



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

Jose Mario Lourenço Maia

“Influência das proteínas “Yops” de *Yersinia pseudotuberculosis*
na resposta imune humoral murina.”

Araraquara
2006



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

José Mário Lourenço Maia

**“Influência das proteínas “Yops” de *Yersinia pseudotuberculosis*
na resposta imune humoral murina.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, área de imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas, sub-área Imunologia.

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

**Araraquara
2006**

Ficha Catalográfica

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

Maia, José Mário Lourenço
M217i Influência das proteínas “Yops” de *Yersinia pseudotuberculosis* na resposta imune humoral murina / José Mário Lourenço Maia. – Araraquara, 2006.
57 f.

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

Orientadora: Beatriz Maria Machado de Medeiros

1. *Yersinia pseudotuberculosis*. 2. Yops. 3. Linfócitos B. 4. Imunoglobulinas.
I. Medeiros, Beatriz Maria Machado, orient. II. Título.

CDD: 616.075

CAPES: 40300005



COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

Prof.a Dr.a Dagmar Ruth Stach - Machado (Membro Titular)

**Araraquara
2006**

Agradecimentos

A Deus por iluminar e conduzir minha vida.

A meus pais por me guiarem meus primeiros passos e pelo apoio sempre de bom grado.

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

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

Ao amigo Luis Gustavo Silva Monnazzi por sua amizade, dedicação, incentivo e apoio em todas as horas.

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

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Biotério Central da UNICAMP-CEMIB pelo fornecimento dos camundongos utilizados na pesquisa.

Aos amigos José Carlos Rebuglio, Maria Cecília Guedes e Gabriela Celebrone pelo carinho e companheirismo.

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

Sumário

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I- Introdução | 11 |
| II- Objetivos | 17 |
| III- Materiais e Métodos | 18 |
| 1- Animais de experimento | 18 |
| 2- Amostras Bacterianas | 18 |
| 3- Infecção experimental dos animais com as amostras bacterianas | 19 |
| 3.1- Reativação das amostras de <i>Yersinia</i> | 19 |
| 3.2- Determinação da DL 50 | 19 |
| 3.3- Esquema de infecção | 20 |
| 4- Determinação do número de células secretoras de Imunoglobulinas (inespecíficas e específicas), presentes no baço dos animais infectados, através da técnica de ELISPOT | 20 |
| 4.1- Obtenção das células esplênicas | 20 |
| 4.2- Viabilidade das células esplênicas | 21 |
| 4.3- “ELISA spot assay” ELISPOT | 21 |
| 4.3.1- Preparo do extrato bruto da amostra de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 21 |
| 4.3.2- Obtenção de “Yops” de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YpIIIpB102 | 21 |
| 4.3.3- Teste de ELISPOT | 22 |
| 5- Detecção de anticorpos específicos no soro dos camundongos, através do teste ELISA | 23 |
| 5.1- Obtenção dos soros | 23 |
| 5.2- Antígenos específicos | 23 |
| 5.2- Teste ELISA | 23 |
| 6- Detecção de auto-anticorpos no soro dos camundongos, através do teste DOT-BLOT | 24 |
| 6.1- Auto-antígenos | 24 |
| 6.2- Teste DOT-BLOT | 24 |
| 7- Análise Estatística | 25 |
| IV- Resultados | 26 |
| 1- Determinação da DL 50 | 26 |
| 2- Determinação do número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (inespecíficas e específicas) | 27 |
| 3- Detecção de anticorpos específicos anti- <i>Yersinia</i> | 36 |
| 4- Detecção de auto-anticorpos | 38 |
| 5- Ocorrência de alterações patológicas | 40 |
| V- Discussão | 41 |
| VI- Conclusões | 49 |
| VII- Referências Bibliográficas | 50 |

RESUMO

As proteínas “Yops” formam uma família de proteínas secretadas por *Yersinia spp* que incluem efetores intracelulares (seis efetores foram identificados: YopE, YopH, YopM, YpkA/YopO, YopJ/YopP e YopT) e vários componentes do aparato de secreção-translocação que são liberado pela bactéria sob quelação de Ca^{2+} . As “Yops” efetoras têm sido relacionadas a uma série de propriedades de virulência, incluindo resistência à fagocitose, citotoxicidade e desfosforilação de proteínas do hospedeiro. Porém, a interação das “Yops” de *Yersinia* com a resposta imune específica do hospedeiro não está bem esclarecida. O objetivo deste estudo foi investigar o papel imunomodulador das “Yops” secretadas por amostras de *Yersinia pseudotuberculosis* sobre a produção de anticorpos e autoanticorpos por linfócitos B. Para tanto camundongos foram infectados com uma amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis* (YpIII) e com amostras mutantes, defectivas na secreção de determinadas “Yops” efetoras (YopH, YopE, YopM, YpkA e YopJ). Foram obtidas células esplênicas destes animais, e as células secretoras de imunoglobulinas inespecíficas e específicas (anti-*Yersinia* e anti-“Yops”) foram quantificadas através do teste ELISPOT. A presença de anticorpos específicos anti-*Yersinia* e anti-“Yops” no soro dos animais infectados foi analisada através do teste ELISA. A presença de auto-anticorpos séricos foi analisada através do teste DOT-BLOT. Não se observou nenhuma diferença entre o número de células secretoras de imunoglobulinas (Igs) inespecíficas dos animais inoculados com a amostra selvagem, YpIII pIB102 (wt), em relação aos controles. Já a amostra YpIII pIB522, embora defectiva na secreção de YopE, provocou uma redução dos linfócitos B secretores de IgG2a, IgM e IgA. A única ativação observada ocorreu para o isotipo IgG2a (aumento de 1,7 vezes) no 7º dia após infecção. A amostra YopH-, YpIII pIB29, provocou um aumento na secreção de Igs dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG3, que variou de 1,7 à 2,4 vezes, no 7º e 14º dias após infecção. Já a amostra YopJ-, YpIII pIB252, causou um aumento no número de células secretoras de Igs dos isotipos IgG3 e IgM, de respectivamente 2,8 e 1,5 vezes em relação aos animais controles e uma diminuição de 1,3 vezes no número de células secretoras do isotipo IgG1, no 21º dia após infecção. A amostra YopM-, YpIII pIB141, provocou uma redução no número de linfócitos

secretoras de Igs inespecíficas dos isotipos IgG2b (redução de 1,6 vezes), IgM (redução de 4,4 vezes) e IgA (redução de 2,5) no 21o dia após infecção e de IgG1 (redução de 2,4 vezes), IgG3 (redução de 2,6 vezes) e IgA (redução de 3,8 vezes) no 28o dia após infecção, em relação aos controles. Já para o isotipo IgG2a, não foi observada nenhuma diferença no número de linfócitos secretoras desse isotipo em relação aos controles. A amostra YpkA-, YpIII pIB44, causou um aumento no número de linfócitos secretoras de Igs inespecíficas dos isotipos IgG2b (aumento de 1,4 vezes) e IgM (aumento de 1,9 vezes) no 21o dia após infecção, e uma redução no número de linfócitos secretoras de IgA (redução de 1,4 vezes) no 14o dia após infecção. Para os isotipos IgG1, IgG2a e IgG3, não foi observada nenhuma diferença no número de linfócitos secretoras desses isotipos em relação aos controles. Células secretoras de imunoglobulinas específicas anti-*Yersinia* e anti-Yops foram detectadas apenas nos animais infectados com a amostra selvagem e com as amostras mutantes YopM- e YpkA-. Foi observado um aumento crescente no título de anticorpos séricos anti-*Yersinia* e anti-"Yops", do isotipo IgG, com pico no 28o dia após infecção, apenas com a amostra selvagem. Anticorpos do isotipo IgM foram observados apenas um no 7º dia após infecção. No soro destes animais também foram detectados auto-anticorpos dirigidos contra fosforilcolina, mielina, miosina, tireoglobulina e cardiolipina. Concluimos que, embora *Y. pseudotuberculosis* não tenha provocado ativação policlonal de linfócitos B, ela estimulou alguns clones autorreativos.

Palavras-chave: *Yersinia pseudotuberculosis*; Yops; Linfócitos B; Imunoglobulinas.

Abstract

The "Yops" proteins form a protein family secreted by *Yersinia spp* that includes intracellular effectors (six effectors had been identified: YopE , YopH, YopM, YpkA/YopO, YopJ/YopP and YopT) and some components of the secretion-translocation apparatus that are released by the bacteria under Ca²⁺ quelation. The "Yops" effectors have been related to a series of virulence properties, including resistance to phagocytosis, cytotoxicity and desphosphorylation of host proteins. However, the interaction of the *Yersinia* "Yops" with the host specific immune response is not well defined. The objective of this study was to investigate the immunomodulatory role of the "Yops" secreted by strains of *Yersinia pseudotuberculosis* on the production of antibodies and autoantibodies by splenic B lymphocytes. To this end, mice were infected with wild-type *Y. pseudotuberculosis* (YpIII) or with mutant strains, unable to secrete specific "Yops" (YopH, YopE, YopM, YpkA and YopJ). Spleen cells were obtained, and the cells secreting nonspecific and specific immunoglobulins (anti-*Yersinia* and anti-"Yops") was quantified by the ELISPOT technique. The presence of anti-*Yersinia* and anti-"Yops" specific antibodies in infected mice serum was investigated by ELISA and the presence of autoantibodies by DOT-BLOT assay. It was not observed neither difference between the number of nonspecific Igs-secreting cells of the animals infected with YpIIIpIB102 (wt) in relation to the controls. The strain YpIII pIB522, although defective in YopE secretion, provoked a reduction in the B lymphocytes secreting IgG2a, IgM and IgA. The unique activation observed was that of IgG2a isotype (an increase of 1.7-fold) on the 7th day post infection. The YopH- strain, YpIII pIB29, provoked an increase in the number of IgG1-, IgG2a- and IgG3-secreting cells (between 1.4 to 2.4-fold), on the 7th and 14th days post infection. The YopJ- strain, YpIII pIB252, caused an increase in the IgG3- and IgM-secreting cells (2.8- and 1.5-fold, respectively, in relation to the controls), and an impairment of 1.3-fold in the IgG1-secreting cells, on the 21st day post infection. The YopM-strain, YpIII pIB141, provoked a reduction in the number of cells secreting nonspecific IgG2b (reduction of 1.6-fold), IgM (reduction of 4.4-fold) and IgA (reduction of 2.5-fold) on the 21st day post infection, and of IgG1 (reduction of 2.4-

fold), IgG3 (reduction of 2.6-fold) and IgA (reduction of 3.8-fold) on the 28th day post infection, in relation to the controls. It was not observed neither difference in the number of IgG2a-secreting cells in relation to the controls. The YpkA- strain, YpIII pIB44, caused an increase in the number of nonspecific IgG2b- (increase of 1.4-fold), and IgM-secreting cells (increase of 1.9-fold) on the 21st day post infection, and an impairment in the number of IgA-secreting cells (reduction of 1.4-fold) on the 14th day post infection. It was not observed neither difference in the number of IgG1-, IgG2a- and IgG3- secreting cells in relation to the controls. It was detected anti-*Yersinia* and anti-Yops specific Igs-secreting cells only in the animals infected with the wild type and the YopM- and YpkA- mutant strains. A progressive increase in the serum IgG-specific antibodies was observed, that peaked on the 28th day post infection, only in the animals infected with the wild type strain. IgM antibodies was produced only on the 7th day post infection. This strain provoked too the production of autoantibodies directed to phosphorylcholine, myelin, thyroglobulin and cardiolipin. It was concluded that although *Y pseudotuberculosis* did not provoked polyclonal activation of splenic B lymphocytes, it stimulated some autoreactive clones.

Key-words: *Yersinia pseudotuberculosis*; Yops; B-Lymphocytes ; Immunoglobulin.

I - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de uma doença infecciosa envolve interações complexas entre o microrganismo e o hospedeiro. Os principais eventos durante uma infecção incluem entrada do microrganismo, invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro, evasão dos mecanismos de imunidade do mesmo e agressão ou prejuízo funcional de tecidos (ABBAS et al., 2000). Uma vez que a defesa contra microrganismos é mediada por mecanismos efetores tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, faz-se necessário que o hospedeiro possua os respectivos mecanismos atuantes para eliminar a maioria dos patógenos microbianos. O sistema imune responde de forma distinta e especializada aos diferentes tipos de microrganismos para mais eficientemente combatê-los, no entanto bactérias patogênicas empregam diversos mecanismos para evadir do sistema de defesa imune inato (FINLAY & COSSART, 1997).

