.

ZHONG, Y.; CANTWELL, A.; DUBE, P. H. Transforming growth factor-beta and CD25 are important for controlling systemic dissemination following *Y. enterocolitica* infection of the gut. **Infect Immun**, v.78, p.3716-3725, 2010.

YAMAGUCHIA, T.; WINGA, J. B.; SAKAGUCHIA, S. Two modes of immune suppression by Foxp3+ regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. **Seminars immune**, v.23, p.424– 430, 2011.

YAO, B. T.; MECSAS, J.; HEALY, J. I.; FALKOW, S.; CHIEN, Y. H. Suppression of T and B Lymphocyte Activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Factor, YopH. *J. Exp. Med*, v.190, p. 1343–1350, 1999.

YOKOSUKA, T.; KOBAYASHI, W.; TAKAMATSU, M.; SAKATA-SOGAWA, K.; ZENG, H.; HASHIMOTO-TANE, A.; YAGITA, H.; TOKUNAGA, M.; SAITO, T. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. **Immunity**, v.3, p.326-339, 2010.

Manuscript

Yop Effector Proteins from *Yersinia pseudotuberculosis* Impair Dendritic Cell Activation

Aline Tansini

Felipe Fortino Verdan da Silva

Rubens Rodrigues dos Santos Junior

Marisa Campos Polesi Placeres

Beatriz Maria Machado de Medeiros

Iracilda Zeppone Carlos

UNESP - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Araraquara, SP, Brazil, alinetansini@yahoo.com.br

Abstract. *Yersinia pseudotuberculosis* can inhibit multiple stages of dendritic cell (DC) function, including antigen uptake and degradation, maturation and subsequent T-cell activation. In this study, we analyzed whether *Y. pseudotuberculosis* infection and Yop effector proteins play a role in the maturation and immunostimulatory capacity of DCs originating from differentiated bone marrow precursors from BALB/c or C57BL/6 mice. We found that *Y. pseudotuberculosis* reduces major histocompatibility complex (MHC) class II, CD80 and CD86 expression in both strains of mice, although the bacteria had a greater effect in BALB/c mice. We observed that YopE could interfere with the expression of maturation markers, which indicates a possible role for YopE in the inhibition of DC maturation. Infection by *Y. pseudotuberculosis* leads to a decrease in the immunostimulatory capacity of DCs, with T-cell proliferation significantly reduced on day 4 of co-culture. Stimulation of T-cells by DCs infected with *YopJ*, *YopE* and *YopH* mutants have a less

robust effect on T-cell proliferation. The reduction in the expression of maturation markers and diminished immunostimulatory capacity of infected DCs may contribute to the ability of *Y. pseudotuberculosis* to evade adaptive immune responses and subsequently inhibit the host's ability to clear the infection.

1. Introduction

Yersinia pseudotuberculosis is an enteropathogen that causes self-limiting gastroenteritis and lymphadenitis in humans. All pathogenic *Yersinia* contain an extrachromosomal 70 Kb plasmid essential for the pathogenicity of the bacteria that encodes the *Yersinia* outer proteins (YpkA/YopO, YopE, YopH, YopJ/YopP, YopM and YopT) and the protein microinjection apparatus, the type III secretion system (TTSS), which is used to translocate the effector proteins from the bacterial cytoplasm into the cytosol of eukaryotic cells (Navarro et al. 2005). Once inside the cell, the Yop effector proteins are involved in inhibiting phagocytosis by disrupting the cytoskeleton of immune cells (Rosqvist et al. 1990, Grosdent et al. 2002) inhibiting or downregulating proinflammatory responses by interfering with host cell signaling pathways (Bliska 2006) and inducing the apoptosis of macrophages (Monack et al. 1997) and DCs (Erfurth et al. 2004, Brodsky and Medzhitov 2008).

T-cell responses are crucial for the elimination of *Yersinia* infection. However, infection by *Yersinia* can inhibit the presentation of its antigens by antigen presenting cells (APCs) and subsequently impair T-cell activation (Navarro et al. 2005). DCs are the most potent antigen-presenting cells of the immune system; these cells are able to stimulate T-cells and influence the adaptive immune response (Villadangos and Schnorrer 2007).

Enteropathogenic *Yersinia* spp. directly affect DCs. In *Y. pseudotuberculosis*, YopH and YopE are the major virulence factors that affect the DC cytoskeleton (Viboud and Bliska 2005, Vlahou et al. 2009). YopJ plays an essential role in the inhibition of DC-

mediated inflammatory responses (Adkins et al. 2007) via the induction of apoptosis and the reduction of surface molecule expression (Erfurth et al. 2004).

