

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

**Influência da infecção por *Yersinia*
enterocolitica na modulação de macrófagos
M1 e M2 em camundongos suscetíveis e
resistentes**

Ana Rita Paladino Tumitan

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

Araraquara

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

**Influência da infecção por *Yersinia*
enterocolitica na modulação de macrófagos
M1 e M2 em camundongos suscetíveis e
resistentes**

Ana Rita Paladino Tumitan

**Tese para obtenção do título de doutor em
Análises Clínicas, Área Análises Clínicas.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de
Araraquara.**

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

Araraquara

2006

TERMO DE APROVAÇÃO

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Wirla Maria da Silva Tamashiro

Prof^a. Dr^a. Dagmar Ruth Stach-Machado

Prof^a. Dr^a. Cleni Mara Marzochi Machado

Prof^a Dr^a Maria Terezinha Serrão Peraçoli

DEDICATÓRIA

A minha mãe Lourdes, que com seu exemplo, despertou em mim o amor pelo estudo. Ao meu pai Giuseppe, in memoriam. Ao meu filho Eric, que me incentivou e me apoiou em todos os momentos deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois tudo foi feito por meio Dele, e, de tudo que existe nada foi feito sem Ele. Aos meus familiares e amigos pela compreensão, carinho e apoio.

À direção da Faculdade de Farmácia Bioquímica e da Faculdade de Ciências, Letras e Educação da UNOESTE, pela concessão da dispensa, possibilitando a realização deste trabalho e aos meus colegas de trabalho da UNOESTE, pela compreensão e colaboração durante minha ausência.

À minha orientadora, Profa. Dra. Beatriz Maria Machado de Medeiros, que com amizade, paciência e valiosos ensinamentos, guiou-me a cada passo na realização deste trabalho.

Aos amigos Luis Gustavo Silva Monnazzi e Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta, pela colaboração na escolha, padronização e execução dos métodos, ao amigo Fabrício Rodrigues Guiraldi pelo auxílio na execução dos protocolos e à amiga Marisa Campos Placeres, pela colaboração na execução de parte dos experimentos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química - UNESP) e à Prof^a. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos (Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP), por terem colocado seus laboratórios a disposição, possibilitando a realização de partes dos experimentos deste trabalho.

Ao meu filho Eric Paladino Tumitan pela revisão gramatical.

À Prof^a Denise di Giovanni Lambert pela orientação na escolha dos testes estatísticos. À bibliotecária Jakeline Ortega pela revisão das referências bibliográficas.

RESUMO

No modelo murino de infecção experimental por *Yersinia enterocolitica*, a resposta Th1 com macrófagos ativados é importante para recuperação e imunidade. A via utilizada pelos macrófagos para metabolizar a arginina, pode influenciar a resposta inflamatória de diferentes maneiras. Macrófagos de camundongos C57BL/6 utilizam a arginina preferencialmente pela via óxido nítrico sintase induzível (iNOS), o que caracteriza um perfil M1 (via destrutiva), enquanto que macrófagos de camundongos BALB/c fazem preferencialmente a via arginase, o que caracteriza um perfil M2 (via construtiva). O objetivo deste estudo foi verificar a influência da infecção por *Y. enterocolitica* na modulação de macrófagos M1 e M2 em camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6). Camundongos de ambas as linhagens foram infectados com *Y. enterocolitica* O:8 WA 2707. Células do lavado peritoneal e células esplênicas foram retiradas no 1º, 3º e 5º dia pós-infecção. Em cultura de macrófagos foi verificada a atividade das enzimas iNOS e arginase, medidas por seus produtos NO/citrulina e ornitina, respectivamente, e a produção de TGFβ-1. Em cultura de linfócitos foram verificadas as respostas Th1 e Th2, avaliadas pela produção das citocinas IFN-γ e IL-4. No 1º e 3º dia após infecção com *Y. enterocolitica*, os macrófagos de camundongos C57BL/6 aumentaram a produção de NO/citrulina e não produziram TGFβ-1; enquanto que os macrófagos de BALB/c aumentaram a produção de ornitina e de TGFβ-1. Os linfócitos de C57BL/6 aumentaram a produção de IFN-γ e não produziram IL-4, enquanto que os BALB/c apresentaram um aumento mais discreto nos níveis de IFN-γ e produziram IL-4 no 5º dia pós-infecção. Assim, na fase inicial, a infecção por *Y. enterocolitica* estimulou em camundongos C57BL/6, preferencialmente, a modulação de macrófagos M1 e linfócitos Th1; em camundongos BALB/c, preferencialmente a modulação de macrófagos M2 e linfócitos Th2. Nos BALB/c, esta infecção também pode levar à modulação de macrófagos M1, porém mais tardiamente (5º dia). A população predominante de macrófagos (M1 ou M2) nos primeiros dias da infecção parece ser importante na determinação da suscetibilidade ou resistência à *Y. enterocolitica*. Palavras chaves: macrófagos, iNOS, arginase, *Yersinia enterocolitica*.

ABSTRACT

In experimental murine *Yersinia enterocolitica* infection, Th1 response with activated macrophages is important for recovery and immunity. The pathway macrophages utilize to metabolize arginine can alter the outcome of inflammatory in different ways. Macrophages from C57BL/6 mice preferentially use the arginine by inducible nitric oxide synthase (iNOS) pathway, characterizing M1 profile (constructive via), while macrophages of BALB/c mice preferentially make the arginase pathway, characterizing M2 profile (destructive via). The objective of this study was to verify the modulation of *Y. enterocolitica* infection in M1 and M2 macrophage modulation in susceptible (BALB/c) and resistant (C57BL/6) mice. Both strains of mice were infected with *Y. enterocolitica* O:8 WA 2707. Peritoneal macrophages and spleen cells were obtained on days 1, 3 and 5 post infection. We verified the iNOS and the arginase activities in macrophage cultures, measured by their NO/citruline and ornithine products, respectively. The TGF β -1 production was also measured in supernatants of macrophage cultures. The Th1 and Th2 responses were evaluated in supernatants of lymphocyte cultures, by IFN γ and IL-4 production. In the 1st and 3rd day after infection with *Y. enterocolitica*, macrophages from C57BL/6 mice increased their NO/citruline production and they didn't produce TGF β -1 ; while macrophages from BALB/c mice increased their ornithine and TGF β -1 production. The lymphocytes from C57BL/6 mice increased their IFN γ production and didn't produce IL-4, while BALB/c showed a discreet increase in the IFN γ levels and produced IL-4 in the 5th day post-infection. Our results suggest that in the early phase of infection (1st. and 3rd. day), *Y. enterocolitica* preferentially stimulated in C57BL/6 mice M1 macrophage and Th1 lymphocyte modulation and in BALB/c mice, M2 macrophage and Th2 lymphocyte modulation. This infection also stimulated in BALB/c mice M1 macrophage modulation, however long after infection (5th. day). The M1 or M2 predominant macrophage population at the 1st and 3rd day of infection seems to be important in determining *Y. enterocolitica* susceptibility or resistance.

Key words: macrophages, iNOS, arginase, *Yersinia enterocolitica*.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 - Vias metabólicas da arginina e propriedades funcionais de macrófagos M1 e M2	21
Tabela 1 - Peso do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com <i>Yersinia enterocolitica</i> , em diferentes dias pós-infecção.	45
Figura 2 – Peso do baço de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados com <i>Yersinia enterocolitica</i> , em diferentes dias pós-infecção.	46
Tabela 2 - Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com <i>Y. enterocolitica</i> , em diferentes dias pós-infecção.	49
Figura 3 – Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados com <i>Y. enterocolitica</i> , em diferentes dias pós-infecção.	50
Tabela 3 - Produção de citrulina por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>Y. enterocolitica</i> em diferentes dias pós-infecção.	53
Figura 4 – Produção de citrulina por macrófagos de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados com <i>Y. enterocolitica</i> em diferentes dias pós-infecção	54
Tabela 4 - Produção de ornitina por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 em diferentes dias pós-infecção.	56
Figura 5 – Produção de ornitina por macrófagos de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B), em diferentes dias pós-infecção.	57