O gênero *Yersinia* é composto por cocobacilos Gram-negativos e compreende três espécies patogênicas para humanos: o agente causador da peste bubônica, *Y. pestis*, e os patógenos entéricos comuns, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Com exceção da *Y. pestis*, que não é móvel, as outras espécies são móveis à 22-30°C mas não à 37°C. *Yersinia* cresce sob condições aeróbicas e anaeróbicas numa variação de temperatura entre 0 e 45°C, sendo a ótima de 20 a 28°C (HOLT et al., 1994). A infecção com *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* pode ser adquirida por ingestão de comida ou água contaminada ou, raramente, de uma pessoa para outra, por exemplo, em creches, escolas ou hospitais. Estas infecções geralmente causam doença gastrointestinal em humanos e animais de sangue quente, mas podem causar uma larga variedade de sintomas incluindo diarreia, febre, dor abdominal e, em alguns pacientes, ileíte freqüentemente acompanhada por linfadenite mesentérica (pseudoapendicite) com pequena ou nenhuma diarreia e septicemia, evento raro que ocorre na maioria das vezes em adultos que apresentam desordens metabólicas (diabetes), doença hepática, AIDS ou processos neoplásicos (BOTTONE et al., 1987; BOTTONE, 1997; HARTLAND & ROBINS-BROWNE, 1998). Entretanto, em alguns indivíduos suscetíveis, a infecção está associada com o desenvolvimento de artrite reativa (TOIVANEN et al., 1985).

Colonizar o trato intestinal constitui o evento primário de um patógeno entérico bem sucedido (NEUTRA et al., 1996), por isso a colonização da superfície interna do intestino pelas espécies patogênicas de *Yersinia* constitui um passo essencial no processo da infecção (EITEL & DERSCH, 2002). Em modelos animais, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* alcançam o trato intestinal, penetram através das células M das placas de Peyer, e encontram os elementos celulares do hospedeiro (AUTENRIETH & FIRSCHING, 1996). A *Yersinia* virulenta se localiza no íleo terminal e cólon proximal, onde a maioria dos efeitos patológicos e, portanto, as manifestações clínicas ocorrem. A invasão pode proteger a bactéria contra os mecanismos de “clearance” do hospedeiro e possibilitar a disseminação da mesma. Porém, para invadir, a bactéria necessita antes aderir ao epitélio intestinal. Para assegurar o sucesso destes eventos (aderência, invasão e disseminação), a bactéria conta com bem caracterizados fatores de virulência codificados por genes cromossomais (*inv*, *ail*, *yst*, *irp2*, *myf*) e por genes plasmidiais (*yadA* e *yop*). Estes genes promovem a invasão e paralisam especialmente as funções do sistema complemento e da fagocitose (WUORELA & GRANFORS, 1998). Acredita-se que pelo menos 3 proteínas codificadas por genes cromossomais, a invasina, Ail e Myf (também conhecido como antígeno pH6), e uma codificada por genes plasmidiais, o fator *YadA*, sejam importantes no que concerne ao ataque da bactéria ao epitélio intestinal. Em experimentos “in vitro”, verificou-se que essas proteínas promovem a internalização da bactéria por células epiteliais (HARTLAND e ROBINS-BROWNE, 1998).

Bactérias patogênicas invasivas resistem aos mecanismos de defesa de seu hospedeiro animal e proliferam às suas expensas. Todas elas têm seu próprio “estilo de vida” e órgão-alvo, levando a uma variedade de sintomas e doenças; entretanto, existe um número restrito de mecanismos básicos de virulência, um dos quais foi esclarecido somente nos últimos anos. Através deste mecanismo, algumas vezes referido como “tipo III”, bactérias localizadas extracelularmente que estejam em íntimo contato com uma célula eucariótica, liberam proteínas bacterianas tóxicas no citosol desta célula. Os patógenos animais que possuem em comum este tipo de sistema são *Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*,

Escherichia coli enteropatogênica e enterohemorrágica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia psittaci* e *Bordetella spp.* (CORNELIS et al., 1998). O chamado “Yop virulon” de *Yersinia* representa um paradigma para estes sistemas tipo III.

O “Yop virulon” é uma arma comum à *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, que fornece a esses três patógenos a capacidade de resistir à resposta imune inespecífica. Em particular, ele as protege do macrófago, destruindo sua capacidade fagocítica e de sinalização e, finalmente, induzindo sua apoptose (CORNELIS et al., 1998).

Quando colocada a 37°C em um meio destituído de íons Ca²⁺, *Yersinia spp.* para de crescer e começa a secretar uma série de proteínas denominadas “Yops” (“*Yersinia* outer proteins”). Esta capacidade incomum, estritamente relacionada com virulência, é codificada por um plasmídeo de 70 kb, muito conservado, que foi completamente seqüenciado em *Y. enterocolitica* e *Yersinia pestis* (PERRY et al., 1998).

As proteínas “Yops” formam uma família de proteínas secretadas que incluem efetores intracelulares (seis efetores foram identificados: Yop H, Yop E, Yop J/Yop P, Yop T, Yop M e YpkA/Yop O) e vários componentes do aparato de secreção-translocação que é liberado pela bactéria sob quelação de Ca²⁺. As “Yops” efetoras têm sido relacionadas a uma série de propriedades de virulência, incluindo resistência à fagocitose, citotoxicidade e desfosforilação de proteínas do hospedeiro.

YopH, uma tirosina fosfatase com 51 kDa, desfosforiliza p130Cas, p125FAK e paxilina, todas elas proteínas tirosina-fosforiladas encontradas nos complexos de adesão focal (FA). A atividade de YopH parece causar a desunião de FA, o que diminui a entrada da bactéria nas células HeLa ou sua fagocitose pelos macrófagos (BLACK et al., 1997; PERSSON et al., 1997; BLACK et al., 1998) e inibem também o “burst” oxidativo. Além disso, YopH pode funcionar cooperativamente com YopE na inibição da fagocitose por neutrófilos (RUCKDESCHEL et al., 1996).

A atividade de YopE, uma proteína de 25 kDa, está associada com despolimerização do citoesqueleto da célula do hospedeiro, prevenindo assim a

ingestão da bactéria (ROSQVIST et al., 1991), uma vez que a fagocitose é um processo citoesqueleto-dependente.

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

YopJ (32,5 kDa), em certas condições, induz apoptose em macrófagos “in vitro” e “in vivo” (MILLS et al., 1997; MONACK et al., 1997; MONACK et al., 1998). Em outras condições, YopJ pode afetar o sinal de transdução mediado pelo fator nuclear κ B em macrófagos através de um mecanismo desconhecido e, subseqüentemente, inibir a produção de TNF- α (SCHESSER et al., 1998; BOLAND et al., 1998; PALMER et al., 1998). YopJ é a proteína secretada em menor quantidade “in vitro”.

Embora as funções de YopT (35,5 kDa) não estejam claras, tem sido demonstrado que ela é capaz de perturbar o citoesqueleto das células epiteliais na ausência de YopE (HAKANSSON et al., 1996; IRIATE et al., 1998).

YopM (41 kDa) possui homologia com o fator de von Willebrand, sugerindo que possa exercer um papel na coagulação do plasma (LEUNG et al., 1989; LEUNG et al., 1990), além de interferir na resposta inflamatória murina (MULDER et al., 1989; HARTLAND et al., 1998).

YpkA (“*Yersinia* protein kinase A”) é outra Yop com 81 kDa que mostra extensa homologia com proteínas eucarióticas, mais propriamente com a família PSK das proteínas serina/treonina quinases. Ela se autofosforila e, assim como a Yop H, interfere com a transdução de sinais nas células do hospedeiro por interferir com os níveis celulares de fosforilação (GALIOV et al., 1993; HAKANSSON et al., 1996; HARTLAND et al., 1998). Dentro das células, YpkA se posiciona na superfície interna da membrana plasmática (HAKANSSON et al., 1996). YpkA é inicialmente produzida como uma kinase inativa que é posteriormente ativada pela actina, durante a translocação para dentro da célula do hospedeiro (JURIS et al., 2000).

As proteínas codificadas pelo plasmídeo pYV (ausente nas cepas avirulentas) guiam a bactéria patogênica através dos mecanismos de defesa do hospedeiro, permitindo que a mesma estabeleça seu nicho ecológico extracelularmente ou no interior dos macrófagos (BOTTONNE et al., 1997). Assim,

Yersinia produz um espectro de fatores de virulência os quais, quando injetados na célula do hospedeiro, podem alterar a função fagocítica e, algumas vezes, a viabilidade dessas células.

Embora estas observações sugiram possíveis mecanismos para *Yersinia* diminuir a resposta imune inata do hospedeiro, o efeito de *Yersinia* sobre os componentes do sistema imune adaptativo não está claro; sistema esse crucial à sobrevivência dos animais infectados e à ligação observada entre infecção por *Yersinia* e auto-imunidade. Durante o curso natural da infecção por *Yersinia*, a bactéria certamente encontra linfócitos quando ela coloniza e se multiplica extracelularmente nas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço e fígado (AUTENRIETH et al., 1993b; AUTENRIETH et al., 1996). Na verdade, células T assim como macrófagos estão presentes nas lesões induzidas por *Yersinia* no baço e fígado (AUTENRIETH et al., 1993a). Estudos “in vitro” indicam que *Yersinia* pode se ligar tanto a linfócitos T quanto B, presumivelmente através das integrinas presentes nos linfócitos (LUNDGREN et al., 1996; ARENCIBIA et al., 1997). Assim, linfócitos T e B são alvos potenciais para a bactéria “in vivo”.

Y. pseudotuberculosis pode interferir diretamente na ativação mediada por receptor de antígeno na célula B e T e os efeitos inibitórios sobre os linfócitos são dependentes da produção de YopH (YAO et al., 1999). A presença de YopH nas células T e B resulta na hipofosforilação de quase todos os componentes tirosina-fosforilados associados com o complexo de sinalização do receptor do antígeno após ativação do mesmo. Conseqüentemente, células T expostas transitoriamente à *Yersinia* foram incapazes de influxionar cálcio e produzir citocinas. Da mesma maneira, células B primárias, expostas transitoriamente à *Yersinia*, foram incapazes de regular positivamente a molécula co-estimuladora B7.2, em resposta à estimulação antigênica. Como resultado, uma grande variedade de respostas imunes mediadas por células T ou B podem ser profundamente afetadas durante a infecção.

Estas observações sugerem uma nova maneira pela qual *Yersinia* pode incapacitar a resposta imune adaptativa do hospedeiro. Assim, *Yersinia* parece ter evoluído para produzir efetores que são dirigidos especificamente para os diferentes tipos celulares que a bactéria encontra no curso de uma infecção.

O conhecimento do papel exato das “Yops” efetoras levará a um melhor entendimento dos processos celulares que são “sabotados” pela bactéria.

Em trabalho realizado em nosso laboratório (CRESPO et al., 2002), verificamos que “Yops” de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, que não é virulenta para camundongos, provocavam ativação policlonal dos linfócitos B esplênicos dos animais inoculados.

Em outro trabalho, inoculamos camundongos com solução de “Yops” obtidas a partir de amostras de *Y. pseudotuberculosis* YpIII e Yp100 e verificamos que as “Yops” secretadas por estas amostras não provocam ativação de linfócitos B de mesma intensidade que as “Yops” secretadas pela amostra de *Y. enterocolitica* (MEDEIROS et al., 2003). Isto implica numa diferença na capacidade imunomoduladora destas proteínas secretadas por *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*.

Neste trabalho investigamos a capacidade imunomoduladora de diferentes “Yops” secretadas por amostras de *Y. pseudotuberculosis* sobre a resposta imune humoral de camundongos. O número de células secretoras de imunoglobulinas inespecíficas e específicas (anti-*Yersinia* ou anti-“Yops”) foi determinado num lote de animais infectados com uma amostra de *Y. pseudotuberculosis* virulenta para camundongos (YpIII pIB102, wt) e comparado com aquele obtido com os lotes de animais infectados com as amostras mutantes, defectivas na secreção de determinadas “Yops” efetoras. Foi também analisada a presença de anticorpos específicos e autoanticorpos nos soros dos animais infectados com as diferentes amostras de *Yersinia*.

II- OBJETIVOS

Objetivo geral:

Investigar o papel imunomodulador das proteínas "Yops" efetoras (YopH, YopE, YopM, YpkA e YopJ), secretadas por *Y. pseudotuberculosis*, sobre a resposta imune humoral de camundongos, através da comparação da resposta imune gerada pela amostra selvagem e pelas amostras mutantes para determinadas "Yops".