Previous findings demonstrated that *Y. enterocolitica* induces defective DC maturation and inhibits DC phagocytic capacity (Erfurth et al. 2004, Adkins et al. 2007), thereby impairing T-cell activation. In this study, we investigate whether *Y. pseudotuberculosis* infection and Yop effector proteins affect the maturation and immunostimulatory capacity of DCs.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Six-week-old C57BL/6 and BALB/c female mice were purchased from CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP, SP, Brazil. All mice were maintained in isolators under specific-pathogen-free conditions. The study was approved by the School Committee for Ethics in Animal Experimentation, UNESP at Araraquara.

2.2. Cell cultures and experimental infection

DCs were generated using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) according to the protocol previously described (Mallowany et al. 2006) and were used for experiments on day 6 of culture. Bone marrow-derived DCs were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma), 100 U/ml penicillin and streptomycin (Invitrogen), 2 mM glutamine (Invitrogen), 50 mM 2-mercaptoethanol (Sigma) and 1 mM sodium pyruvate (Sigma). DCs were infected *in vitro* at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 with *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB1 (pYV+), YpIIIpIB232 (*YopJ* mutant), YpIIIpIB143 (*YopM* mutant), YpIIIpIB29 (*YopH* mutant) and YpIIIpIB522 (*YopE* mutant). These strains were generously provided by Dr. Hans Wolf-Watz (Umeå University,

Sweden). The cell viability of infected and uninfected DCs was determined by trypan blue exclusion assay.

2.3. Analysis of surface molecules by flow cytometry

The DCs were phenotypically characterized by flow cytometry for the presence of the mouse DC surface marker CD11c. The maturation markers MHC class II, CD80 and CD86 were analyzed after exposure of DCs to bacteria or 10 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* O111:B4 (Sigma) for 60 min in antibiotic-free culture media at 37°C. Gentamicin (100 µg/ml; Sigma) was subsequently added to kill any remaining extracellular bacteria, followed by 24 h of incubation.

2.4 T-cell enrichment

Lymphocytes were obtained from the spleens of mice immunized with heat-killed *Yersinia* (HKY) using the Pan T-Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's instructions. The cell enrichment process was accompanied by flow cytometry using anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 (BD-PharMingen). The final cell suspension contained approximately 80% CD3, 38% CD4 and 50% CD8.

2.5. Antigen-specific activation of T-cells

T-cell enriched fractions were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^5 cells per well and co-cultured with infected or uninfected DCs (2×10^4 cells/well) in the presence of HKY. After 4 days, T-cell proliferation was evaluated by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay (Mosmann 1983).

2.6. Statistical analysis

The data were analyzed using Student's t-test with the Origin statistical program, version 8.0.

3. Results and Discussion

3.1. Culture of DCs with different bacterial strains of *Y. pseudotuberculosis*

DCs were obtained from differentiated bone marrow precursors of BALB/c or C57BL/6 mice. The proportion of CD11c⁺ cells after 8 days of *in vitro* differentiation was 76±1.8% and 71±2.2% from C57BL/6 and BALB/c mice, respectively (Fig. 1A). There was a decrease in the number of viable DCs present after *Y. pseudotuberculosis* infection in both mouse strains. The YpIIIpIB1 strain resulted in a higher percentage of cell death, approximately 40% of the total number of cells, compared with uninfected DCs. In contrast, DCs infected with the *YopJ* mutant showed the lowest number of dead cells (Fig. 1B).

The induction of host cell death is thought to be an important virulence characteristic that can promote the survival of many pathogenic bacteria. YopP, which is homologous to YopJ of *Y. pseudotuberculosis*, induces DC death through the inhibition of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), predominantly p38 and jun N-terminal kinase (JNK) (Adkins et al. 2008). Previously, it has been reported that YopJ of *Y. pseudotuberculosis* mediates the inhibition of MAP kinase kinase (MKKs) and the inhibition of factor nuclear kappa B (NF-κB) signaling pathways, which may be involved in cell death (Bliska 2006, Mukherjee et al. 2006). Moreover, DC death may be caused by YopJ after *Y. pseudotuberculosis* infection, as illustrated by the observation that the cytotoxicity of *Y. pseudotuberculosis* toward DCs can be significantly increased by inducing high levels of YopJ translocation (Brodsky and Medzhitov 2008).