Tabela 5 - Produção de TGF- β 1 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com <i>Y. enterocolitica</i> , em diferentes dias pós-infecção.	59
Figura 6 – Produção de TGF- β 1 por macrófagos de camundongos BALB/c infectados com <i>Y. enterocolitica</i> , em diferentes dias pós-infecção.	60
Tabela 6 – Atividade fagocítica de macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com <i>Y. enterocolitica</i> , em diferentes dias pós-infecção.	61
Figura 7 – Atividade fagocítica de macrófagos de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados com <i>Y. enterocolitica</i> , em diferentes dias pós-infecção.	62
Tabela 7 - Produção de IL-4 por linfócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infetados com <i>Y. enterocolitica</i> em diferentes dias pós-infecção.	63
Tabela 8 - Produção de IFN- γ por linfócitos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados por <i>Y. enterocolitica</i> em diferentes dias pós-infecção.	65
Figura 8 - Produção de IFN- γ por linfócitos de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados por <i>Y. enterocolitica</i> em diferentes dias pós-infecção.	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMØs	Macrófagos alveolares
BAB	<i>Blood agar base</i>
BSA	<i>Bovine serum slbumine</i>
BSS	<i>Balanced salt solution</i>
CBS	<i>Carbonate-bicarbonate buffer</i>
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
Con A	Concanavalina A
CEMIB-UNICAMP	Centro Multinstitucional de Investigações Biológicas da Universidade Estadual de Campinas
DL ₅₀	Dose letal 50
DMEM	<i>Dubelcco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fc	Fragmento cristalizável
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HCl	Ácido clorídrico
HKY	<i>Heat-killed Yersinia</i>
HO-1	Hemeoxigenase-1

hsp-92	<i>Heat-shock protein-92</i>
ICB-USP	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo
IDO	Indolamina desidrogenase
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1R	Receptor da interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-18	Interleucina-18
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.v.	Intravenosa
LBP	<i>LPS binding protein</i>
LPS	lipopolissacarídeo
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
2-ME	2- mercaptoetanol
MPO	mieloperoxidase
NaCl 0,85%	Cloreto de sódio 0,85%

NADPH-oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogênio-fosfato-oxidase
NF-κB	<i>Nuclear factor kinase B</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS1	Óxido nítrico sintase-1, nNOS ou ncNOS, NOS clonada de neurônios
NOS2	Óxido nítrico sintase-2, iNOS, NOS clonada de macrófagos
NOS3	Óxido nítrico sintase-3, cNOS ou ccNOS, NOS clonada de células endoteliais
P ⁺	Portadora do plasmídeo de virulência
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI3K	<i>Pphosphatidylinositol 3-kinase</i>
PMØs	Macrófagos peritoneais
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
pYV	Plasmídeo de virulência de <i>Yersinia</i>
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
ROI	Reativos intermediários do oxigênio
SDS	Duodecil sulfonato de sódio
SHIP	<i>Src homology 2 containing inositol 5'-phosphatase</i>

SPF	<i>Specific pathogens free</i>
TGF- β	Fator transformador do crescimento- β
TGF- β 1	Fator transformador do crescimento- β 1
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TLR2	<i>Toll-like receptor-2</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor-4</i>
TLR6	<i>Toll-like receptor- 6</i>
TLR5	<i>Toll-like receptor- 5</i>
TLR9	<i>Toll-like receptor- 9</i>
TMB/H ₂ O ₂	Tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TSB	<i>Tripitic soy broth</i>
U.A.	Unidades arbitrárias
UFC	Unidade formadora de colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista
YadA	<i>Yersinia adhesin A</i>
Yops	<i>Yersinia outer proteins</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	32
3.1 Animais utilizados nos experimentos	32
3.2 Amostra Bacteriana utilizada na infecção experimental dos animais e no preparo do antígeno de <i>Yersinia</i>	32
3.2.1 Reativação da amostra de <i>Y. enterocolitica</i>	33
3.2.2 Preparo do antígeno de <i>Yersinia</i> (HKY <i>Heat-killed Yersinia</i>).....	33
3.2.3 Preparo do inoculo bacteriano.....	34
3.3 Infecção experimental dos animais	34
3.4 Obtenção e cultura das células do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	35
3.5 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y.</i> <i>enterocolitica</i>	36
3.6 Análise de citrulina e ornitina em sobrenadantes de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	36

3.7 Determinação de TGF- β 1 em sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	37
3.8 Ensaio para análise da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	38
3. 8.1 Crescimento e preparo das leveduras	38
3.8.2 Conjugação das leveduras com FITC	39
3.8.3 Atividade fagocítica de macrófagos	39
3.9 Obtenção de células esplênicas de camundongos C57BL/6 e BALB/c	40
3.10 Viabilidade das células esplênicas de camundongos C57BL/6 e BALB/c	41
3.11 Cultura de linfócitos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	42
3.12 Determinação de IFN- γ e IL-4 em linfócitos do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	42
3.13 Análises estatísticas dos dados.....	43
4. Resultados	44
4.1. Variação no peso do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com <i>Y. enterocolitica</i> , durante o período de observação.....	44

4.2 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	47
4.3 Análise de citrulina e ornitina em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	51
4.3.1 Dosagem de citrulina	51
4.3.2 Dosagem de ornitina	55
4.4 Determinação de TGF- β 1 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	58
4.5 Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	61
4.4 Determinação de IL-4 em linfócitos do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	63
4.5 Determinação de IFN- γ em linfócitos do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com <i>Y. enterocolitica</i>	64
5. Discussão	67
6. Conclusões	80
7. Referências Bibliográficas	81
Anexo.....	92

1. INTRODUÇÃO

O pioneiro no estudo da imunidade celular foi Elie Metchnikoff (1883), ao observar que certas células sanguíneas (leucócitos) eram capazes de englobar e destruir materiais estranhos como bactérias, trabalho que foi a base da teoria da imunidade celular (1892), hipótese que gerou muita oposição, particularmente dos cientistas que preconizavam serem apenas os fluídos corporais e substâncias solúveis do sangue (anticorpos) capazes de destruir microrganismos invasores (teoria da imunidade humoral). Embora a teoria humoral tenha prevalecido durante os 50 anos seguintes, na década de 1940 cientistas começaram a reexaminar o papel das células na defesa contra infecções. A teoria de Metchnikoff foi retomada quando aspectos de ambas as escolas (celular e humoral) se integraram para a compreensão moderna da imunidade (SILVERSTEIN, 1989).

Durante várias décadas os macrófagos foram considerados células secundárias do sistema imunológico (SILVERSTEIN, 1989) e, conseqüentemente, muito pouco estudados quando comparados aos linfócitos. Embora os imunologistas celulares das décadas de 60 e 70 já reconhecessem que a ativação de macrófagos era fundamental para a resistência às infecções por patógenos intracelulares (MACKANES, 1971), esta ativação era considerada totalmente dependente de células T e, portanto, os macrófagos tinham função acessória no processo.

Na filogenia, os linfócitos desenvolveram especificidade no reconhecimento de estruturas (HOFFMAN et al., 1999). A idéia de linfocentricidade do sistema imune é reforçada pelo fato de que roedores e humanos deficientes em linfócitos, sucumbem

rapidamente às infecções. Nas décadas de 80 e de 90, desenvolveu-se o paradigma no qual linfócitos T controlam o tipo de resposta imune, pelo perfil de citocinas que secretam (MOSMANN e COFFMAN, 1989; O' GARRA e MURPHY, 1994). As respostas imunes caracterizadas pela produção de IFN- γ por linfócitos T, que causam ativação de macrófagos, são chamadas Th1. As respostas imunes associadas com a produção de IL-4, IL-5 e IL-10 por linfócitos T, que inibem a ativação de macrófagos e estimulam a produção de anticorpos, são chamadas Th2. A infecção experimental de camundongos C57BL/6 e BALB/c por *Leishmania major* é um modelo típico de respostas Th1 e Th2 (HSIEH et al., 1995). Na leishmaniose experimental células T CD4⁺ de camundongos C57BL/6 (resistentes) expressam altos níveis de RNAm do interferon- γ (IFN- γ) e o RNAm da interleucina-4 (IL-4) é indetectável, enquanto que células T CD4⁺ de camundongos BALB/c (suscetíveis) expressam níveis elevados de RNAm da IL-4, e muito pouco RNAm do IFN- γ (HEINZEL et al., 1989; HEINZEL et al., 1991). Portanto, o IFN- γ , produzido por células Th1, controla a leishmaniose, pois ativa macrófagos para produção de óxido nítrico (NO), matando o parasita, enquanto que a IL-4, produzida por células Th2, leva à progressão da doença, pois suprime os mecanismos microbicidas dos macrófagos (HEINZEL et al., 1991). Vários estudos mostraram que macrófagos de linhagens de camundongos com perfil Th1 são mais facilmente ativados para produção de NO do que os macrófagos de linhagens com perfil Th2 (LIEW et al., 1991; STENGER et al., 1994; DILEEPAN et al., 1995). Chakkalath e Titus (1994) sugeriram que a capacidade de gerar respostas Th1 ou Th2 não depende exclusivamente de linfócitos T e que os macrófagos podem determinar o

tipo de resposta, em estudo onde macrófagos infectados com *Leishmania major*, mostraram capacidade aumentada de estimular preferencialmente resposta Th2.