Objetivos específicos:

Determinar o número de células secretoras de Igs inespecíficas e específicas presentes no baço dos animais infectados;

Detecção da presença de anticorpos específicos anti-*Yersinia* e anti-"Yops" no soro dos animais infectados ;

Detectar a presença de auto-anticorpos no soro dos animais infectados, dirigidos contra diferentes estruturas moleculares autólogas.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Animais de Experimento:

Camundongos Swiss, fêmeas, SPF (specific pathogen free), com 8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, com acesso à ração e água estéreis, durante o período de experimentação. A serragem e a água foram trocadas periodicamente e esterilizadas em autoclave à 120°C por 15 minutos.

2 - Amostras bacterianas:

- 1 *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII pIB102 (wt): amostra selvagem portadora do plasmídeo de virulência e, portanto, capaz de secretar todas as “Yops”.
- 2 *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII pIB29 (yopH-): amostra mutante defectiva na secreção da YopH.
- 3 *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII pIB522 (yopE-): amostra mutante defectiva na secreção da YopE.
- 4 *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII pIB141 (yopM-): amostra mutante defectiva na secreção da YopM.
- 5 *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII pIB44 (ypkA-): amostra mutante defectiva na secreção da YpkA.
- 6 *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII pIB252 (yopJ-): amostra mutante defectiva na secreção da YopJ.

Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo Dr. Hans Wolf-Watz, Dep. Cell and Molecular Biology, University of Umea, Suécia.

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

3.1) Reativação das amostras de *Yersinia*:

As amostras foram enviadas em pequenos pedaços de filtro de nitrocelulose e foram recuperadas colocando-se os filtros em placas de Luria Agar contendo 50ug/ml de kanamicina, uma vez que todas as amostras são Km-R.

Antes de serem utilizadas, as bactérias foram reativadas através de passagem em camundongos. Para tal, dois camundongos foram inoculados por via intravenosa com 0,2 mL de uma suspensão do microrganismo, contendo cerca de 10^9 células/ mL (padronizadas pela escala 3 de Mac Farland e leitura de densidade óptica a 550nm - D.O. = 0,36). Após 24 horas, esses animais foram sacrificados. O baço foi retirado e triturado com 1mL de solução salina estéril e o produto semeado em meio de ágar base sangue (BAB) e incubado a 25o C por 48 horas. A partir deste crescimento foi preparado o inóculo.

3.2) Determinação da DL50:

A dose letal mediana (DL50) das amostras de *Y. pseudotuberculosis* foi determinada através do método de REED & MUENCH (REED et al., 1938). O crescimento bacteriano da placa de BAB foi ressuspenso em salina 0,15 M estéril e padronizado em espectrofotômetro a 550nm, de maneira a obter-se uma suspensão do microrganismo, contendo cerca de 10^9 células/mL, cuja leitura de densidade óptica seja de 0,36. A partir desta suspensão foram feitas várias diluições do inóculo, que variaram de 10^8 células/mL a 10^3 células/mL, a fim de se ajustar o número de células a serem inoculadas. Foram inoculados grupos de 5 camundongos para cada diluição. Esse procedimento foi executado para cada uma das amostras bacterianas. Os camundongos foram observados diariamente, por um período de 30 dias, sendo anotado o número de mortes dentro deste intervalo.

3.3) Esquema de infecção:

Lotes de 5 animais foram infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Manteve-se um lote de animais não infectados como controle. Em todos os lotes, a inoculação foi feita por via intravenosa, através da veia da cauda, sendo sempre inoculado o volume de 0,2 mL da suspensão bacteriana por camundongo, de acordo com a DL50 determinada para cada amostra (Tabela 01). Grupos de animais infectados e controles foram sacrificados, o baço foi retirado e os animais foram sangrados por punção cardíaca no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção. O soro foi separado e mantido a -20o C até o momento do uso.

4 - Determinação do número de células secretoras de Igs (inespecíficas e específicas), presentes no baço dos animais infectados, através da técnica de ELISPOT.

A quantificação do número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas no baço dos camundongos foi realizada através da técnica de ELISPOT ("ELISA spot assay").

4.1) Obtenção das células esplênicas:

Os camundongos do grupo controle e infectados foram sacrificados com auxílio de clorofórmio. O baço foi retirado e transportado para uma placa de Petri pequena, contendo 5 mL de BSS (Solução Balanceada de Sais), pH 7,2, gelado. Em seguida, o baço foi macerado cuidadosamente com o auxílio de uma pinça para a liberação das células. A suspensão de células obtida foi homogeneizada várias vezes, utilizando-se uma seringa de 5 mL com agulha 25x8, e após sedimentação dos grumos, o sobrenadante foi transferido para tubos cônicos de polietileno, graduados, sendo então centrifugado. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio BSS, pH 7,2. Esse processo foi repetido 2 vezes. Antes da 3ª lavagem as células foram ressuspensas em 5mL de cloreto de

amônio 0,83% e 1mL de soro fetal e deixadas em repouso por 5 minutos (lise das hemácias). Uma nova centrifugação foi realizada e as células ressuspensas em 10mL de RPMI suplementado com soro fetal para se efetuar a 3ª lavagem.

4.2) Viabilidade das células esplênicas:

O número de leucócitos viáveis no baço de cada camundongo foi avaliado através da técnica de exclusão com Azul Trypan (MISHELL & SHIIGI, 1980). Para tanto preparou-se uma solução de Azul Trypan 0,2% (w/v) em água destilada e uma solução de NaCl 0,75M. No dia de uso foram misturadas 4 partes de Azul Trypan 0,2% com uma parte de salina 0,75M. A um volume desta solução foi adicionado um volume da suspensão de células esplênicas na diluição apropriada e os linfócitos viáveis foram contados em Câmara de Neubauer.

4.3) "ELISA spot assay" – ELISPOT

4.3.1) Preparo do extrato bruto das amostras de *Y.*

pseudotuberculosis

O extrato bruto foi preparado através da desintegração das células viáveis das amostras da bactéria por sonicação e centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto, sendo avaliada sua concentração protéica através de dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.3.2) Obtenção de “Yops” de amostra de *Y. pseudotuberculosis*

YpIII pIB102.

A bactéria foi semeada em 4 placas de “Brain Heart Infusion Medium” (BHI) e incubada a 25°C por 18 horas. O crescimento foi retirado com salina estéril (1mL/placa) e feita uma diluição 1/20 em BHI. Em seguida incubou-se com agitação à 37°C, 120 r.p.m. por 90 minutos. Adicionou-se EGTA 10 mM e a incubação foi prolongada por mais 90 minutos. Efetuou-se uma centrifugação e separou-se o sobrenadante. As proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas com sulfato de amônio (40g para 100mL), em banho de gelo, com

agitação, e deixadas em repouso, por 18 horas à 4°C. A seguir foram centrifugadas à 7.000g por 10 minutos. O precipitado foi diluído em 2 mL de PBS e dializado em PBS, a 4°C. A seguir, sua concentração protéica foi avaliada através de dosagem pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.3.3) Teste de ELISPOT (CZERKINSKY et al., 1983):

Placas de ELISA de fundo chato foram recobertas com soro anti-imunoglobulinas (Igs) de camundongo (para detecção do número total de células secretoras de Ig) ou com extrato bruto de *Y. pseudotuberculosis*, YpIII (para detecção de células secretoras de Igs anti-*Yersinia*), ou com solução de "Yops" (para detecção de células secretoras de Igs anti-"Yops") diluídos em "coating buffer" 0,05M, em concentrações padronizadas. As placas foram incubadas "overnight" à 4° C. Após saturação das placas com PBS/T contendo 1% de gelatina (2 horas – 37° C), as suspensões celulares obtidas do baço dos camundongos foram adicionadas em concentrações apropriadas (ao redor de 10⁶ células esplênicas/cavidade). As placas foram incubadas por 6 horas à 37° C, em estufa contendo 5% de CO₂ e umidificação, e a seguir as células foram lisadas por lavagem com água destilada/Tween. Seguiu-se à adição dos soros biotinilados anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgM e anti-IgA de camundongo (SOUTHERN), diluídos em PBS/Tween contendo 1% de gelatina. As placas foram incubadas por 18 horas à 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS/T e adicionada uma solução de fosfatase alcalina ligada à estreptavidina (GIBCO) com nova incubação por 2 horas a 37° C. A seguir foi adicionado o substrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato – BCIP, SIGMA – a 1mg/mL em tampão AMP-2-amino-2-metil-1-propanol – SIGMA). Após 3-4 horas de incubação a 37° C, as células secretoras de Ig foram visualizadas como pontos azulados, contadas e sua frequência determinada em relação ao número total de células adicionadas às cavidades da placa.

5 – Detecção de anticorpos específicos no soro dos camundongos, através do teste ELISA (MEDEIROS et al., 1991).

5.1- Obtenção dos soros:

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

5.2 – Antígenos específicos:

Utilizou-se extrato bruto ou Yops para pesquisa de anticorpos específicos.

5.3- Teste ELISA:

As placas foram sensibilizadas com o extrato bruto das respectivas amostras de *Y. pseudotuberculosis* ou com uma solução de Yops e incubadas à 4°C por 18 horas. Decorrido o tempo de incubação, as mesmas foram lavadas por 3 vezes com PBS/Tween (PBS/T), e os soros em estudo diluídos em PBS/T/BSA e adicionados aos orifícios das placas, que foram incubadas à 37°C, durante 1 hora. Decorrido este tempo, foram novamente lavadas 3 vezes com PBS/T e adicionados soros anti-IgM e anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase. A placa foi incubada por mais 1 hora à 37°C, lavada mais 3 vezes e a solução de substrato foi adicionada (o-fenilenodiamina). A placa foi incubada por 15 minutos e a reação foi então bloqueada com HCl 3N. A absorbância da cor marrom-avermelhada produzida com a o-fenilenodiamina foi lida em espectrofotômetro a 492 nm. Para cada placa utilizada, foram feitos controles do antígeno (positivo e negativo) e controle de branco (densidade óptica = 0,000).

6 – Detecção de auto-anticorpos no soro dos camundongos, através do teste DOT-BLOT (HEINICKE et al., 1992)

6.1 – Auto-antígenos:

Para a pesquisa de auto-anticorpos foram utilizados os seguintes auto-antígenos: cardiolipina, colágeno tipo II, tireoglobulina, fosforilcolina, miosina e mielina (SIGMA). Os auto-antígenos foram fixados à membrana de PVDF (BIO-RAD Immun-Blot □ PVDF) aplicando-se 10 ug da proteína em 100 uL de PBS.

6.2 – Teste DOT-BLOT(HEINICKE et al., 1992) :

Uma membrana de PVDF de tamanho apropriado foi umedecida em metanol e lavada quatro vezes em PBS, sob agitação durante 5 minutos, para equilibrá-la no tampão de transferência. Em seguida a membrana foi colocada sobre um aparato de “dot” (BIO-DOT □ APPARATUS – BIO-RAD). Os auto-antígenos, diluídos em PBS, foram aplicados em um volume de 100 uL por cavidade, com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada ao sistema. A seguir, foram repetidas as quatro lavagens com PBS. Após as lavagens, a membrana foi bloqueada durante 2 horas a 65°C com PBS/T, contendo 3 % de BSA e foi cortada em tiras para a adição dos soros. Os soros dos animais infectados e controles, diluídos a 1/100 em PBS/T, contendo 1% de BSA (PBS/T/BSA), foram aplicados e incubados durante 1 hora, em temperatura ambiente e sob agitação constante. Após repetição das lavagens, foram adicionados soros anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3 e anti-IgM de camundongo, biotinizados (SIGMA), diluídos em PBS/T/BSA e uma nova incubação sob as mesmas condições foi realizada. As tiras foram novamente lavadas e então, incubadas 1 hora, em temperatura ambiente e sob agitação contínua, com uma solução de estreptavidina conjugada a peroxidase (GIBCO), diluída em PBS/T/BSA. Finalmente, após as últimas lavagens, as fitas foram incubadas durante 5 minutos com o revelador quimioluminescente ECL Plus (AMERSHAM PHARMACIA) e tiveram suas emissões capturadas e analisadas em um multi-analisador de

imagens (FLUOR-S MULTIIMAGER – BIO-RAD), utilizando-se o “software” Multi-Analyst versão 1.1 (BIO-RAD).

7 - Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm SD. A comparação entre o grupo de animais infectados e o grupo controle é realizado através do teste t de Student, utilizando-se o “software” Origin 4.1.

IV- RESULTADOS

1- Determinação da DL 50

Através da determinação da DL50, observamos que a falta de secreção de Yop E ou de YopM aumentou a DL50 para camundongos da amostra de *Y. pseudotuberculosis* cerca de 100.000 vezes; enquanto que a falta de secreção de YopH, aumentou a DL50 em cerca de 1.000.000 vezes, em relação à amostra selvagem, demonstrando que a Yop H induz um aumento de 10 vezes na virulência da bactéria em relação à Yop E ou à YopM(Tabela 01).