3.2. Surface molecule expression in DCs after infection with *Y. pseudotuberculosis*

To assess the influence of *Y. pseudotuberculosis* infection on the maturation of DCs, the expression levels of MHC class II and the costimulatory molecules CD80 and CD86 were analyzed by flow cytometry. Our results showed an increase in the expression of MHC class II after infection with *Y. pseudotuberculosis* that carry the virulence plasmid compared with uninfected DCs. However, MHC class II expression of DCs infected with YPIIIpIB1 was less than that observed following infection with either the *YopE* mutant or in DCs treated with LPS, and this difference was more evident in DCs from BALB/c mice. The analysis of CD80 and CD86 expression showed that *Y. pseudotuberculosis* could impair the upregulation of these molecules. For instance, DCs from both mouse strains exhibited reduced CD80 and CD86 expression after infection with *YopH* and *YopM* mutant strains and, to a lesser extent, in the *YopE* mutant (Fig. 2). These results suggest that *Y. pseudotuberculosis* can inhibit DCs maturation and that Yop effector proteins play a role in this inhibition.

DC maturation is crucial for their ability to activate T-cells (Autenrieth et al. 2010), and infection of DCs with *Y. enterocolitica* impairs MHC class II, CD80, CD86 and CD40 expression via a mechanism that involves YopP (Erfurth et al. 2004, Autenrieth et al. 2010). The YopJ virulence factor from *Y. pseudotuberculosis* is also known to inhibit DC maturation, as illustrated by decreased expression of CD80, CD83 and CD86 (Fahlgren et al. 2009). Here, we show that YopE effector proteins may act in concert with YopJ proteins to impact DC maturation.

3.3. T-cell activation after infection of DCs with *Y. pseudotuberculosis*

The capacity of infected or uninfected DCs from C57BL/6 or BALB/c mice to present the HKY antigen to T-cells and induce their proliferation was investigated using the MTT assay.

We observed reduced T-cell proliferation following activation by YPIIIpIB1-infected DCs, indicating a decrease in DC immunostimulatory capacity. T-cells obtained from BALB/c mice exhibited less proliferation compared with cells from C57BL/6 mice. The impaired T-cell proliferation was not observed following stimulation of T-cells by DCs infected with *YopJ*, *YopE* and *YopH* mutants (Fig. 3).

T-cell responses are essential for the resolution of the *Y. pseudotuberculosis* infection. The perturbation of DC function can inhibit T-cell activation and subsequently impair bacterial clearance. Enteropathogenic *Yersinia* strains are able to change the morphology of DCs (Shoppet and Huppertz 2001), affect antigen uptake and degradation (Adkins et al. 2008, Autenrieth et al. 2010), impair the processing of antigens (Kramer and Wiedig 2005) and inhibit T-cell proliferation (Erfurth et al. 2004, Fahlgree et al. 2009). In this study, we found that *YopJ*, *YopE* and *YopH* may contribute to the suppression of DCs.

4. Conclusion

In conclusion, our study demonstrates that *Y. pseudotuberculosis* infection is able to impair DC function, including survival, maturation and the ability to activate T-cells, through a mechanism that likely involves the Yop effector proteins. Furthermore, DC obtained from BALB/c mice were more affected by *Y. pseudotuberculosis* infection than cells from C57Bl/6 mice, indicating that strain differences may also play a role in this observation.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP/Brazil (grant number 09/00984-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/Brazil.

References

- Adkins I, Köberle M, Gröbner S et al. (2007) *Yersinia* outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int J Med Microbiol* 297:235-244.
- Adkins I, Köberle M, Gröbner S et al. (2008) *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. *Microbes Infect* 7:798-806.
- Autenrieth SE, Linzer T-R, Hiller C et al. (2010) Immune Evasion by *Yersinia enterocolitica*: Differential Targeting of Dendritic Cell Subpopulations In Vivo. *PLoS Pathog* 6:e1001212.
- Bliska JB (2006) *Yersinia* inhibits host signaling by acetylating MAPK kinases. *ACS Chem Biol* 1:349–351.
- Brodsky IE, Medzhitov R (2008) Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits in vivo cell death but enhances bacterial virulence. *PLoS Pathog* 4:e1000067.
- Erfurth SE, Gröbner S, Kramer U et al. (2004) *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* 72:7045-7054.
- Fahlgren A, Westermark L, Akopyan K et al. (2009) Cell type-specific effects of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence effectors *Cell Microbiol* 12:1750-1767.
- Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP et al. (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 70:4165-4176.
- Kramer U, Wiedig CA (2005) *Y. enterocolitica* translocated Yops impair stimulation of T-cells by antigen presenting cells. *Immunol Lett* 100:130-138.
- Mallowany JI, McCormick S, Santosyosso M et al (2006) Development of cell-based tuberculosis vaccines: genetically modified dendritic cell vaccine is a much more potent