Estudos relacionados com a regulação da diferenciação de linfócitos Th1 e Th2 publicados em 1999 relataram que células dendríticas têm potencial para regular a diferenciação de linfócitos T em fenótipos predominantes Th1 e Th2 (KALINSKI et al., 1999; MALDONATO-LOPES et al., 1999; PULENDRAN et al., 1999; RISSOAN et al., 1999). A diferença na produção precoce de interleucina-12 (IL-12) por células dendríticas pode influenciar a resistência ou suscetibilidade de camundongos C56BL/6 e BALB/c à *Listeria monocytogenes* (LIU et al., 2000). Sendo os macrófagos precursores das células dendríticas, estes também podem influenciar a resposta de linfócitos (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

O estudo de Mills et al. (2000) forneceu evidências que reforçam os postulados de que macrófagos de linhagens de camundongos com perfil Th1 e Th2, por eles denominados M1 ou M2, influenciam de formas diferentes as respostas adaptativas posteriores (Th1, Th2). Os macrófagos M1 apresentam uma resposta caracterizada pela produção predominante de óxido nítrico em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) ou IFN- γ exógeno, enquanto que macrófagos M2 produzem preferencialmente o fator transformador de crescimento β 1 (TGF- β 1). Macrófagos M1 e M2 podem não representar apenas diferentes estados de ativação celular, mas sim células expressando diferentes programas metabólicos.

Os macrófagos são células essenciais na defesa do hospedeiro, desempenhando vários papéis além de efector microbicida (NATHAN e HIBBS, 1991),

atuando como célula apresentadora de antígeno (UNANUE, 1984), no reparo de tecidos (LEIBOVICH e ROSS, 1975) e na angiogênese (FOLKMAN e KLAGSBRURN, 1987).

As moléculas microbianas ativam os macrófagos, que possuem receptores para vários componentes bacterianos comuns, como os receptores semelhantes à Toll (TLRs - *Toll-like receptors*). Os TLRs são receptores ancestrais que conferem especificidade ao sistema imune inato, pelo reconhecimento de padrões moleculares comuns associados aos patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) (MEDZHITOV e JANEWAY, 1997). TLR4 tem função de receptor de lipopolissacarídeo (LPS), um componente integral da membrana externa das bactérias Gram-negativas (TAKEUCHI et al, 1999). TLR2 é especializado no reconhecimento de lipoproteínas de diversas espécies bacterianas (ALIPRANTIS et. al., 1999). TLR6, juntamente com TLR2, reconhece zimosan e peptidoglicano (OZISKY et al., 2000; TAKEUCHI et al, 2001). TLR9 e TLR5 reconhecem DNA bacteriano (HEMMI et al., 2000) e flagelina (HAYASHI et al., 2001), respectivamente.

A presença de bactérias Gram-negativas é detectada por TLR-4 pela sua associação com a proteína de membrana CD14, a qual é um receptor para o LPS ligado à sua proteína ligadora de LPS (*LPS binding protein* - LBP) (TAKEUCHI et al., 1999). Diferentes TLRs, assim como diferentes combinações de TLRs podem ser utilizadas pelas células do sistema imune para reconhecer a grande variedade de PAMPs encontrada nos patógenos (AKIRA et al., 2001). TLR4 reconhece o LPS de *Yersinia*, porém outros PAMPs associados à *Yersinia* podem contribuir para a resposta de sinalização do TLR-4 dos macrófagos à bactéria. Outros receptores, além do TLR-4 podem estar envolvidos na estimulação da resposta à *Yersinia* e isto é sugestivo de uma hierarquia nos receptores de verificação de padrão (*Pattern recognition receptors* -

PRRs) do sistema imune para o reconhecimento de patógenos Gram-negativos, entretanto, são necessários novos estudos para identificar PRRs adicionais e as complexas relações entre as subfamílias de PRRs (ZANG e BLISKA, 2003).

No início de uma infecção, macrófagos e células dendríticas são ativados via TLRs e outros receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos e/ou seus produtos. Esta ativação induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, inclusive fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12), que iniciam uma série de eventos, promovendo a proteção contra infecções (imunidade inata) e levando à imunidade adaptativa. A resposta inflamatória é eventualmente abolida por citocinas antiinflamatórias, especialmente a interleucina-10 (IL-10). Estes mecanismos reguladores promovem a homeostasia e proporcionam tolerância ao choque séptico (revisto por BRUBAKER, 2003).

Os macrófagos podem ser ativados tanto para a defesa como para o reparo tecidual (ALBINA et al., 1990). Quando utilizam a arginina pela via óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produzindo NO e citrulina (via destrutiva), estão empenhados na defesa (ADAMS e HAMILTON, 1984; NATHAN e HIBBS, 1991), enquanto que quando utilizam a arginina, via arginase, produzindo ornitina e uréia (via construtiva), estão envolvidos na cicatrização de feridas (WILLIAMS-ASHMAN e CANELLAKIS, 1979; NATHAN e HIBBS, 1991; WU e MORRIS, 1998). A via utilizada pelos macrófagos para metabolizar a arginina pode influenciar a resposta inflamatória de diferentes maneiras (MILLS et al., 2000).

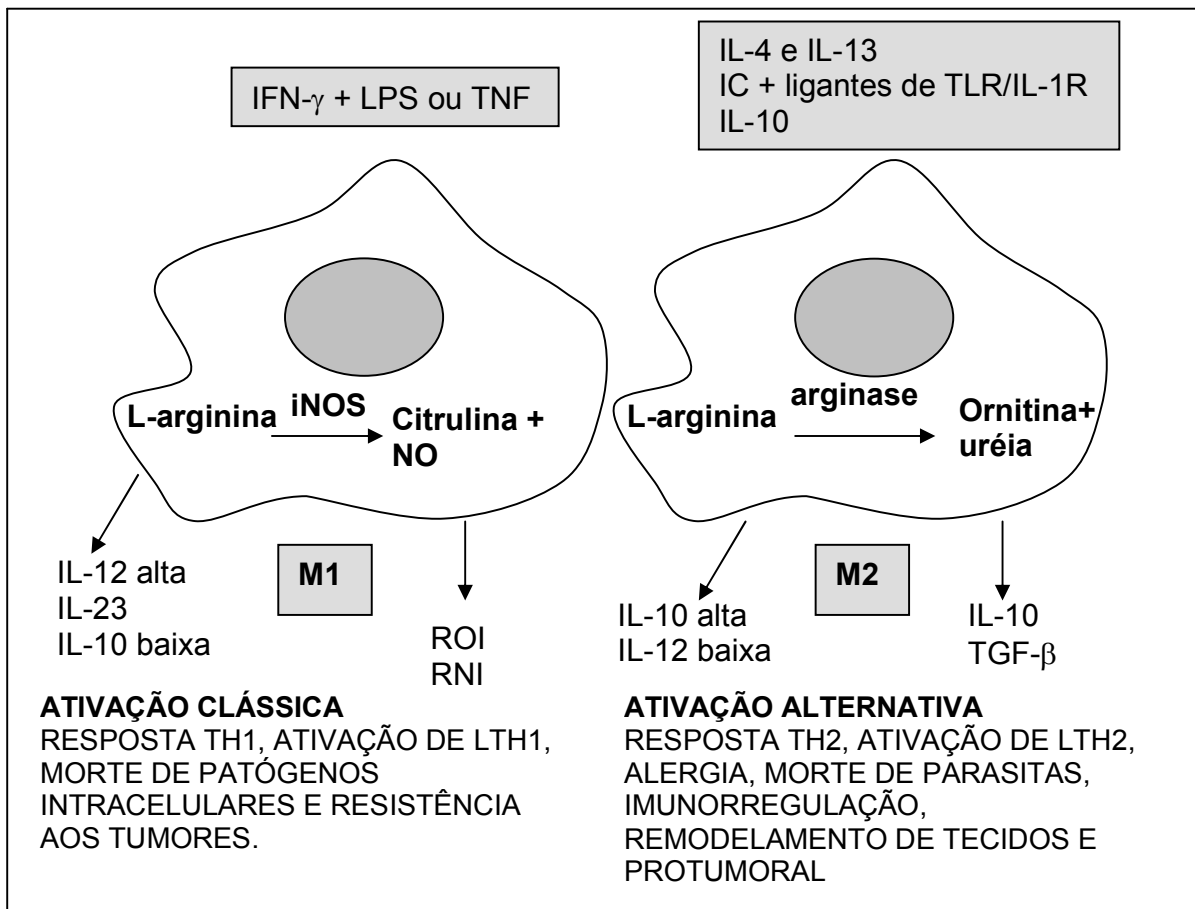


Figura 1 – Vias metabólicas da arginina e propriedades funcionais de macrófagos M1 e M2. Macrófagos polarizam e adquirem diferentes propriedades funcionais em resposta a sinais do ambiente. Macrófagos estimulados por IFN- γ e LPS são polarizados à M1, potencializando suas propriedades citotóxicas e anti-tumorais, enquanto que macrófagos M2 (induzidos por IL-4 e IL-13, imunocomplexos e agonista de TLR/IL-1R ou IL-10) estão relacionados com a morte de parasitas, imunossupressão e remodelamento tecidual. Abreviações: IFN- γ interferon- γ , LPS lipopolissacarídeo, TNF fator de necrose tumoral, IL interleucina, IC imunocomplexos, TLR receptor semelhante à Toll, TGF- β fator transformador do crescimento- β , RNI reativos intermediários do nitrogênio, ROI reativos intermediários do oxigênio, LTH1 linfócitos Th1, LTH2 linfócitos Th2. Adaptado de Mantovani et al. (2004).