Tabela 01: Valores de DL50 das diferentes amostras bacterianas.

| Amostra bacteriana | DL50 |
|---------------------------|-------------------------|
| YpIIIpIB102 (wt) | 1 cel/mL |
| YpIIIpIB522 (yopE-) | 10 ⁵ cels/mL |
| YpIIIpIB29 (yopH-) | 10 ⁶ cels/mL |
| YpIIIpIB252 (yopJ-) | 1 cel/mL |
| YpIIIpIB141 (yopM-) | 10 ⁵ cels/mL |
| YpIIIpIB44 (ypkA-) | 1 cel/mL |

2- Determinação do número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (inespecíficas e específicas)

Não se observou nenhuma diferença significativa entre o número de células secretoras de Igs inespecíficas dos animais inoculados com YpIIIpIB102 (wt) em relação aos controles. (Figura 01). Foram observados linfócitos secretores de Igs específicas, dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA, na placa sensibilizada com a solução de “Yops”, em todos os dias após infecção. Na placa sensibilizada com extrato bruto, obtivemos “spots” específicos para os isotipos IgG1 e IgA em todos os dias após infecção. Em relação aos isotipos IgG2a e IgG2b, obtivemos “spots” específicos no 14o, 21o e 28o dias após infecção. Para o isotipo IgG3, obtivemos “spots” específicos no 21o e 28o dias após infecção. E para o isotipo IgM obtivemos “spots” específicos no 7o, 14o e 28o dias após infecção.

Já a amostra YpIII pIB522, embora defectiva na secreção de YopE, provocou uma redução significativa dos linfócitos B secretores de IgG2a, IgM e IgA no 28º dia após infecção, e também de IgA no 14º e 21º dias após infecção nos camundongos infectados com essa amostra. A única ativação observada ocorreu para o isotipo IgG2a (aumento de 1,7 vezes) no 7º dia após infecção (Figura 02). Não foram observadas células secretoras de imunoglobulinas específicas anti-*Yersinia* e anti-Yops, para esses mesmos animais.

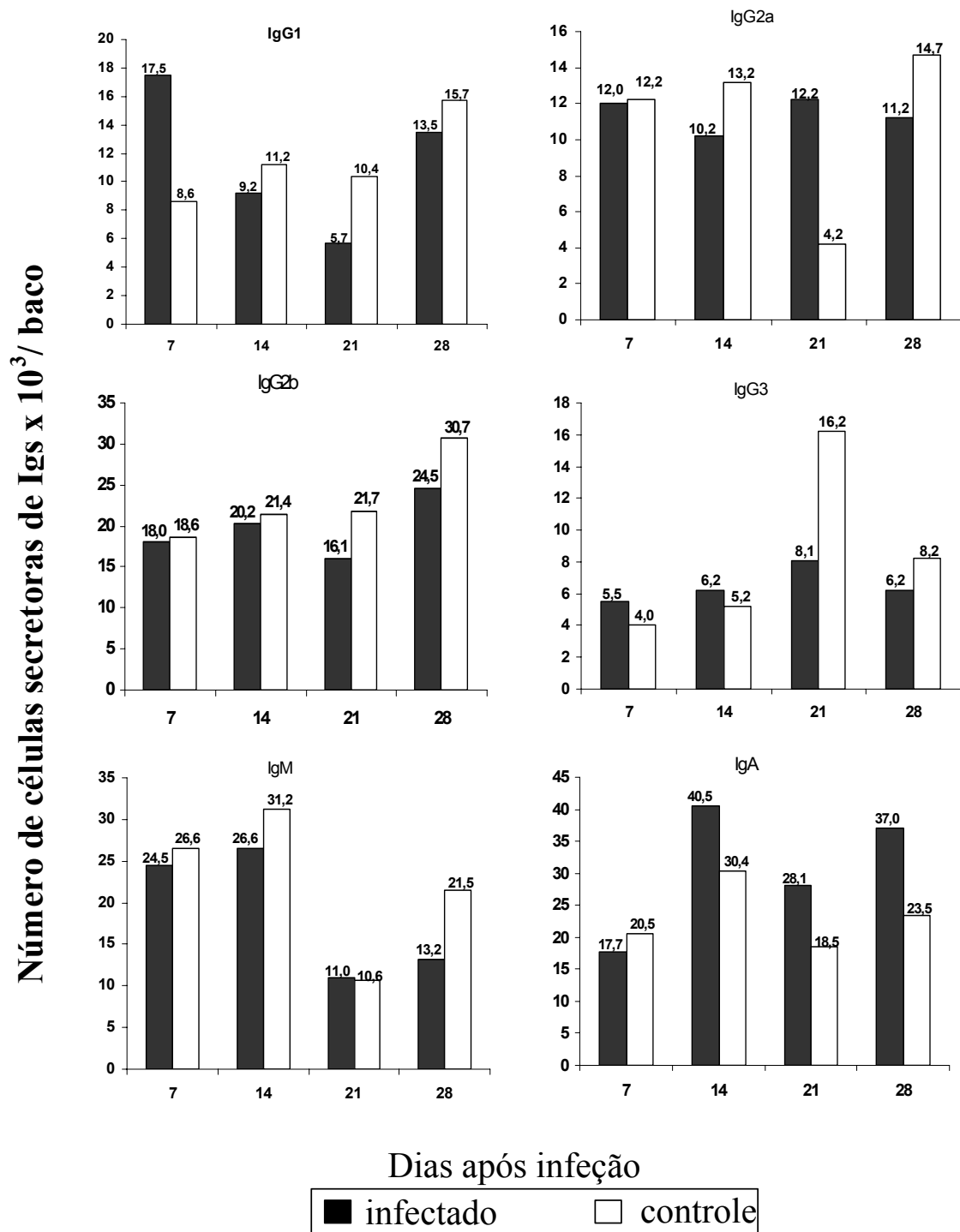


Figura 01: Número de células secretoras de Igs inespecíficas dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA presentes no baco de camundongos após infecção com *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB102(wt), detectado por ELISPOT. Os valores do desvio-padrão sempre foram menores que 23% do valor observado.

Número de células secretoras de Igs x 10³/ baco

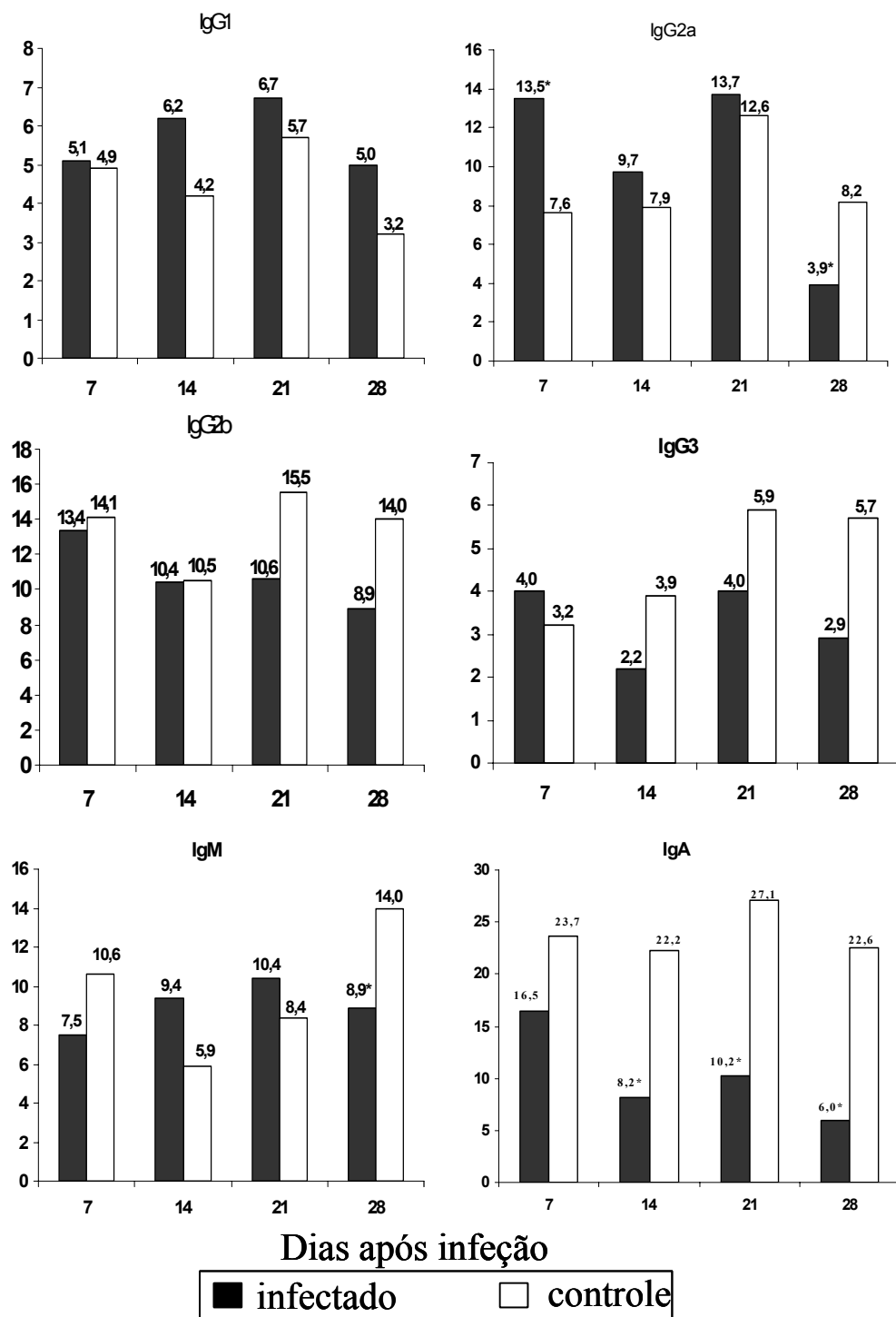


Figura 02: Número de spots inespecíficos dos isotipos IgG1; IgG2a; IgG2b; IgG3; IgM e IgA presentes no baco de camundongos após infecção com *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB522(YopE⁻), detectado por Elispot. Os valores do desvio-padrão sempre foram menores que 31% do valor observado. * = p<0,05 comparado com o controle (Student's *t*-test).

Com a amostra YpIII pIB29, defectiva na secreção de YopH, observou-se um aumento significativo na secreção de imunoglobulinas dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG3, que variou de 1,7 à 2,4 vezes, no 7º e 14º dias após infecção (Figura 03). Não foram observadas células secretoras de imunoglobulinas específicas anti-*Yersinia* e anti-Yops, para esses mesmos animais.

Já a amostra YpIII pIB252, defectiva na secreção de YopJ, causou um aumento significativo no número de células secretoras de imunoglobulinas dos isotipos IgG3 e IgM, de respectivamente 2,8 e 1,5 vezes em relação aos animais controles no 21º dia após infecção, e uma diminuição de 1,3 vezes no número de células secretoras do isotipo IgG1 no 21º dia após infecção (Figura 04). Também não foram observadas células secretoras de imunoglobulinas específicas anti-*Yersinia* e anti-Yops, para esses mesmos animais.