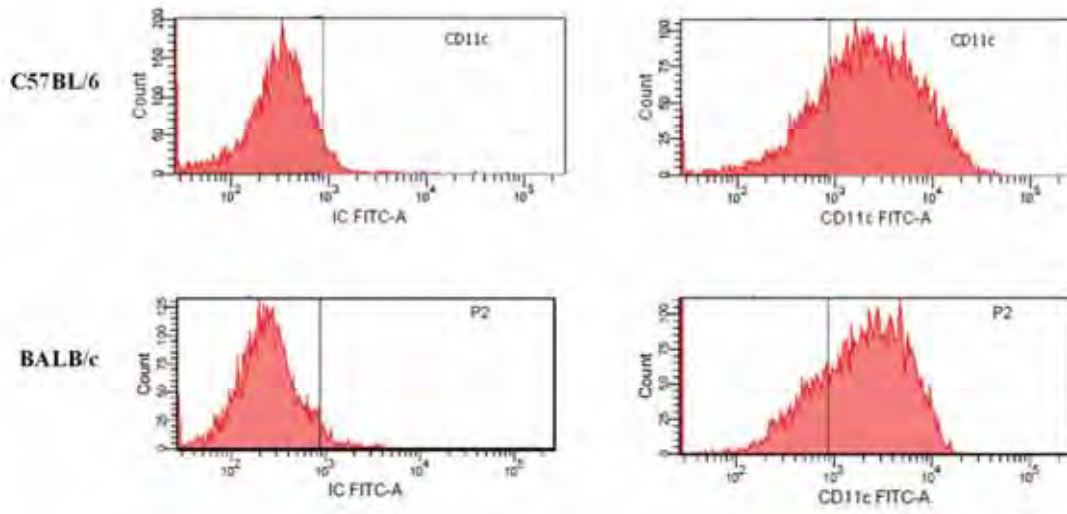
- activator of CD4 and CD8 T cells than peptide- or protein-loaded counterparts. *Mol Ther* 13:766-775.
- Monack DM, Meccas J, Ghori N et al. (1997) *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci* 94:10385-10390.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Mukherjee S, Keitany G, Li Y et al. (2006) *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312:1211-1214.
- Navarro L, Alto NM, Dixon JE (2005) Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr Opin Microbiol* 8:21-27.
- Rosqvist R, Forsberg A, Rimpilainen M et al. (1990) The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol* 4:657-667.
- Schoppet M, Huppertz H-I (2001) Differential Stimulation of Helper and Cytotoxic T Cells by Dendritic Cells after Infection by *Yersinia enterocolitica* in Vitro *Cell Immunol* 1:43-51.
- Viboud GI, Bliska JB (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 59:69-89.
- Villadangos JA, Schnorrer P (2007) Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7:543-555.
- Vlahou G, Schmidt O, Wagner B et al. (2009) *Yersinia* outer protein YopE affects the actin cytoskeleton in *Dictyostelium discoideum* through targeting of multiple Rho family GTPases. *BMC Microbiol* 9:138.

Fig 1. Viability of DCs after incubation with *Y. pseudotuberculosis*. (A) Flow cytometric analysis of DCs following 8 days of *in vitro* differentiation in the presence of recombinant mouse GM-CSF. CD11c was used as marker for DCs. (B) DCs from C57BL/6 and BALB/c mice were incubated with the indicated *Yersinia* strains (MOI 10:1), 10 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) or medium (control). The antibiotic was added 1 h after infection to kill any remaining extracellular bacteria, followed by 24 h incubation. The number of viable cells was determined for trypan blue exclusion assay. The results are representative of two independent experiments and are presented as the mean ± S.D. of triplicate observations. *p<0.05

Fig. 2. The expression of DC surface molecules after infection with *Y. pseudotuberculosis*. DCs from C57BL/6 and BALB/c mice were incubated with the indicated *Yersinia* strains (MOI 10:1), 10 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) or medium (control). The antibiotic was added 1 h after infection to kill any remaining extracellular bacteria, followed by 24 h incubation, as in Figure 1. DC surface expression levels of MHC class II, CD80 and CD86 were analyzed by flow cytometry. The results are representative of two independent experiments and are presented as the mean ± S.D. *p<0.05

Fig. 3. Proliferation of T-cells after co-culture with DCs infected with *Y. pseudotuberculosis*. T-cell enriched fractions were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^5 cells per well and co-cultured with DCs (2×10^4 cells/well) infected with the indicated *Yersinia* strains (MOI 10:1) or uninfected cells (control) for 4 days in the presence of HKY. T-cell proliferation was measured by the MTT assay. The results are expressed as the OD at 540 nm, representing the production of formazan, and are presented as the mean ± S.D. of quadruplicate observations. *p<0.05

(A)



(B)