Macrófagos ativados para a defesa (macrófagos inflamatórios) podem ser caracterizados pelo aumento das funções microbicida e citotóxica, que estão diretamente relacionadas com as vias metabólicas que envolvem as enzimas NADPH-oxidase/mieloperoxidase (MPO), NO-sintase (NOS) e indolamina-desidrogenase (IDO). O primeiro produto formado pela ação da NADPH-oxidase é o superóxido, a partir do qual se forma peróxido de hidrogênio, que por ação da MPO, origina ácido hipocloroso, o qual reage com aminas formando cloraminas, ou com o peróxido de hidrogênio, formando oxigênio singlete. Há ainda a possibilidade da formação de radicais hidroxilas pela reação de Haber-Weiss. A NO-sintase do macrófago ativado (iNOS), converte a L-arginina em oxigênio e N-hidroxil-L-arginina, que posteriormente resulta em citrulina e NO (NATHAN e SHILOH, 2000; BOGDAN, 2001).

Três genes que codificam a NO sintase são expressos como enzimas em mamíferos (MICHEL et al., 1996): NOS1 (nNOS ou ncNOS, clonada de neurônios), NOS2 (iNOS, clonada de macrófagos) e NOS3 (cNOS ou ccNOS, clonada de células endoteliais). Geralmente a expressão de NOS1 e NOS3 é constitutiva e estas desempenham funções fisiológicas em hospedeiros saudáveis, enquanto que a expressão de NOS2 (iNOS) é induzida durante inflamação e infecção (MACMICKING et al., 1997).

As três vias metabólicas (NADPH-oxidase/MPO, iNOS e IDO) interagem, gerando moléculas altamente tóxicas para microrganismos (NATHAN e SHILOH, 2000). A IDO, que também é induzida por IFN- γ ou LPS, cataboliza o triptofano em quineurina e outros compostos biologicamente ativos. O efeito antimicrobiano da IDO tem sido

atribuído à depleção de triptofano, que seria essencial para proliferação de microrganismos intracelulares (MELLOR e MUNN, 1999).

Uma das conseqüências da ativação de macrófagos é a imunossupressão, pois durante a ativação dos macrófagos, são formados NO e monóxido de carbono (CO), que possuem propriedades imunossupressoras (LEE e CHAU, 2002). Além destas moléculas, também é induzida a expressão daIDO, que tem a capacidade de inibir as células T, especialmente células T auto-reativas. Munn et al. (1998) demonstraram que a expressão deIDO na placenta é responsável pela ausência de rejeição do feto semi-alogênico pelas células T maternas. Em altas concentrações, NO pode inibir praticamente todas as células do sistema imune (células T e B, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) via indução de apoptose ou inibição de fatores de transcrição, citocinas, proteína quinases, expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC) e também da migração de células ao tecido inflamado, por inibição das moléculas de adesão ao endotélio (BOGDAN, 2001; SCHINDLER e BOGDAN, 2001).

A via metabólica da hemeoxigenase-1 (HO-1), que também é conhecida como proteína do choque térmico (hsp-92), converte hemoglobina em biliverdina, ferro e monóxido de carbono (CO). O CO é um potente agente antiinflamatório, pois inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e NOS2 induzida por LPS (LEE e CHAU, 2002).

Macrófagos ativados para o reparo tecidual utilizam preferencialmente uma via alternativa no metabolismo da arginina, catalisada pela enzima arginase, que leva à formação de ornitina e uréia. Isto faz sentido para um processo construtivo como a cicatrização de feridas, pois o excesso de NO inibe a replicação celular e a cicatrização, enquanto que a ornitina pode promover tais processos por ser um precursor das

poliaminas e do colágeno (NATHAN e HIBBIS, 1991; WU e MORRIS, 1998). A ornitina também atua como precursor da prolina na cicatrização de feridas (ALBINA et al., 1993). Anfíbios e mamíferos expressam duas isoformas de arginase, arginase I e arginase II (revisado por JENKINSON et al., 1996). A arginase I é uma enzima induzível, mas que é expressa exclusivamente no fígado, e atua na forma trimérica (KANYO et al., 1996). A arginase II é uma enzima mitocondrial, amplamente distribuída nos tecidos, principalmente nos rins, glândulas mamárias, próstata, intestino delgado e cérebro. A arginase induzível nos macrófagos murinos é a isoforma I. A isoforma extra-hepática, arginase II, é constitutivamente expressa em macrófagos (MUNDER et al., 1999).

Yersinia enterocolitica é uma bactéria Gram-negativa, patogênica para humanos, causando enterite e linfadenite mesentérica (CORNELIS et al., 1987; HEESEMANN et al., 1993). Em indivíduos imunocomprometidos, podem ocorrer infecções sistêmicas, incluindo microabscessos e lesões granulomatosas no fígado e baço (BOUZA et al., 1980). Alguns pacientes podem desenvolver poliartrite, tireoidite e doença de Reiter após infecções por *Y. enterocolitica* (BOTTONNE, 1977). A artrite reativa pode se desenvolver entre uma a três semanas após a infecção, variando de uma artralgia leve a poliartrite severa, que geralmente regride dentro de poucas semanas ou meses. Um subgrupo desses pacientes (10%) desenvolve uma artrite inflamatória crônica (LEIRISALO-REPO e SUORANTA, 1988).

O modelo murino de yersiniose estabelecido por Carter (CARTER e COLLINS, 1974) é o mais conveniente e mais amplamente utilizado para investigar a interação deste microrganismo com o hospedeiro, pois a infecção em camundongos é muito semelhante a dos humanos (CARTER, 1975). No modelo murino de infecção foi demonstrado que *Y. enterocolitica* é capturada por células M, localizadas dentro do

epitélio associado ao folículo das placas de Peyer (HANSKI et al., 1989; AUTENRIETH et al., 1996). Subseqüentemente, a bactéria coloniza as placas de Peyer e pode eventualmente se disseminar via linfática, e pela corrente sangüínea para os linfonodos, fígado, pulmões e baço. Análises histológicas e imunohistológicas sugerem que os mecanismos inatos do hospedeiro, incluindo leucócitos polimorfonucleares e macrófagos estão envolvidos no controle da *Y. enterocolitica* nas placas de Peyer (AUTENRIETH et al., 1996). A resolução da infecção envolve ainda células exterminadoras naturais (NK - *Natural killer*) e a ativação de respostas imunes adaptativas, incluindo células T CD4⁺ e CD8⁺ (AUTENRIETH et al., 1992; AUTENRIETH et al., 1993b; BOHN e AUTENRIETH, 1996).

A resposta protetora do hospedeiro à yersiniose é mediada por várias citocinas pró-inflamatórias. Foi demonstrado pela administração de anticorpos neutralizantes *in vivo* e pela infecção de camundongos deficientes em citocinas, que fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-12, IL-18 e IFN- γ são essenciais para resolução da infecção por *Yersinia*, sugerindo que os macrófagos ativados por citocinas são provavelmente os efetores finais no controle do patógeno (BOHN e AUTENRIETH, 1996; BOHN et al., 1998a; BOHN et al., 1998b).

Diferentes tipos de células reguladoras têm sido descritas incluindo células T CD4⁺ CD25⁺ (Treg), células Th3 produtoras de TGF- β , células Tr1 produtoras de IL-10 e células T CD8⁺ CD28⁺ (MALOY e POWRIE, 2001). Diferentes citocinas podem regular negativamente tanto a resposta imune normal quanto às respostas auto-imunes. TGF- β , IL-10 e IL-4, produzidas por células Th3 são consideradas moléculas inibitórias (LETTERIO e ROBERTS, 1998). TGF- β e IL-10 inibem tanto respostas

mediadas por células Th1 quanto por Th2 *in vivo*. IL-4 parece regular negativamente várias doenças auto-imunes mediadas por células Th1, enquanto, IFN- γ , parece inibir as respostas mediadas por células Th2 (MALOY et al, 2003). Entretanto, o papel imunorregulatório de TGF- β ainda não está totalmente esclarecido. TGF- β pode contribuir tanto para formação do foco inflamatório como para resolução da reação inflamatória aguda e restauração da homeostasia (LETTERIO e ROBERTS, 1998). Há dados contraditórios relatados sobre a influência de TGF- β nas respostas Th1, indicando que esta citocina pode estimular (FARGEAS et al., 1992; NAGELKERKEN et al., 1993) ou regular negativamente o desenvolvimento de células Th1 (HOHEN et al., 1995). Monócitos/macrófagos secretam TGF- β , que pode regular várias de suas atividades, ativando e desativando a expressão de citocinas, receptores, moléculas de adesão e também de pequenas moléculas efetoras como reativos intermediários do oxigênio e óxido nítrico (BOGDAN e NATHAN, 1993).