Número de células secretoras de Igs x 10³/ baco

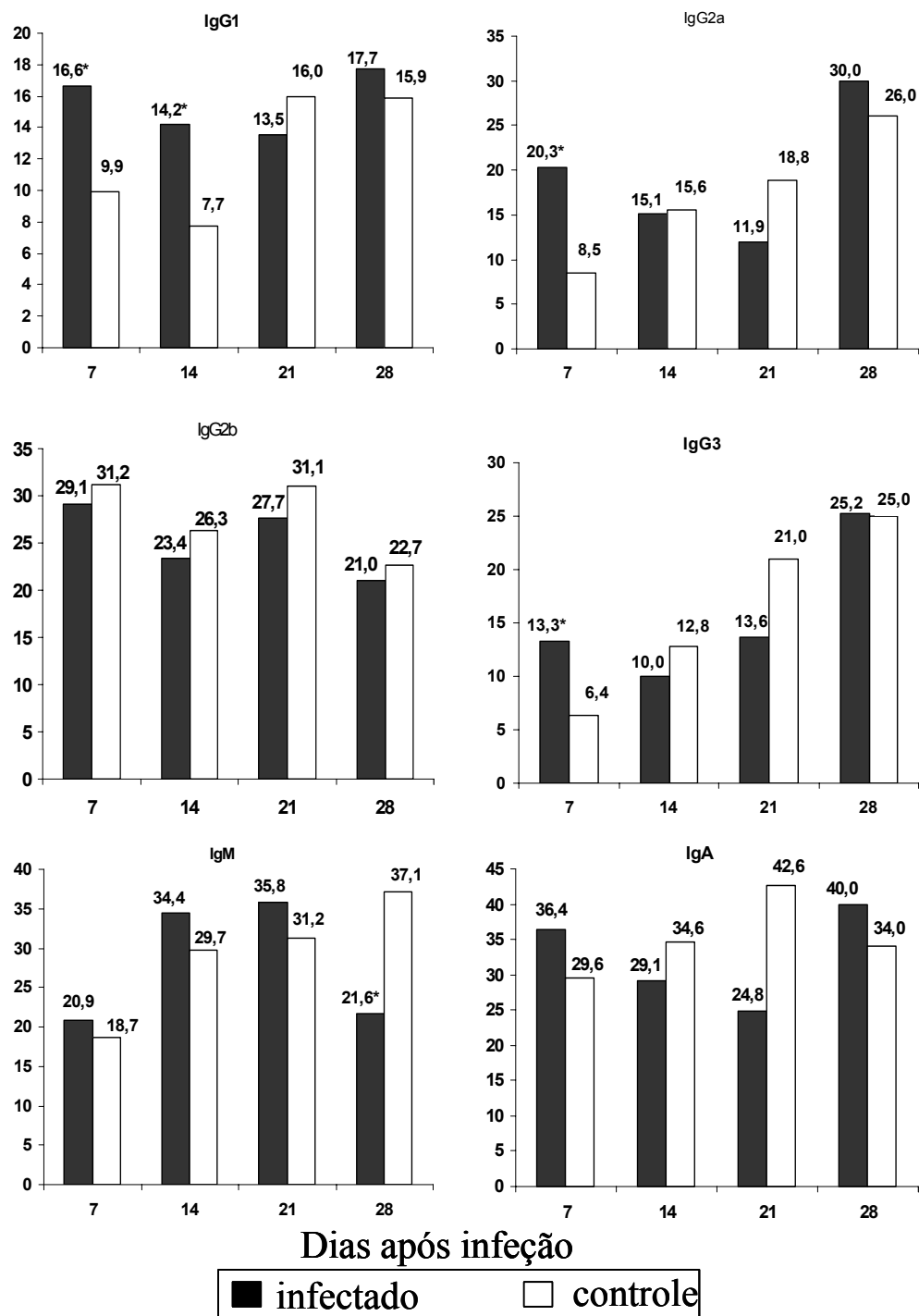


Figura 03: Número de spots inespecíficos dos isotipos IgG1; IgG2a; IgG2b; IgG3; IgM e IgA presentes no baço de camundongos após infecção com *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB29 (Yop H⁻), detectado por Elispot. Os valores do desvio-padrão sempre foram menores que 37% do valor observado. * = p<0,05 comparado com o controle (Student's *t*-test).

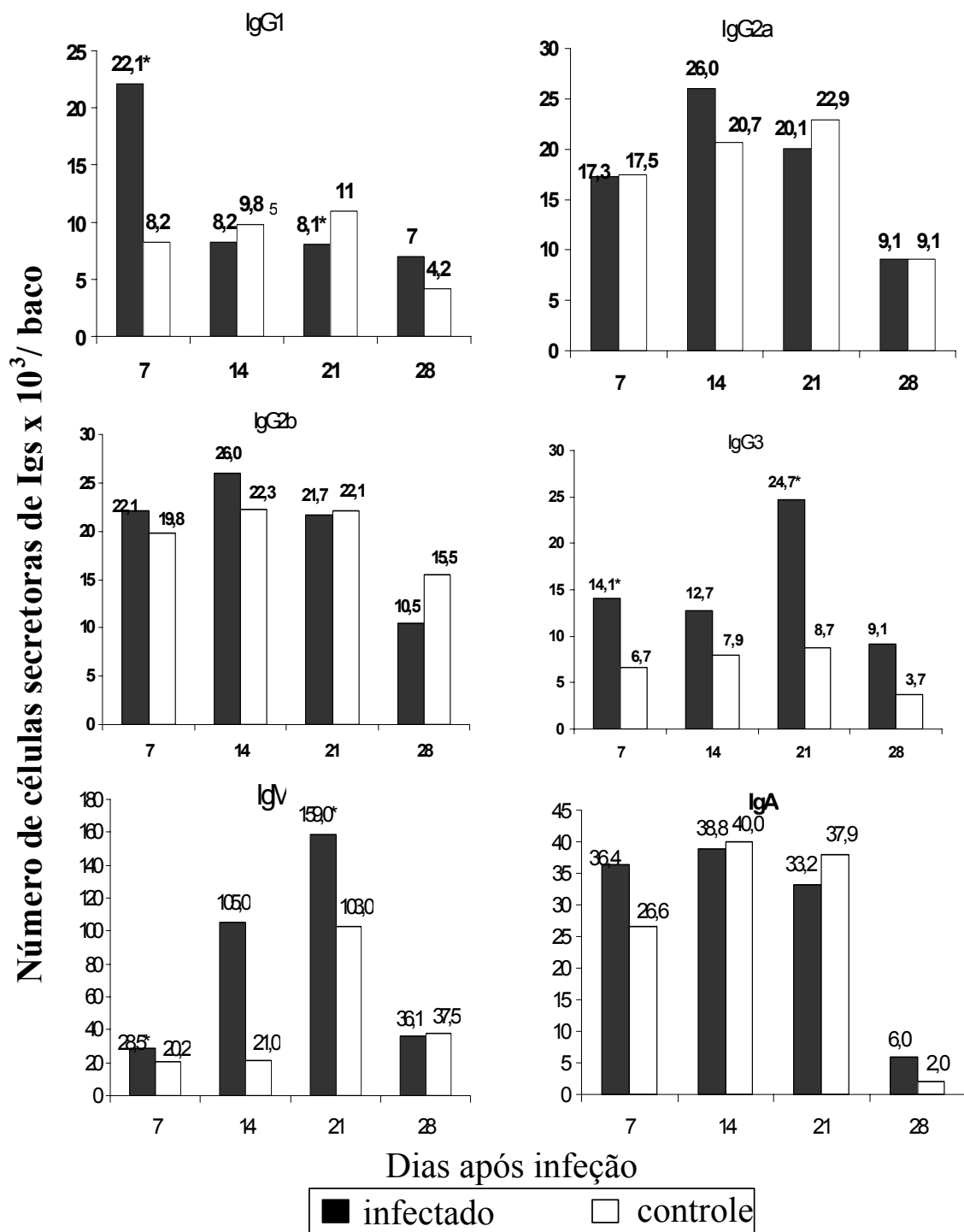


Figura 04: Número de células secretoras de Igs inespecíficas dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA presentes no baço de camundongos após infecção com *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB522 (Yop J), detectado por ELISPOT. Os valores do desvio-padrão sempre foram menores que 35% do valor observado. * = $p < 0,05$ comparado com o controle (Student's *t*-test).

A amostra mutante para YopM, YpIII pIB141, provocou uma redução significativa no número de linfócitos secretores de imunoglobulinas inespecíficas, dos isotipos IgG2b (redução de 1,6 vezes), IgM (redução de 4,4 vezes) e IgA (redução de 2,5) no 21o dia após infecção e de IgG1 (redução de 2,4 vezes), IgG3 (redução de 2,6 vezes) e IgA (redução de 3,8 vezes) no 28o dia após infecção em relação aos controles. Já para o isotipo IgG2a, não foi observada nenhuma diferença significativa no número de linfócitos secretores desse isotipo em relação aos controles em nenhum dia (Figura 05). Foram detectados raros spots específicos anti-*Yersinia* e anti-Yops para todos os isotipos no 7o, 14o, 21o e 28o dias após infecção; essa detecção limitou-se a um ou dois animais, sendo o número de spots sempre inferior a dois por isotipo e animal em cada dia da cinética.

A amostra mutante para YpkA, YpIII pIB44, causou um aumento significativo no número de linfócitos secretores de imunoglobulinas inespecíficas, dos isotipos IgG2b (aumento de 1,4 vezes) e IgM (aumento de 1,9 vezes) no 21o dia após infecção, em relação aos controles, e uma redução significativa no número de linfócitos secretores de IgA (redução de 1,4 vezes) no 14o dia após infecção. Para os isotipos IgG1, IgG2a e IgG3, não foi observada nenhuma diferença significativa no número de linfócitos secretores desses isotipos em relação aos controles em nenhum dia (Figura 06). Foram detectados raros spots específicos anti-*Yersinia* e anti-Yops para todos os isotipos no 7o, 14o, 21o e 28o dias após infecção; essa detecção limitou-se a um ou dois animais, sendo o número de spots sempre inferior a dois por isotipo e animal em cada dia da cinética.

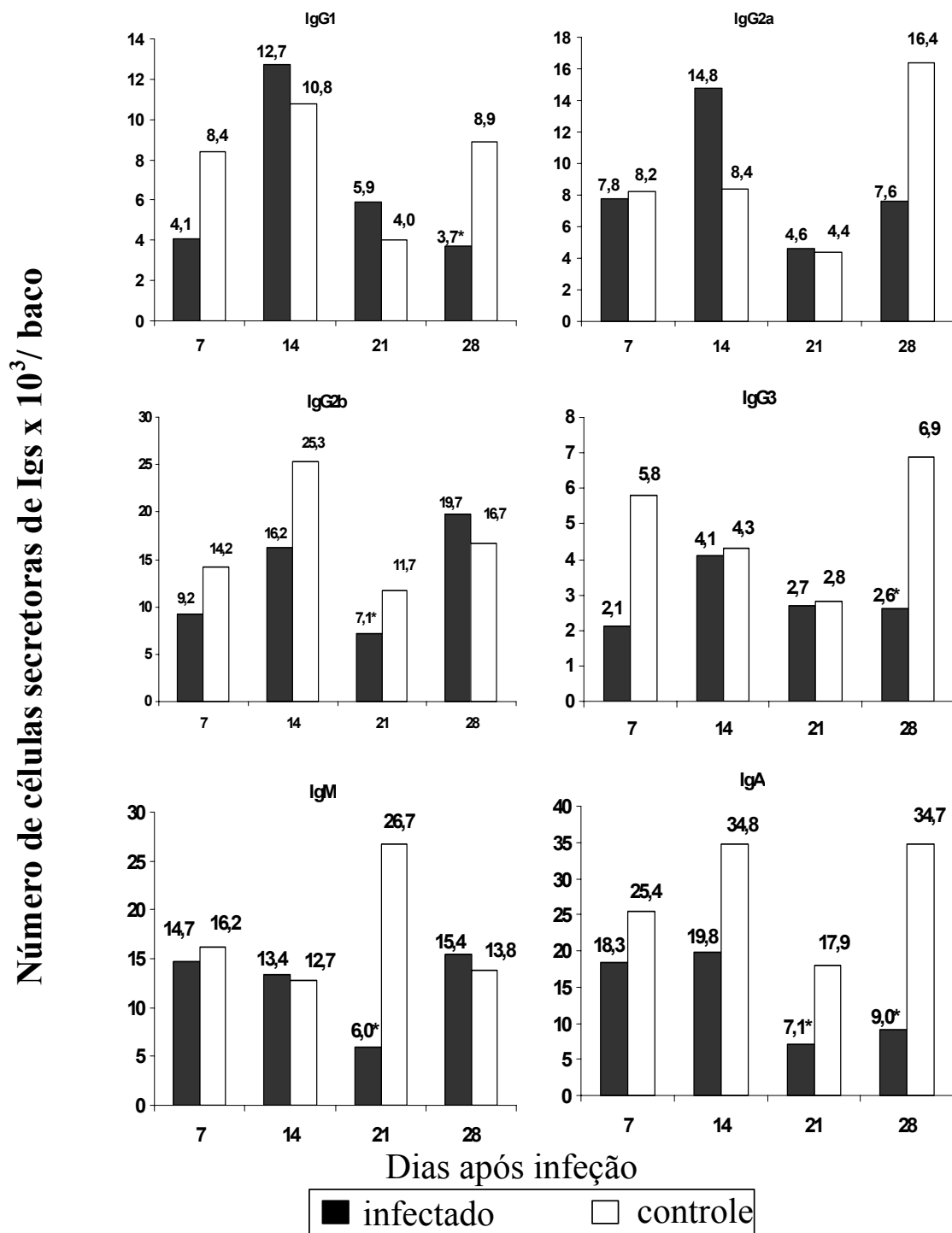


Figura 05: Número de células secretoras de Igs inespecíficas dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA presentes no baço de camundongos após infecção com *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB141 (Yop M⁻), detectado por ELISPOT. Os valores do desvio-padrão sempre foram menores que 28% do valor observado. * = p<0,05 comparado com o controle (Student's *t*-test).