A imunidade inata, mediada por fagócitos e componentes do complemento, representa a primeira linha de defesa contra muitos tipos de microrganismos invasores. Cepas virulentas de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* replicam-se dentro de tecidos reticuloendoteliais e são predominantemente extracelulares, embora algumas bactérias possam ser englobadas por fagócitos profissionais e persistir dentro dessas células (HANSKI et al., 1989).

Estudos *in vivo* em modelo murino, forneceram evidências do papel da fagocitose na patogênese da infecção por *Yersinia* (HANSKI et al., 1991; AUTENRIETH et al., 1996). A evasão da ação microbicida dos fagócitos é um passo crítico na infecção por *Y. enterocolitica*. A estratégia usada por *Y. enterocolitica* para neutralizar as

defesas do hospedeiro é bastante complexa. A interação de *Y. enterocolitica* com macrófagos é caracterizada por interferência na fagocitose, na geração do *burst* oxidativo e na produção de TNF- α , culminando com apoptose (RUCKDESCHEL et al., 1997b).

A replicação da *Y. enterocolitica* nos tecidos linfóides depende da presença de um plasmídeo de virulência de 70 kb (pYV), que codifica proteínas denominadas Yops (*Yersinia outer proteins*) (STRALEY et al, 1993). As Yops têm papel central na virulência, permitindo à bactéria evadir da fagocitose, e conseqüentemente da morte por neutrófilos e macrófagos (HARTLAND, 1998). As Yops são produzidas por *Y. enterocolitica in vivo* em resposta ao contato com células do hospedeiro (SORY e CORNELIS, 1994). Após a ligação da bactéria com a superfície da célula do hospedeiro, pelo menos seis Yops (YopH, YopE, YopO, YopM, YopT e YopP) são translocadas dentro da célula. As proteínas Yops são exportadas pelo sistema de secreção de proteínas tipo III, codificado pelo plasmídeo de virulência (CORNELIS e WOLF-WATZ, 1997).

A YopH é uma proteína tirosina fosfatase (GUAN e DIXON, 1990), que produz desfosforilação das proteínas das células do hospedeiro. Essa proteína subverte o processo normal de transdução de sinais nas células eucariotas (ANDERSON et al., 1996, BLISKA et al., 1992). A principal contribuição de YopH na patogênese de *Yersinia* é a resistência à sua captura por fagócitos (função antiinvasiva). Quando a bactéria está opsonizada por anticorpo, YopH também inibe a fagocitose mediada por receptores Fc e o *burst* oxidativo de macrófagos, sugerindo que também pode interferir na via de transdução de sinais mediada por receptor Fc (FÄLLMAN et al., 1995).

YopE é uma proteína de 25 kDa que induz citotoxicidade em células epiteliais e macrófagos. Essa proteína penetra nas células do hospedeiro e causa ruptura na estrutura dos microfilamentos de actina (ROSQVIST et al., 1991). YopH e YopE juntas são responsáveis pela inibição da fagocitose e pela supressão do *burst* oxidativo de fagócitos profissionais (ROSQVIST et al., 1990; BLISKA e BLACK, 1995; FÄLLMAN et al., 1995; RUCKEDSCHEL et al., 1996).

YopO (YpkA) é capaz de autofosforilar, mas seu substrato em células eucariotas ainda não foi encontrado. Quando estudada na ausência de YopH e YopE esta enzima induz um efeito citotóxico em células HeLa. YopO, assim como YopH e YopE, pode interferir com vias de transdução de sinais da célula do hospedeiro, em nível de fosforilação (HAKANSSON et al., 1996).

YopM é uma proteína de 41 kDa que inibe *in vitro* a agregação de plaquetas induzida por trombina (LEUNG et al, 1990). Mutantes YopM têm virulência atenuada para camundongos, possivelmente porque YopM interfere na capacidade de produzir uma resposta inflamatória (MULDER et al., 1989).

YopT causa ruptura da estrutura de microfilamentos de actina (IRIARTE e CORNELIS, 1998). YopP em células eucariotas inibe a sinalização via fator nuclear kinase B (*nuclear factor kinase B* - NF-kB), resultando na inibição da produção de citocinas e/ou apoptose (RUCKDESCHEL et al., 2001).

Outro fator de virulência codificado por plasmídeo é a YadA, uma adesina que medeia a aderência a células epiteliais, proteínas da matriz extracelular, bem como a resistência às defensinas, fagocitose e lise pelo complemento (EL TAHIR e SKURNIK, 2001). Sing et al. (2002) demonstraram que uma proteína não lipídica de *Yersinia* associada à virulência é capaz de induzir a produção de IL-10, através da via de

sinalização TLR2/CD14, causando supressão de TNF- α e provavelmente possibilitando a evasão do sistema imune do hospedeiro.

Há controvérsias a respeito da capacidade de *Y. enterocolitica* de replicar-se dentro de macrófagos, entretanto vários relatos na literatura forneceram evidências desta possibilidade. Une (1977) mostrou que uma cepa virulenta de *Y. enterocolitica*, portadora do plasmídeo de virulência (P⁺) sorogrupos 3 e 9, foi capaz de sobreviver e replicar-se em macrófagos peritoneais de coelho, enquanto que cepas não patogênicas de outros sorogrupos foram eliminadas nestas células. Estudos posteriores mostraram que cepas P⁺ O:8 e O:9 de *Y. enterocolitica* replicam-se em macrófagos murinos (TABRIZI e ROBINS-BROWNE, 1992; PUJOL e BLISKA, 2005).

Quando os macrófagos são expostos ao IFN- γ , tornam-se ativados e apresentam um aumento da atividade bactericida contra microrganismos intracelulares. Grant e cols. (1999) mostraram que *Y. enterocolitica* não é capaz de sobreviver em macrófagos ativados por IFN- γ . Pujol e Bliska (2005) adicionaram IFN- γ em macrófagos murinos 20 minutos após terem fagocitado a bactéria e verificaram que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* continuaram a se replicar, enquanto que *Y. enterocolitica* foi morta nestas células.

A resistência à *Y. enterocolitica* difere entre as linhagens de camundongos (HANCOCK et al., 1986). Certas linhagens de camundongos (BALB/c, C3H/HeN, BALB/b, DBA/2, Swiss e SWR) são altamente suscetíveis à infecção por *Y. enterocolitica*, enquanto que outras, como C57BL/6 e B10D2, são resistentes (AUTENRIETH et al., 1994; HANCOCK et al., 1986). A resistência de camundongos C57BL/6 à *Y. enterocolitica* parece ser multigênica, com pelo menos dois genes

autossômicos dominantes envolvidos. Além dos genes do MHC, outros genes são importantes na resistência (HANCOCK et al., 1988).

O balanço entre as respostas Th1/Th2 parece estar envolvido na recuperação e imunidade a *Yersinia*. Linhagens de camundongos relativamente resistentes à infecção por *Y. enterocolitica* fazem uma resposta tipicamente Th1. Nestes animais, o IFN- γ tem papel fundamental na eliminação da infecção, sugerindo que macrófagos ativados contribuem para a recuperação (AUTENRIETH et al., 1994; BOHN et al., 1994). Camundongos suscetíveis à *Y. enterocolitica* fazem resposta tipicamente Th2, produzindo pouco IFN- γ e altos níveis de IL-4 comparados com camundongos resistentes (AUTENRIETH et al., 1994; BOHN et al., 1994; BOHN e AUTENRIETH, 1996). Adicionalmente, HANDLEY et al. (2004) sugeriram que camundongos BALB/c possuem uma resposta demorada na ativação de células T, correlacionada com o baixo nível de citocinas Th1, resultando em maior suscetibilidade, comparada com aquela apresentada por camundongos C57BL/6.

Entretanto, há carência de estudos envolvendo as respostas de macrófagos M1 e M2 na infecção por *Y. enterocolitica*. Tendo em vista a importância da resposta Th1 na recuperação da infecção por *Y. enterocolitica*, que os macrófagos podem influenciar esta resposta, e que o modelo de infecção em camundongos por este microrganismo pode contribuir para esclarecer o funcionamento da resposta imune em infecções por outros patógenos Gram-negativos; interessamos-nos em estudar a infecção por *Y. enterocolitica* em camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C56BL/6), enfocando a modulação de macrófagos M1 e M2.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Estudar a influência da infecção por *Y. enterocolitica* na modulação de macrófagos M1 e M2 em camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C56BL/6).

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Em macrófagos coletados de cavidades peritoneais de camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6), infectados ou não com *Y. enterocolitica* e estimulados *in vitro* com LPS (de *E. coli*) ou com HKY (*Heat-Killed Yersinia*), verificar:

- A atividade da iNOS e da arginase, medida por seus produtos NO, citrulina e ornitina, respectivamente;

- A produção de TGF β -1;

- A atividade fagocítica.

2.2.2 Em linfócitos coletados de baços de camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6), infectados ou não com *Y. enterocolitica* e estimulados *in vitro* com Con A (Concanavalina A) ou com HKY, verificar as respostas Th1 e Th2, medidas pela produção das citocinas IFN- γ e IL-4.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados nos experimentos

Foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6 e BALB/c de origem SPF (*specific pathogen free*), com idade entre 6 e 8 semanas.

Os animais foram adquiridos do Centro Multinstitucional de Investigações Biológicas da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP) e do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (ICB - USP). Após serem retirados das condições originais (SPF), os animais foram transportados em micro-isoladores e alojados no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP – Campus Araraquara) e mantidos em isoladores, com acesso à ração e água estéreis, durante todo o período de experimentação. A serragem e a água foram esterilizadas em autoclave a 120°C por 15 minutos antes de serem utilizadas e foram trocadas diariamente.

3.2 Amostra Bacteriana utilizada na infecção experimental dos animais e no preparo do antígeno de *Yersinia*

Yersinia enterocolitica WA-2707, portadora do plasmídeo de virulência, biotipo 2, sorotipo O:8, lisotipo X₂. A amostra foi gentilmente fornecida pela Prof^a. Dr^a. Deise Pasetto Falcão, responsável pelo laboratório de Referência em *Yersinia* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP. A amostra foi estocada a -70° C, em TSB (*tripitic soy broth*) e glicerol. Antes da utilização da amostra bacteriana para a infecção

experimental dos animais, a presença do plasmídeo de virulência foi confirmada através da técnica de Birboim modificada por Lee Ryley (BIRBOIM e DOLY, 1979).

3.2.1 Reativação da amostra de *Y. enterocolitica*

Antes de ser utilizada, a amostra foi reativada através de passagem em camundongo.

Uma alçada do estoque foi inoculada em TSB, incubada à 25° C, por 24 horas e a seguir plaqueada em meio BAB (*blood agar base*), incubada à 25° C, por 48 horas, para crescimento de colônias e preparo de uma diluição em salina fisiológica estéril (NaCL 0,85%), cuja densidade ótica foi ajustada a 0,36 com auxílio de uma espectrofotômetro (Du Life Science UV/Vis Spectofotomer – BECKMAN), em comprimento de onda de 550 nm. Estando padronizado que este valor de densidade ótica é suficiente para promover um crescimento bacteriano de 10^{10} UFC/mL, foi preparada a partir desta suspensão, a dose para inoculação (2×10^6 células/animal), por via intravenosa.

3.2.2 Preparo do antígeno de *Yersinia HKY* (*Heat-killed Yersinia*)

Uma alçada retirada do estoque da amostra bacteriana foi inoculada em TSB e incubada a 25° C, por 24 horas. As bactérias foram mortas pelo calor, através de incubação a 60° C por uma hora. O sedimento bacteriano foi então coletado por centrifugação, (Centrífuga Beckman Avanti TM 30); lavado duas vezes com salina tamponada fosfato (PBS - *phosphate-buffered saline*) pH 7,2 e as bactérias ressuspendidas em PBS. Esta suspensão bacteriana foi congelada e posteriormente

liofilizada, de modo que nesta forma possibilitasse o uso na concentração adequada de 10 µg de liofilizado/mL (peso/volume).

3.2.3 *Preparo do inóculo bacteriano*

O inóculo bacteriano para infecção dos animais, foi preparado utilizando-se o crescimento bacteriano obtido no meio de cultura BAB, resultante do plaqueamento do baço. A partir deste, foi preparada uma diluição em salina fisiológica correspondente a 10^{10} UFC/mL, conforme descrito no item 3.2.1 e a partir desta, as suspensões adequadas para inoculação. Uma suspensão de 10^4 UFC/mL foi utilizada para plaqueamento em meio de cultura BAB (0,1 mL), a fim de se proceder à posterior contagem do número de colônias e confirmação da dose utilizada no inóculo.

3.3 *Infecção experimental dos animais*

Lotes de cinco animais por grupo de experimento foram infectados com a amostra de *Y. enterocolitica* sorotipo O: 8 WA 2707, 2×10^4 células/mL para C57BL/6 (DL₅₀ parenteral) e 5×10^2 células/mL para BALB/c (DL₅₀ parenteral) (AUNTENRIETH et al., 1993a), mantendo-se sempre o mesmo número de animais não infectados para controle. A inoculação foi feita por via intravenosa (i.v.), injetando-se 0,2 mL da suspensão na veia da cauda. Os grupos de animais infectados e controles foram sacrificados no primeiro, terceiro e quinto dia pós-infecção, os lavados peritoneais e os baços foram coletados em condições assépticas e as respectivas suspensões celulares de macrófagos e de linfócitos, preparadas como descrito a seguir.

3.4 Obtenção e cultura das células do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com *Y. enterocolitica*

Camundongos infectados e controles foram previamente inoculados com 3 mL de meio de Tioglicolato (Difco) 3%, pela via intraperitoneal, com a finalidade de estimular os macrófagos desta cavidade. Após 3 dias de estímulo, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e em seguida tiveram a cavidade peritoneal exposta. As células peritoneais foram coletadas por meio de injeção de 5 mL de PBS pH 7,2 estéril, gelado, e massagem peritoneal. Estas células foram dispensadas em tubo cônico estéril, que permaneceu em banho de gelo. As células foram então lavadas duas a três vezes, através de centrifugação a 358g (Centrífuga Fanem Excelsa II 206MP), durante 5 minutos em PBS estéril, e a seguir ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640 suplementado, para contagem em câmara de Neubauer.

O RPMI-1640 utilizado durante todo esse processo continha 1100µM de arginina e foi suplementado com 12,5 mM HEPES, 2 g/L de bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina, 5 x 10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol (2-ME) e 10% de soro fetal bovino (FBS - *Fetal bovine serum*, Cultilab).

Após a contagem, a diluição da suspensão foi ajustada a 5 x 10⁶ células/mL e esta foi distribuída em placas descartáveis de 48 cavidades. As placas contendo as diluições adequadas de células (500 µL/cavidade) foram incubadas durante uma hora em estufa a 37° C, contendo 95% de umidade e 5% de CO₂, para aderência das células. As células não aderentes foram removidas por inversão da placa e as aderentes foram cultivadas por 48 horas, nas mesmas condições de temperatura,

tensão de CO₂ e umidade, na presença de 10 µg/mL de LPS (*Escherichia coli* O: 111 B4 - Sigma), ou 10 µg de HKY (*Heat-killed Yersinia*) liofilizado/mL, ou mesmo na presença de RPMI 1640 suplementado.

Após 48 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados para posterior determinação de óxido nítrico (NO), produção de aminoácidos (ornitina e citrulina) e produção de citocina (TGF-β1).

3.5 Dosagem de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com Y. enterocolitica

A dosagem de NO foi realizada em sobrenadantes das culturas de macrófagos, após incubação conforme descrito no item 3.4.

A avaliação foi feita medindo-se a concentração de nitrito acumulado (produto estável da degradação do óxido nítrico), através da reação de diazotação, com reagente de Griess (sulfanilamida 1%, naftilenodiamina dihidrocloro 0,1% em 5% de ácido fosfórico), conforme o método de Green et al. (1982). Os testes foram feitos em duplicata e os valores expressos em µmol de NO₂⁻/ 2,5 x 10⁶ células.

3.6 Análise de citrulina e ornitina em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com Y. enterocolitica

Os aminoácidos (ornitina e citrulina) foram dosados no departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

As amostras para análise de aminoácidos (sobrenadantes das culturas de macrófagos), foram desproteinizadas pela adição de igual volume de Seraprep (Pikering Labs, Mountain View, CA), seguida de repouso a 4° C por 10 minutos. As proteínas desnaturadas foram então removidas por centrifugação, 14.000 g por 5 minutos (MILLS et al., 1992). Após a etapa acima, 200 µL de amostra foram diluídos em 800 µL de tampão citrato de sódio pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex - Millipore antes de ser injetada no analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método da derivatização pós-coluna por orto-phtalaldeído (OPA). O sistema é periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos com concentração de 100 nmol/mL, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra.

3.7 Determinação de TGF-β1 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com Y. enterocolitica

A citocina (TGF-β1) foi dosada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos, após ativação das amostras pelo tratamento com HCl 1N e NaOH 1N, utilizando o Kit comercial (BD Biosciences), cuja sensibilidade é de 4 pg/mL. O método empregado foi ensaio imunoenzimático de fase sólida (*Enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA), utilizando anticorpo de captura, anticorpo de detecção, estreptavidina/peroxidase e tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio (TMB/H₂O₂). A curva de calibração foi

preparada por meio de diluição seriada do padrão reconstituído de TGF- β 1 recombinante, fornecido pelo fabricante (diluições de 4000 pg/mL a 65,5 pg/mL)

3.8 Ensaio para análise da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com Y. enterocolitica.

No ensaio para análise da atividade fagocítica foi utilizado o teste fluorimétrico (RAGSDALE e GRASSO, 1989).