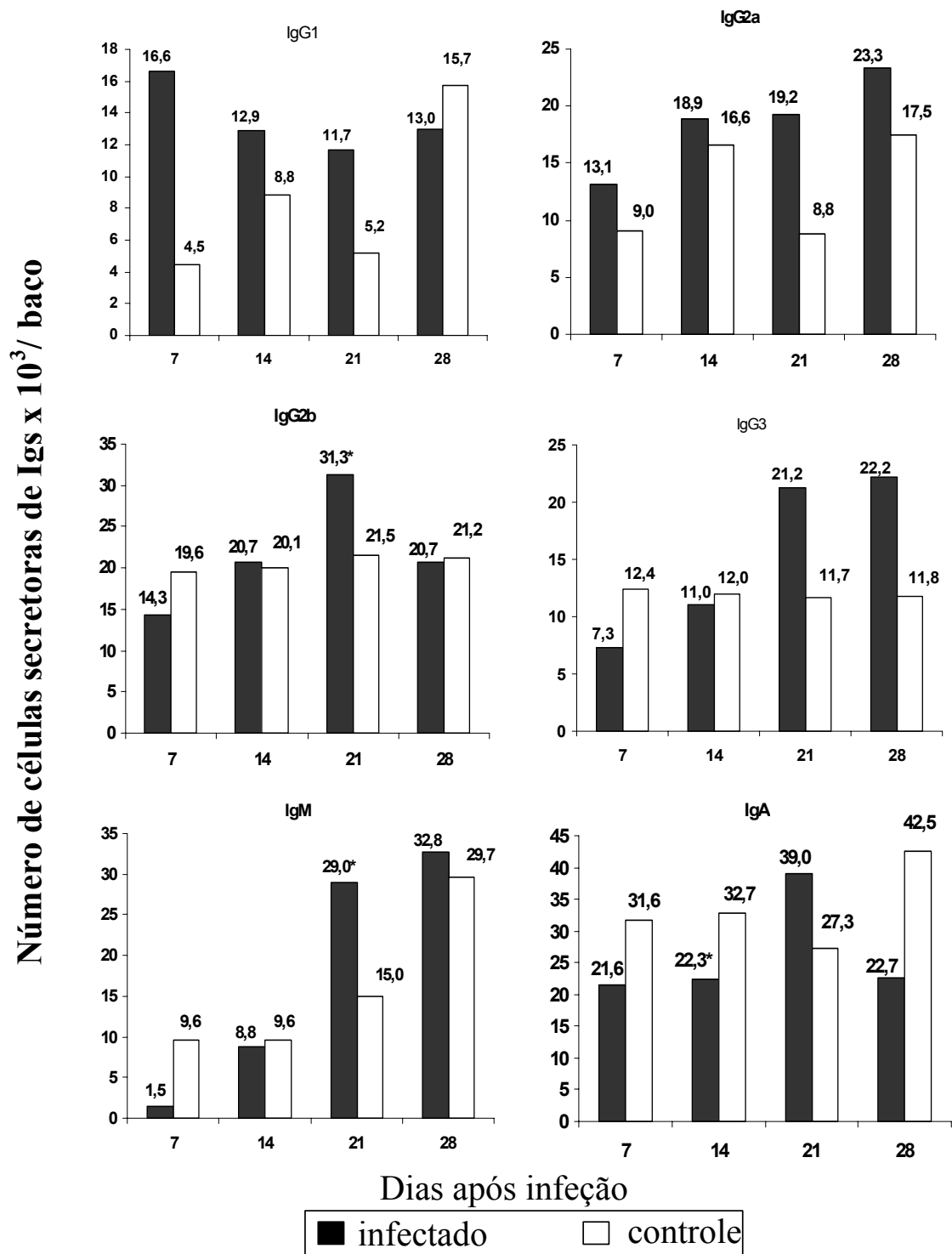


Figura 06: Número de células secretoras de Igs inespecíficas dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA presentes no baço de camundongos após infecção com *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB44 (Ypk A⁻), detectado por ELISPOT. Os valores do desvio-padrão sempre foram menores que 37% do valor observado. * = p<0,05 comparado com o controle (Student's t-test).

3- Detecção de anticorpos específicos anti-*Yersinia*

Quanto à detecção de anticorpos IgG e IgM, anti-*Yersinia* e anti-"Yops", no soro dos animais infectados, através do teste ELISA, observamos que a amostra selvagem YpIIIpIB102 (wt), provocou um aumento crescente do nível de anticorpos séricos anti-*Yersinia*, do isotipo IgG, com um pico no 28º dia após infecção. Para o isotipo IgM, observamos apenas um acréscimo significativo de sua concentração no 7º dia após infecção(Figura 07).

Já com as amostras mutantes para YopE, YopH, YopM, YopJ e YpkA verificamos a ausência dos anticorpos IgG e IgM, anti-*Yersinia* e anti-"Yops" no soro dos animais infectados.

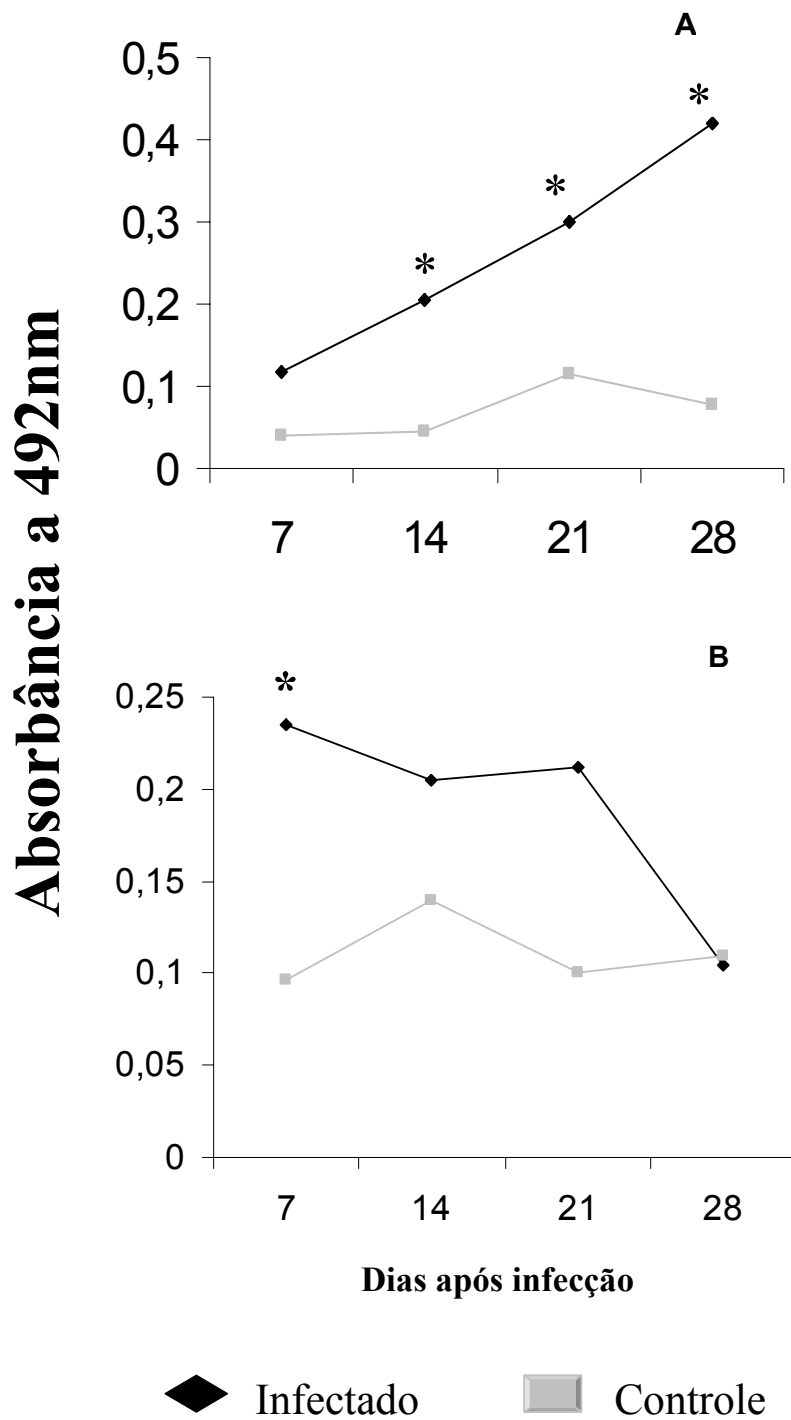


Figure 07: Presença de IgG (A) e IgM (B) anti-*Yersinia* no soro de camundongos infectados com *Y. pseudotuberculosis*, YpIIIpIB102 wt, detectada por ELISA. Os valores do desvio padrão sempre foram menores que 13% do valor observado. * $p < 0.05$ comparado com os controles (Student's *t*-test).

4- Detecção de auto-anticorpos

Pesquisamos a presença de auto-anticorpos, no soro dos animais infectados, contra colágeno tipo II, fosforilcolina, mielina, miosina, tireoglobulina e cardiolipina. Esses auto-anticorpos foram detectados apenas no soro dos animais infectados com a amostra selvagem YpIIIpIB102 (wt), para a qual observamos um acréscimo significativo de anticorpos contra miosina, tireoglobulina e cardiolipina no 7º e 14º dia após infecção e contra fosforilcolina e mielina no 7º dia após infecção (Figura 08).

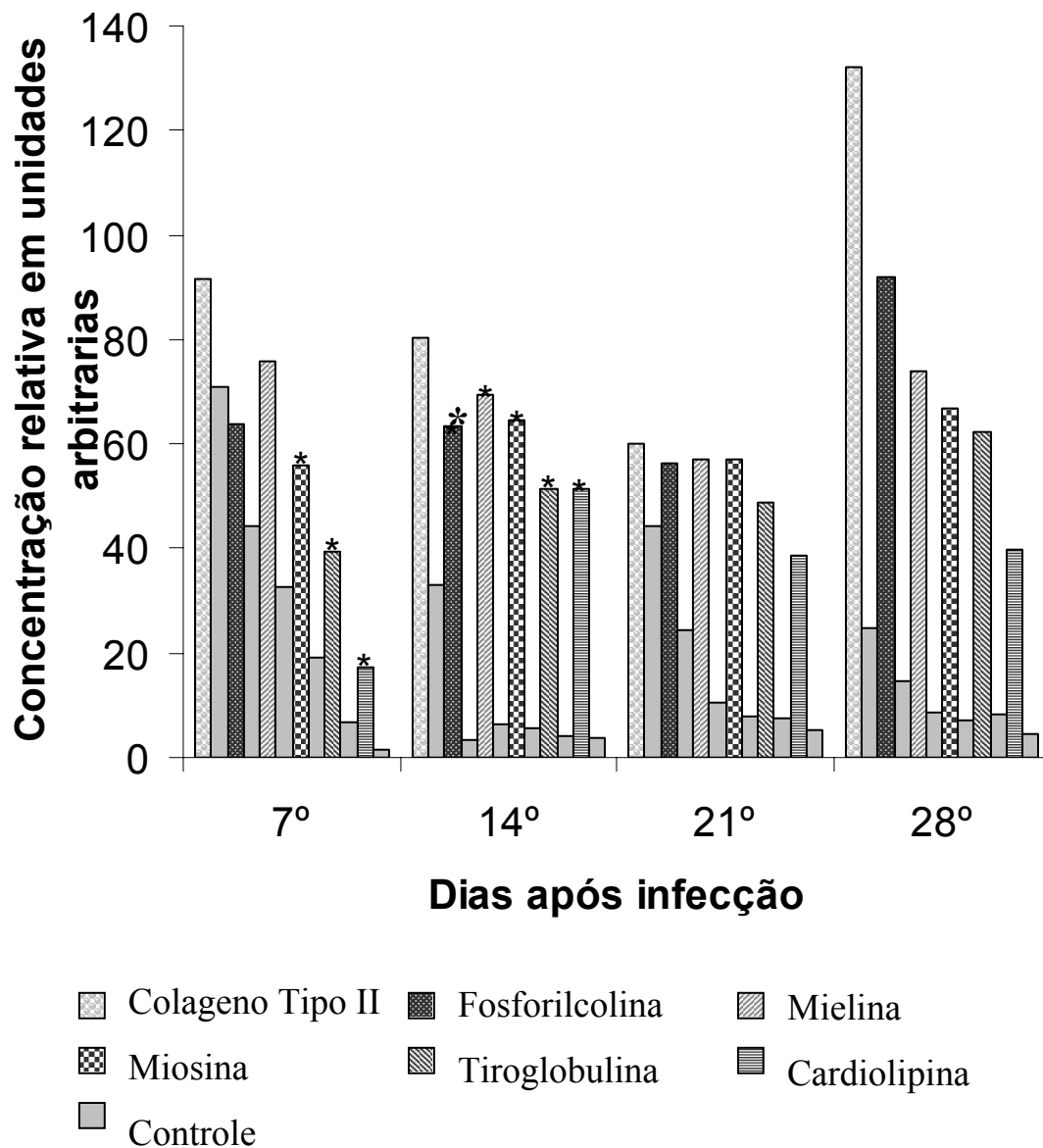


Figura 08: Presença de auto-anticorpos no soro de camundongos infectados com *Y. pseudotuberculosis*, YpIII pIB102 wt, detectada por DOT-BLOT. Os valores do desvio padrão sempre foram menores que 13% do valor observado. * = $p < 0,05$ comparado com os controles (Student's *t*-test).