3.8.1 Preparo das leveduras

A amostra de *Saccharomyces cerevisiae* foi fornecida pela Prof^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes-Gianinni, responsável pelo laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. Colônias de leveduras produzidas em ágar Sabouraud (Difco) dextrose foram subcultivadas em caldo nutriente (Difco) suplementado com 2% de glicose. As culturas foram mantidas em caldo nutriente, a 4° C e repicadas mensalmente.

Para o ensaio da atividade fagocítica foi utilizado o crescimento obtido em caldo nutriente, a 30° C, por 24-36 horas, sob agitação (*G4 Environmental Incubator Shaker*). As leveduras foram lavadas por três vezes com PBS, mortas pelo calor por fervura durante 60 minutos e lavadas mais duas vezes em PBS, por centrifugação. O sedimento foi liofilizado e mantido a 4° C.

3.8.2 Conjugação das leveduras com FITC (*isotiocianato de fluoresceína*)

O liofilizado de leveduras foi reconstituído em PBS e centrifugado. O sedimento foi lavado uma vez com tampão carbonato-bicarbonato (CBS - *Carbonate-bicarbonate buffer*) e ressuspendido em CBS, a 4×10^8 células/mL. Foi então acrescentado igual volume de dimetilsulfóxido (DMSO) contendo 100 μg de FITC (Sigma) e a mistura permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir, foi adicionado à suspensão igual volume de PBS e as leveduras foram lavadas por centrifugação. O sedimento resultante foi ressuspendido em CBS contendo 4% de soro albumina bovina (BSA - *Bovine serum albumine*) a 4×10^8 células/mL e deixado à temperatura ambiente por 15 minutos, para ligação do FITC não conjugado a BSA e a seguir foi centrifugado. O sedimento foi ressuspendido novamente em CBS-BSA e centrifugado. Para remover a BSA, foram realizadas duas lavagens por centrifugação, uma com PBS e outra com DMEM (*Dubelcco's modification of Eagle's medium*) + 20% de FBS e ressuspendidas no mesmo meio a 4×10^7 células/mL. A suspensão de leveduras conjugadas foi armazenada a 4° C até o momento do uso (produto estável por três meses, sem perda da fluorescência).

3.8.3 Atividade fagocítica de macrófagos

Células do lavado peritoneal foram obtidas em PBS, centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS por centrifugação e ressuspendidas em 1 mL de DMEM suplementado com 10% FBS para contagem. A suspensão celular foi ajustada a 5×10^5 células/mL.

O ensaio foi realizado dispensando-se 250 μL da suspensão de macrófagos em cada poço da placa (duplicata). As placas foram incubadas por 1 h em estufa a 37° C, contendo 95% de umidade e 5% de CO_2 , para aderência e as células não aderentes foram removidas por inversão da placa. O volume original de cada poço foi restabelecido com o meio e foram acrescentados 250 μL /cavidade das leveduras conjugadas com FITC (4×10^7 células/mL). As placas foram incubadas por 15 minutos nas mesmas condições de temperatura, tensão de CO_2 e umidade. A fagocitose foi interrompida colocando-se a placa a 0° C (gelo). O sobrenadante foi removido por inversão da placa e acrescentou-se a seguir 350 μL /cavidade do meio gelado (4° C) e o sobrenadante foi removido por inversão da placa. A lavagem foi repetida duas vezes. Os macrófagos foram lisados adicionando-se 500 μL de Duodecil Sulfonato de Sódio (SDS) a 0,2% em CBS. Foram transferidos 100 μL do lisado para uma placa branca e a fluorescência foi medida em fluorímetro (*760 Microplate Fluorometer Cambridge Technology Inc.*), excitação $\lambda = 482$ nm, emissão $\lambda = 550$ nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.).

3.9 Obtenção de células esplênicas de camundongos C57BL/6 e BALB/c

Cinco camundongos dos grupos controles e 5 infectados (os mesmos utilizados para produção do lavado peritoneal) foram sacrificados em câmara de CO_2 . Os baços foram retirados em condições assépticas e colocados em placas de Petri pequenas, contendo 5 mL de BSS (*Balanced salt solution*), pH 7,2 gelado. A seguir, os baços foram macerados cuidadosamente para liberação das células. As suspensões assim

preparadas foram homogeneizadas várias vezes, utilizando-se seringa de 5 mL, com agulha 25 x 18 mm e, após sedimentação dos grumos, os sobrenadantes foram transferidos para tubos cônicos de poliestireno graduados e foram centrifugados a 358 g (Centrífuga Fanem Excelsa II 206MP). Após centrifugação, as células foram ressuspendidas em meio BSS pH 7,2. Este processo foi repetido, as células foram então ressuspendidas em 5 mL de cloreto de amônio 0,83% e 1 mL de FBS e deixadas em repouso por 5 minutos, a fim de promover a lise das hemácias. Foi então realizada nova centrifugação, e as células foram ressuspendidas em 5 mL de RPMI 1640 suplementado, como descrito para cultura de macrófagos, acrescido de 10% de FBS, para se efetuar a terceira lavagem. Após esta lavagem, as células foram ressuspendidas novamente em RPMI suplementado (1 mL), para proceder a contagem do número de linfócitos viáveis dos baços.

3.10 Viabilidade das células esplênicas de camundongos C57BL/6 e BALB/c

O número de linfócitos viáveis no baço de cada camundongo foi avaliado utilizando-se a técnica de exclusão com Azul de Trypan. Foi preparada uma solução de Azul de Trypan a 0,2% (w/v) em água destilada e uma solução de cloreto de sódio 0,75 M. No dia do uso foram misturadas quatro partes de Azul de Trypan 0,2% com uma parte de salina 0,75 M. A um volume de 90 μ L desta solução, foi adicionado um volume de 10 μ L da suspensão de células esplênicas, previamente diluídas a 1:10 em RPMI 1640 suplementado, resultando uma diluição final de 1:100, que foi utilizada para preencher a câmara de Neubauer e realizar a contagem dos linfócitos viáveis.

*3.11 Cultura de linfócitos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com *Y. enterocolitica**

Conhecendo-se o número de linfócitos viáveis nas respectivas suspensões celulares, foi adicionada quantidade suficiente de RPMI 1640 suplementado para alcançar a diluição ideal de 2×10^6 células/mL. Nesta diluição, os esplenócitos foram cultivados por 24 ou 48 horas, em estufa a 37° C, contendo 95% de umidade e 5% de CO₂ em 1 mL de RPMI 1640 suplementado, em placas de 48 cavidades, na presença de 10 µg de liofilizado/mL de HKY, ou 3 µg/mL de concanavalina A (Con A), ou somente RPMI 1640 suplementado. Ao término do período de incubação de 24 horas para dosagem de IL-4 e de 48 horas para dosagem de IFN- γ , os sobrenadantes das culturas foram coletados para determinação dos níveis das citocinas.

*3.12 Determinação de IFN- γ e IL-4 em linfócitos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com *Y. enterocolitica**

As citocinas (IFN- γ e IL-4) foram dosadas nos sobrenadantes das culturas de linfócitos, utilizando Kits comerciais (R & D System), com sensibilidade de 5 pg/mL.

O método empregado foi o ensaio imunoenzimático de fase sólida – ELISA, utilizando anticorpo de captura, anticorpo de detecção, estreptavidina/peroxidase e tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio (TMB/H₂O₂). As curvas de calibração foram preparadas por meio de diluições seriadas dos padrões reconstituídos de IL-4 e IFN- γ

recombinantes, fornecidos pelo fabricante (diluições de 1000 pg/mL a 15,60 pg/mL para IL-4 e diluições de 2000 pg/mL a 31,21 pg/mL para IFN- γ)

3.13 Análises estatísticas dos dados

Os dados obtidos como resultados dos experimentos foram representados como médias \pm SD (desvio padrão). As comparações entre as duas linhagens de camundongos em cada dia do período de observação da infecção, foram realizadas pelo teste *t Student*. A variação entre os diferentes dias do período de observação, na mesma linhagem de camundongo foi realizada pelo teste *One-way ANOVA*. A comparação entre controle e cada dia do período de observação com o controle foi realizada pelo *t Student*, utilizando o software Microcal Origin 5.0. As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *Variação no peso do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c, infectados com Y. enterocolica, durante o período de observação*

As análises pelo teste ANOVA mostraram que nos camundongos C57BL/6 infectados, houve diferença significativa no peso do baço durante o período de observação, enquanto que nos camundongos BALB/c não (Tabela 1 e Figura 2).