5- Ocorrência de alterações patológicas

Foram observadas lesões granulomatosas no baço e fígado dos animais inoculados, a partir do 7º dia após a infecção. As lesões apresentaram um aspecto purulento, principalmente no baço. O baço e o fígado destes animais se apresentaram aumentados em tamanho quando comparados aos animais controles. Tais lesões foram comumente observadas nos animais inoculados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*.

V - DISCUSSÃO

Y. pseudotuberculosis, através da secreção de “Yops”, interfere com os mecanismos de imunidade inata do hospedeiro (BLISKA et al., 2000). Porém, o papel destas proteínas como imunomoduladoras da resposta imune específica só agora vem sendo esclarecido.

Yao et al. (1999), através de experimentos realizados “in vitro”, observaram que após exposição transitória à *Y. pseudotuberculosis*, células T são inibidas em sua capacidade de produzir citocinas e células B são incapazes de regular positivamente a expressão na superfície da molécula co-estimuladora B7.2, em resposta a um estímulo antigênico. O bloqueio da ativação de linfócitos resulta na inibição dos eventos iniciais de fosforilação do complexo sinalizador do receptor de antígenos. Através do uso de amostras mutantes de *Y. pseudotuberculosis*, estes autores demonstraram que o efeito inibitório tanto em células T quanto em células B é dependente da produção da proteína de membrana externa YopH, uma tirosina fosfatase que inibe as cascatas de sinalização associadas com a ativação de receptores de antígenos de células T e B.

Neste trabalho verificamos que a amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis*, inoculada em camundongos por via intravenosa, não provocou ativação policlonal dos linfócitos B secretores de imunoglobulinas. Este resultado difere daquele obtido com amostras de *Y. enterocolitica* O:3 (COSTA, 1995), a qual ativa principalmente linfócitos secretores de IgG2a, provocando um aumento de 25 vezes na secreção deste isotipo em relação aos controles. Crespo et al. (CRESPO, 2002) verificaram ainda que Yops de *Y. enterocolitica* O:3, quando inoculadas numa concentração de 200 µg/camundongo, provocavam ativação policlonal de linfócitos B, com pico de secreção da maioria dos isotipos de Igs no 21º dia pós-inoculação, onde o número de células secretoras de IgG3 encontrava-se 31 vezes aumentado em relação aos controles. A inoculação em camundongos de uma solução de “Yops”, obtidas de amostras de *Y. pseudotuberculosis* YpIII e Yp100, não provocaram ativação de linfócitos B da mesma intensidade que as “Yops” secretadas por *Y. enterocolitica* (MEDEIROS,

2003). Isto implica em uma diferença na capacidade imunomoduladora das proteínas secretadas por essas amostras.

Através da determinação da DL50, observamos que YopE, YopH e YopM são importantes determinantes da virulência de *Y. pseudotuberculosis*. Tal observação é condizente com o aumento da DL50 em cerca de 100.000 vezes na ausência de YopE ou YopM; enquanto que a falta de secreção de YopH aumentou a DL50 em cerca de 1.000.000 vezes, em relação à amostra selvagem.

Para os animais infectados com a amostra bacteriana *Y. pseudotuberculosis* YpIII pIB102 (wt), não foi detectada nenhuma diferença significativa, em relação aos controles, no número de linfócitos secretores de imunoglobulinas inespecíficas de nenhum dos isotipos. Provavelmente o conjunto de Yops secretadas pela amostra selvagem impede a ativação policlonal dos linfócitos B dos animais infectados.

A atividade de YopE, uma proteína de 25 kDa, está associada com despolimerização do citoesqueleto da célula do hospedeiro, prevenindo assim a ingestão da bactéria (ROSQVIST et al., 1991). A YopE é um determinante de virulência essencial que contém um domínio efetor carbóxi-terminal (SORY et al., 1995; SCHESSER et al., 1996) que compartilha um alto grau de similaridade com o domínio amino-terminal da exoenzima S (ExoS) de *Pseudomonas aeruginosa* e SptP de *Salmonella typhimurium*. Recentemente, foi demonstrado que YopE e ExoS possuem atividade GAP (Proteínas Ativadoras de GTP-ases) sobre as GTP-ases da família Rho (RhoA, Rac e Cdc42) in vitro, e que esta atividade GAP é essencial para a citotoxicidade mediada por YopE (GOEHRING et al., 1999; BLACK e BLISKA, 2000; von PAWELL-RAMMINGEN et al., 2000). Estudos bastante recentes apontaram um novo papel para a YopE na modulação da resposta inflamatória durante infecção de macrófagos in vitro; demonstrou-se o envolvimento de Rho GTPases, em particular Rac1, na regulação da ativação da caspase-1 (SCHOTTE et al., 2004). Verificamos que a amostra YpIII pIB522, embora defectiva na secreção de YopE, provocou uma imunossupressão nos camundongos no 28º dia após infecção, afetando os linfócitos B secretores de IgG2a, IgM e IgA, e também de IgA no 14º e 21º dias após infecção. A única ativação observada ocorreu para o isotipo IgG2a no 7º dia após infecção.

A YopH é uma tirosina fosfatase com 51 kDa que desfosforiliza p130Cas, p125FAK, paxilina e a proteína ligante de Fyn (FBP), todas elas proteínas tirosina-fosforiladas encontradas nos complexos de adesão focal (FA). A atividade de YopH parece causar a desunião de FA, o que diminui a entrada da bactéria nas células HeLa ou sua fagocitose pelos macrófagos (BLACK e BLISKA, 1997; PERSSON et al., 1997; BLACK et al., 1998; HAMID et al., 1999) e inibe também o “burst” oxidativo. Além disso, YopH pode funcionar cooperativamente com YopE na inibição da fagocitose por neutrófilos (RUCKDESCHEL et al., 1996). SAUVONNET et al. (2002a) evidenciaram a possível atuação da YopH na inativação da via do fosfatidilinositol-3 quinase com conseqüente supressão, nos macrófagos, da expressão da proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1). Com a amostra YpIII pIB29, defectiva na secreção de Yop H, observamos um aumento significativo na secreção de imunoglobulinas dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG3, que variou de 1,7 à 2,4 vezes, no 7º e 14º dias após infecção.

Os resultados obtidos com a amostra mutante para Yop H estão de acordo com as observações de Yao et al. (1999) no que se refere à supressão dos linfócitos B provocada por esta Yop. Observamos que quando esta Yop não é secretada, ocorre uma ativação dos linfócitos B secretores de IgG1, IgG2a e IgG3.

A amostra YpIII pIB252, defectiva na secreção de YopJ, causou um aumento significativo no número de células secretoras de imunoglobulinas dos isotipos IgG3 e IgM, de respectivamente 2,8 e 1,5 vezes em relação aos animais controles no 21º dia após infecção, e uma diminuição de 1,3 vezes no número de células secretoras do isotipo IgG1 no 21º dia após infecção.

A YopJ (32,5 kDa, YopP em *Y. enterocolitica*) é a única Yop efetora que tem função anti-inflamatória e é responsável pela indução de apoptose em macrófagos *in vitro* e *in vivo* (MILLS et al., 1997; MONACK et al., 1997; MONACK et al., 1998). Após a indução transitória de múltiplas vias de sinalização (MAPK e NF- κ B) pelo lipopolissacarídeo (LPS), a infecção por *Yersinia* resulta numa severa inibição das vias MAPK (Erk, JNK e p38) nos macrófagos (RUCKDESCHEL et al., 1997) e também num bloqueio da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B). Estudos sobre as possíveis funções da YopJ têm sugerido,

também, que a mesma seja capaz de inibir a produção de citocinas como TNF- α e IL-8 graças à presença de um domínio SH2-like, que constitui um traço comum de muitas proteínas sinalizadoras eucarióticas (SCHESSER et al., 1998; BOLAND e CORNELIS, 1998; PALMER et al., 1998). Considerando que os promotores do TNF- α e da IL-8 possuem sítios de ligação para o NF- κ B e AP-1 (ROEBUCK, 1999; LIU et al., 2000), e que os sinais MAPK e NF- κ B convergem para os fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, a inibição da produção de citocinas é provavelmente resultado do rompimento da ativação da MAPK e NF- κ B (JURIS et al., 2002). A apoptose de macrófagos causada pela YopJ, muito provavelmente, também resulta da inativação do NF- κ B (PAGLIARI et al., 2000). Artigos de Orth et al. (2000) revelaram que a YopJ pode funcionar como uma cisteína protease. Esses autores também sugerem que a YopJ possa ser uma protease ubiquitina-like, a qual tem sido envolvida na modulação de várias vias de sinalização de células eucarióticas (YEH et al., 2000). Aparentemente YopJ também estaria envolvida na supressão dos linfócitos B, uma vez que a amostra que não secreta esta Yop causa uma ativação dos linfócitos secretores de IgG3 e IgM. Já está bem estabelecido o papel de YopJ na inibição da síntese de citocinas, principalmente de TNF- α (PALMER et al., 1998). A YopP de *Y. enterocolitica* é capaz de, simultaneamente, bloquear a via do NF- κ B e desencadear a apoptose em macrófagos (RUCKDESCHEI et al., 2001b). RUCKDESCHEL et al. (2001a) demonstraram que a arginina-143 da YopP de *Y. enterocolitica* é crucial na determinação da supressão do NF- κ B e na indução de apoptose em macrófagos. A YopJ de *Y. pseudotuberculosis* também causa inibição da ativação do NF- κ B e da expressão de citocinas (SCHESSER et al., 1998).

A proteína YopM (41 kDa) possui uma função enigmática até o momento. Ela consiste quase inteiramente de seqüências semelhantes às repetições ricas em leucinas (LRRs) (Evdokimov et al., 2001) e tem se mostrado essencial para a virulência em modelos murinos de infecção (LEUNG et al., 1990). Acredita-se que o domínio LRR seja um motivo funcional de interação entre proteínas numa variedade de vias de sinalização no interior da célula e também no meio extracelular, e exatamente esta diversidade tem dificultado a descoberta da via exata que a YopM poderia afetar (JURIS et al., 2002). Estudos têm demonstrado

que a YopM não é apenas translocada dentro das células HeLa durante infecção com *Yersinia*, mas também se localiza no núcleo dessas células, trafegando através de uma via associada a vesículas (SKRZYPEK et al., 1998). McDonald et al. (McDONALD et al. 2003), demonstraram que a YopM se liga e promove a atividade quinase da proteína quinase C2-like e da proteína quinase-1 ribossomal S6, o que poderia explicar o efeito da YopM sobre a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e crescimento celular (SAUVONNET et al., 2002b). A YopM pode ter muitos efeitos patogênicos, e um deles pode ocorrer no núcleo, modulando a expressão gênica do hospedeiro em benefício do patógeno (SKRZYPEK et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que YopM de *Y. pestis* interfere com a imunidade inata causando depleção de células NK, possivelmente por afetar a expressão do receptor α da IL-15 e da própria IL-15 (KERSCHEN et al., 2004). Observamos que os animais infectados com a amostra mutante para YopM apresentaram uma redução significativa no número de linfócitos secretores de imunoglobulinas inespecíficas, dos isotipos IgG2b de 1,6 vezes, IgM de 4,4 vezes e IgA de 2,5 vezes no 21o dia após infecção e de IgG1 de 2,4 vezes, IgG3 de 2,6 vezes e IgA de 3,8 vezes no 28o dia após infecção em relação aos controles. A YopM, é essencial para virulência, uma vez que mutantes para yopM de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são avirulentas quando inoculadas por via intravenosa (LEUNG et al., 1990, MULDER et al., 1989).

A YpkA (“*Yersinia* protein kinase A”, YopO em *Y. enterocolitica*) é outra Yop com 81 kDa que apresenta extensa homologia com proteínas eucarióticas, mais propriamente com a família PSK das proteínas serina/treonina quinases. Ela se autofosforila e, assim como a Yop H, interfere com a transdução de sinais nas células do hospedeiro por interferir com os níveis celulares de fosforilação (Hakansson et al., 1996; Hartland & Robins-Browne, 1998). Juris et al. (2000) relataram que a YpkA é inicialmente produzida como uma kinase inativa que é posteriormente ativada pela actina, durante a translocação para dentro da célula do hospedeiro. A interação entre YpkA e actina sugeriu que mudanças morfológicas induzidas pela YpkA poderiam ser causadas por mudanças no citoesqueleto de actina (Juris et al., 2000), e que o rompimento deste pela YpkA poderia ser mediado devido à sua habilidade em interagir com a pequena GTPase

RhoA (BARZ et al., 2000; DUKUZUMUREMYI et al., 2000). Através dessa habilidade em romper o citoesqueleto de actina, YpkA pode prejudicar a fagocitose da *Yersinia* por macrófagos e também a movimentação dessas células em direção às áreas de infecção (JURIS et al., 2002). Observamos que os animais infectados com a amostra mutante para YpkA apresentaram um aumento significativo no número de linfócitos secretores de imunoglobulinas inespecíficas, dos isotipos IgG2b de 1,4 vezes, e IgM de 1,9 vezes no 21o dia após infecção, em relação aos controles e uma redução significativa no número de linfócitos secretores de IgA de 1,4 vezes, no 14o dia após infecção. Para os isotipos IgG1, IgG2a e IgG3, não foi observada nenhuma diferença significativa no número de linfócitos secretores desses isotipos em relação aos controles em nenhum dia.

Quanto aos linfócitos secretores de Igs específicas anti-*Yersinia* e anti-Yops, foram detectadas células secretoras de todos os isotipos no 7o, 14o, 21o e 28o dias após infecção, tanto na placa sensibilizada com a solução de "Yops", como na placa sensibilizada com extrato bruto, para ambos os lotes inoculados com a amostra YpIIIpIB44 (Ypk A-), ou com a amostra YpIIIpIB141 (Yop M-). Os spots específicos foram observados em grande parte dos animais estudados. Esse resultado contrasta com o obtido com a amostra selvagem YpIIIpIB102 (wt) em que apenas um dos animais estudados apresentou poucas células secretoras dos isotipos IgG2b e IgG3. Não foram detectados spots específicos para os animais controles.

Nosso grupo (Monnazzi et al., 2004) estudou a influência que as diferentes Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis* exercem sobre os macrófagos quanto à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α , e NO. Para tanto, camundongos foram infectados com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*, mutantes para determinadas Yops. Verificamos que as Yops podem suprimir a produção de IL-12, TNF- α e NO e que as principais proteínas envolvidas nesta inibição são a YopE e a YopH.

Quanto à detecção de anticorpos IgG e IgM, anti-*Yersinia* e anti-"Yops" no soro dos animais infectados, através do teste ELISA, verificamos a ausência destes anticorpos no soro dos camundongos inoculados com as amostras mutantes de *Y. pseudotuberculosis* Yop E-, Yop H-, Yop J-, Ypk A- e Yop M-. Este

resultado difere do que foi observado com a amostra selvagem YpIIIpIB102 (wt), que provocou um aumento crescente do nível de anticorpos séricos anti-*Yersinia* e anti-"Yops", do isotipo IgG, com um pico no 21º dia após infecção.

Podemos observar que existe uma incoerência entre os resultados do ELISPOT específico e aqueles obtidos por ELISA. Embora tenha sido possível a detecção de anticorpos específicos no soro dos animais infectados com a amostra selvagem, não foram detectados spots específicos. Por outro lado, com as amostras mutantes para YopJ e YpkA, foi possível a detecção de spots específicos com as células esplênicas de alguns animais (não todos), e não foram detectados anticorpos séricos através do teste ELISA.

Esses soros foram testados através da técnica de DOT-BLOT, utilizando um reagente quimioluminescente, a fim de verificar a presença de auto-anticorpos, no soro dos animais infectados, contra colágeno tipo II, fosforilcolina, mielina, miosina, tireoglobulina e cardiolipina. Os auto-anticorpos foram detectados apenas no soro dos animais infectados com a amostra selvagem YpIIIpIB102 (wt), contra miosina, tireoglobulina, cardiolipina, fosforilcolina e mielina. Não foram detectados auto-anticorpos no soro de nenhum animal inoculado com as amostras mutantes de *Y. pseudotuberculosis* YopE-, YopH-, YopJ-, YpkA- e YopM-.

Ramos et al. (2005), ao estudarem a produção de auto-anticorpos associada com a ativação policlonal em camundongos infectados com *Y. enterocolitica* O:8, verificaram que tanto a amostra virulenta como seu par isogênico avirulento promoveram uma ativação policlonal de linfócitos B, principalmente daqueles secretores de IgM, com pico de secreção entre o 28º e 42º dia após infecção. Silva et al. (2003) ao estudar a produção "in vivo" de anticorpos provocada por uma amostra de *Y. enterocolitica* O:3, isolada de paciente com artrite reativa, também observaram uma ativação policlonal de linfócitos B, com aumento da secreção de imunoglobulinas dos isotipos IgG2a e IgG3. Em outro trabalho nosso grupo demonstrou que *Y. enterocolitica* WA-2707 (sorotipo O:8) foi capaz de promover a ativação policlonal de linfócitos B, com predomínio dos isotipos IgG2a e IgG3 na linhagem de camundongos suscetível à infecção (BALB/c) e IgG2a na linhagem resistente à infecção (C57Bl/6), o que

condiz com o diferente perfil de citocinas regulatórias e pró-inflamatórias observado nestas linhagens de camundongos (dados submetidos à publicação). Esses resultados diferem dos observados com a amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB102 (wt) onde não se observou nenhuma ativação policlonal, e confirmam a diferença na capacidade imunomoduladora das proteínas Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*.

VI- CONCLUSÕES

- 1 – A amostra selvagem de *Y. pseudotuberculosis*, YpIIIpIB102, inoculada em camundongos por via intravenosa, não provocou ativação policlonal dos linfócitos B.
- 2 – A amostra YpIII pIB522, defectiva na secreção de YopE, causou uma diminuição no número de linfócitos B secretores de imunoglobulinas inespecíficas dos isotipos IgG2a, IgM e IgA.
- 3 – A amostra YpIII pIB29, defectiva na secreção de YopH, causou uma ativação dos linfócitos B secretores de imunoglobulinas inespecíficas dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG3.
- 4 - A amostra YpIII pIB252, defectiva na secreção de YopJ, causou um aumento no número de linfócitos secretores de imunoglobulinas inespecíficas dos isotipos IgG3 e IgM, e uma diminuição no número de células secretoras do isotipo IgG1.
- 5 – A amostra YpIII pIB141, defectiva na secreção de YopM, causou uma redução no número de linfócitos secretores de imunoglobulinas inespecíficas dos isotipos IgG1, IgG2b, IgG3, IgM e IgA.
- 6 - A amostra YpIII pIB44, defectiva na secreção de YpkA, causou um aumento no número de linfócitos secretores de imunoglobulinas inespecíficas dos isotipos IgG2b e IgM e uma redução no número de linfócitos secretores de IgA.
- 7 - Células secretoras de imunoglobulinas específicas anti-*Yersinia* e anti-Yops foram detectadas apenas nos animais infectados com a amostra selvagem e com as amostras mutantes YopM- e YpkA-.
- 8 - Nos animais infectados com *Y. pseudotuberculosis* YpIIIpIB102 (wt), observou-se um aumento crescente no título de anticorpos séricos anti-*Yersinia* e anti-"Yops", do isotipo IgG, com pico no 28º dia após infecção. Anticorpos IgM foram detectados no 7º dia após infecção.
- 9 - A amostra selvagem YpIIIpIB102 (wt), causou uma secreção de auto-anticorpos, no soro dos animais infectados, contra fosforilcolina, mielina, miosina, tireoglobulina e cardiolipina.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4th ed.,. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

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

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

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

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

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

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

BLACK DS, BLISKA JB. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. **Mol Microbiol**; v.37, p.515-527, 2000.

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

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

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

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

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

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

BOTTONE, E.J.; GULLANS, C.R.; SIERRA, M.F. Disease spectrum of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3, the predominant cause of human infection in New York City. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v.9, p.56-96, 1987.

CORNELIS, G. R. The *Yersinia* deadly kiss. **J. Bacteriol.**, 180: 5495-504, 1998.

COSTA, A. M. Células esplênicas secretoras de imunoglobulinas e anticorpos séricos em camundongos Swiss livres de patógenos específicos inoculados com *Yersinia enterocolitica* O:3 ou derivados. Campinas, 1995. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

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

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

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

EITEL, J.; DERSCH, P. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasion is repressed. **Infect. Immun.**, v.70, p.4880-4891, 2002.

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

FINLAY, B.; COSSART, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. **Science**, v.276, p.718-725, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

HEINICKE, E.; KUMAR, U.; MUNOZ, D. G. Quantitative dot-blot assay for proteins using enhanced chemiluminescence. **J. Immunol. Methods**, 152: 227-236, 1992.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1994. p.175-190, p.203-222.

IRIARTE, M.; CORNELIS, G.R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. **Mol. Microbiol.**, v.29,n. 3, p.915-929, 1998.

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

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

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

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, n. 8, p.4589-4602, 2004.

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

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

LEUNG, K.Y.; STRALEY, S.C. The YopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having a homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. **J. Bacteriol**, v.171, p.4623-4632, 1989.

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

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Microbiol. Chem.**, 193: 265-75, 1951.

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

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

MEDEIROS, B.M.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FALCÃO, D.P. Immunoglobulin isotypes produced by mice experimentally infected with *Yersinia* sp. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v.12, p.117-22, 1991.

MEDEIROS, B.M.M.; SOUZA, C.D.; HIGUTI, L.; MAIA, J.M.; SILVA, E.E.C. Papel das proteínas "Yops" de *Yersinia pseudotuberculosis* na ativação de linfócitos B. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.24, n.1, p.53-60, 2003.

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

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

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

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

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

MULDER, B.; MICHIELS, T.; SIMONET, M.; SORY, M.P.; CORNELIS, G.R. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. **Infect Immun**; v.57 (8), p.2534-41, 1989.

NEUTRA, M.R.; PRINGAULT, E.; PIERRE, J. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p.275-300, 1996.

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

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

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

PERRY, R. D.; STRALEY, S. C.; FETHERSTON, J. D.; ROSE, D. J.; GREGOR, J.; BLATTNER, F. R.. DNA sequencing and analysis of the low-Ca²⁺ response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5. **Infect. Immun.**,v. 66, p. 4611-4623, 1998.

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

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

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v.27(3), p. 493-497, 1938.

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

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

RUCKDESCHEL, K.; MACHOLD, J.; ROGGENKAMP, A.; SCHUBERT, S.; PIERRE, J.; ZUMBIHI, R.; LIAUTARD, J.P.; HEESEMANN, J.; ROUOT, B. *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase: correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha production. **J Biol Chem**; v.272, p.15920-15927, 1997.

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

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

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

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

SAUVONNET, N.; LAMBERMONT, I.; VAN DER BRUGGEN, P.; CORNELIS, G.R. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in

macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Mol Microbiol.**, v.45, p.805-815, 2002a.

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

SCHESSEK, K.; FRIHZ-LINDSTEN, E.; WOLF-WATZ, H. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. **J Bacteriol.**, v.178, p.7227-7233, 1996.

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

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

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

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

SORY, M.P.; BOLAND, A.; LAMBERMONT, I.; CORNELIS, G.R. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. **Proc Natl Acad Sci USA.**; v.92, p.11998-12002, 1995.

TOIVANEN, A.; GRANFORS, K.; LAHESMAA-RANTALA, R.; LEINO, R.; STAHLBERG, T.; VUENTO, R. Pathogenesis of *Yersinia*-triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. **Immunol. Rev.**, v.85, p.47-70, 1985.

Von PAWEL-RAMMINGEN, U.; TELEPNEV, M.V.; SCHMIDT, G.; AKTORIES, K.; WOLF-WATZ, H.; ROSQVIST, R. GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. **Mol Microbiol.**, v.36, p.737-744, 2000.

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

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