Pelo teste t *Student*, verificamos que houve aumento significativo no peso do baço dos camundongos C57BL/6 e BALB/c, no 3º e 5º dia pós-infecção, porém nos C57BL/6 o aumento foi de 2,02 vezes no 3º dia e de 1,66 vezes no 5º dia, enquanto que, nos BALB/c o aumento foi de 1,18 vezes em ambos os dias (Tabela 1 e Figura 2).

Adicionalmente, nos camundongos C57BL/6 infectados verificamos a presença de abscessos no baço de 100% dos animais; enquanto que nos BALB/c os abscessos estavam presentes no baço de 60% dos animais, no 3º e 5º dia pós-infecção.

Tabela 1 - Peso do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Y. enterocolitica*, em diferentes dias pós-infecção.

	Peso do baço (g)			
	Controle	1º Dia	3º Dia	5º Dia
C57BL/6	0,082 ± 0,017	0,096 ± 0,005	0,166 ± 0,018*	0,136 ± 0,039*
BALB/c	0,122 ± 0,004	0,136 ± 0,033	0,144 ± 0,018*	0,144 ± 0,015*

Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 2 experimentos. * $p < 0,05$ vs. controle durante a cinética da infecção (teste t *Student*). ▪ $p < 0,05$ durante o período de observação (ANOVA).

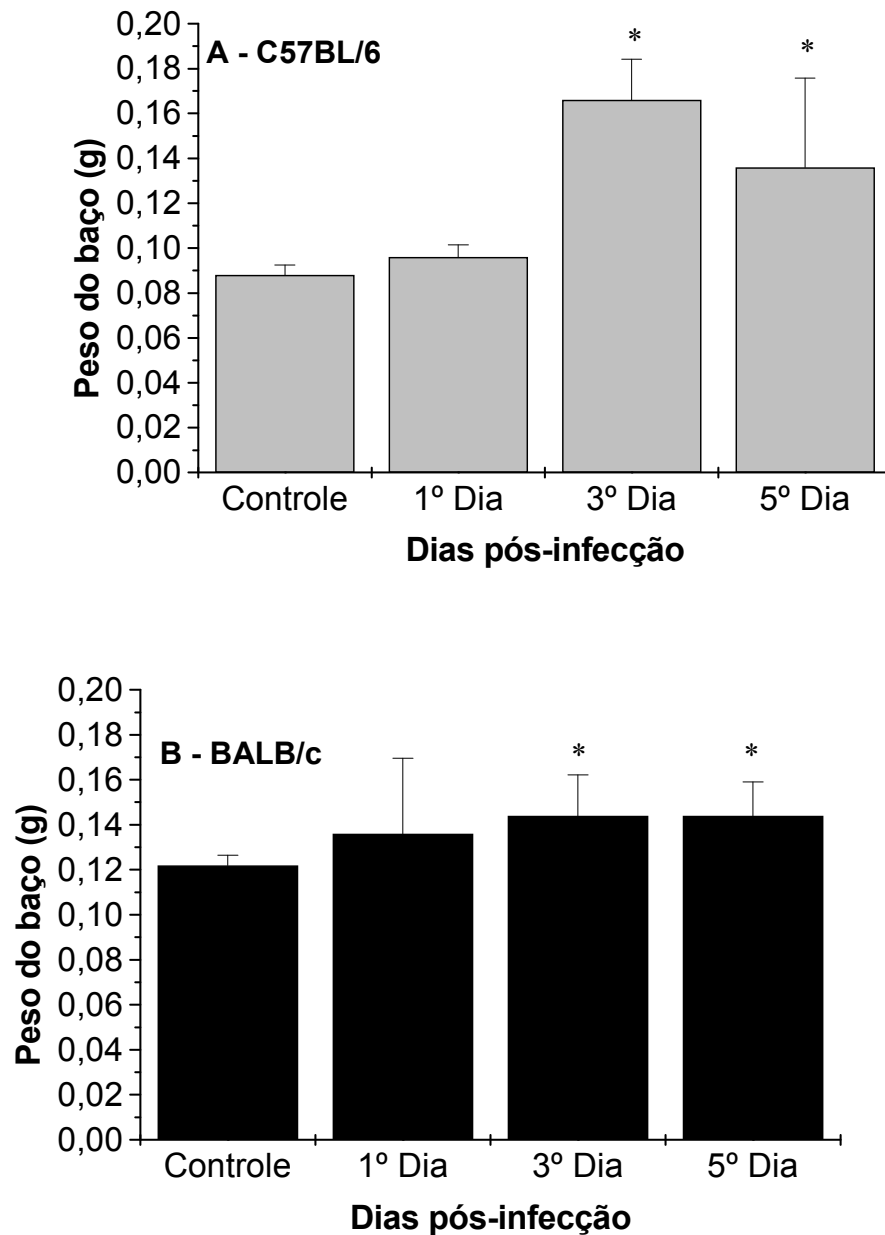


Figura 2 - Peso do baço de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados com *Y. enterocolitica*, em diferentes dias pós-infecção. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 2 experimentos. * $p < 0,05$ vs. controle durante a cinética da infecção (teste t *Student*). $p < 0,05$ durante o período de observação

4.2 Dosagem de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com *Y. enterocolitica*.

Nos camundongos C57BL/6, a infecção por *Y. enterocolitica* levou à diferença significativa na produção de NO pelos macrófagos não reestimulados e reestimulados com LPS ou com HKY (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Student*, foi possível verificar que houve aumento significativo na produção de NO pelos macrófagos não reestimulados, no 1º e 5º dia; nos reestimulados com LPS, no 3º e 5º dia e nos reestimulados com HKY, no 1º e 3º dia pós-infecção. (Figura 3).

Nos camundongos BALB/c, a infecção levou à diferença significativa na produção de NO pelos macrófagos não reestimulados, reestimulados com LPS ou com HKY (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Student*, houve diminuição significativa na produção de NO pelos macrófagos não reestimulados, reestimulados com LPS ou com HKY, no 1º dia pós-infecção. No 3º e 5º dia, houve aumento significativo na produção de NO pelos macrófagos não reestimulados e reestimulados com LPS, enquanto que nos reestimulados com HKY, verificamos aumento significativo apenas no 5º dia (Figura 3).

Macrófagos de camundongos C57BL/6 controles (não infectados), estimulados *in vitro* com LPS ou com HKY, produziram quantidade significativamente maior de NO que os não estimulados. Macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados, reestimulados com LPS ou com HKY, produziram quantidade significativamente maior de NO que os não reestimulados durante o período de observação (1º, 3º e 5º dia pós-infecção) (Tabela2).

Macrófagos de camundongos BALB/c controles estimulados *in vitro* com LPS ou com HKY, produziram quantidade significativamente maior de NO que os não estimulados. Macrófagos de camundongos BALB/c infectados, reestimulados com LPS, produziram quantidade significativamente maior de NO que os não estimulados no 1º, 3º e 5º dia pós-infecção, enquanto que os reestimulados com HKY, produziram quantidade significativamente maior de NO que os não reestimulados no 3º e 5º dia pós-infecção (Tabela2).

Na comparação entre as duas linhagens de animais, os macrófagos de camundongos C57BL/6 controles, estimulados *in vitro* com LPS, HKY ou sem estímulo, produziram quantidade significativamente maior de NO que os macrófagos de camundongos BALB/c durante o período de observação (Tabela 2).

Nos camundongos infectados, a quantidade de NO produzida espontaneamente (sem reestímulo) pelos macrófagos de C57BL/6 foi significativamente maior que a produzida pelas células de BALB/c no 1º, 3º e 5º dia pós-infecção. A quantidade de NO produzida pelos macrófagos de C57BL/6 infectados, reestimulados com LPS ou HKY foi significativamente maior que a produzida pelas células de BALB/c, no 1º e 3º dia pós-infecção (Tabela2).

Tabela 2 - Produção de óxido nítrico por camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Y. enterocolitica*, em diferentes dias pós-infecção.

		Concentração de NO ₂ ⁻ μmol/2,5x 10 ⁶ células			
		Controle	1º Dia	3º Dia	5º Dia
C57BL/6	RPMI	7,60 ± 2,04*	11,92 ± 0,89*	10,23 ± 0,42*	32,93 ± 5,25*
	LPS	50,84 ± 8,80*	65,26 ± 5,57*	76,58 ± 3,29*	72,05 ± 9,65
	HKY	64,78 ± 4,71*	77,80 ± 3,78*	82,83 ± 5,56*	75,92 ± 13,54
BALB/c	RPMI	0	3,42 ± 0,95	5,34 ± 1,09	11,80 ± 2,64
	LPS	10,62 ± 1,91	5,44 ± 1,15	31,86 ± 1,41	71,61 ± 3,72
	HKY	45,98 ± 9,5	3,15 ± 0,82	52,52 ± 1,81	68,51 ± 10,75

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*, HKY: antígeno de *Y. enterocolitica*, RPMI: sem estímulo. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * p < 0,05 vs. BALB/c e p < 0,05 vs. RPMI (teste t *Student*).

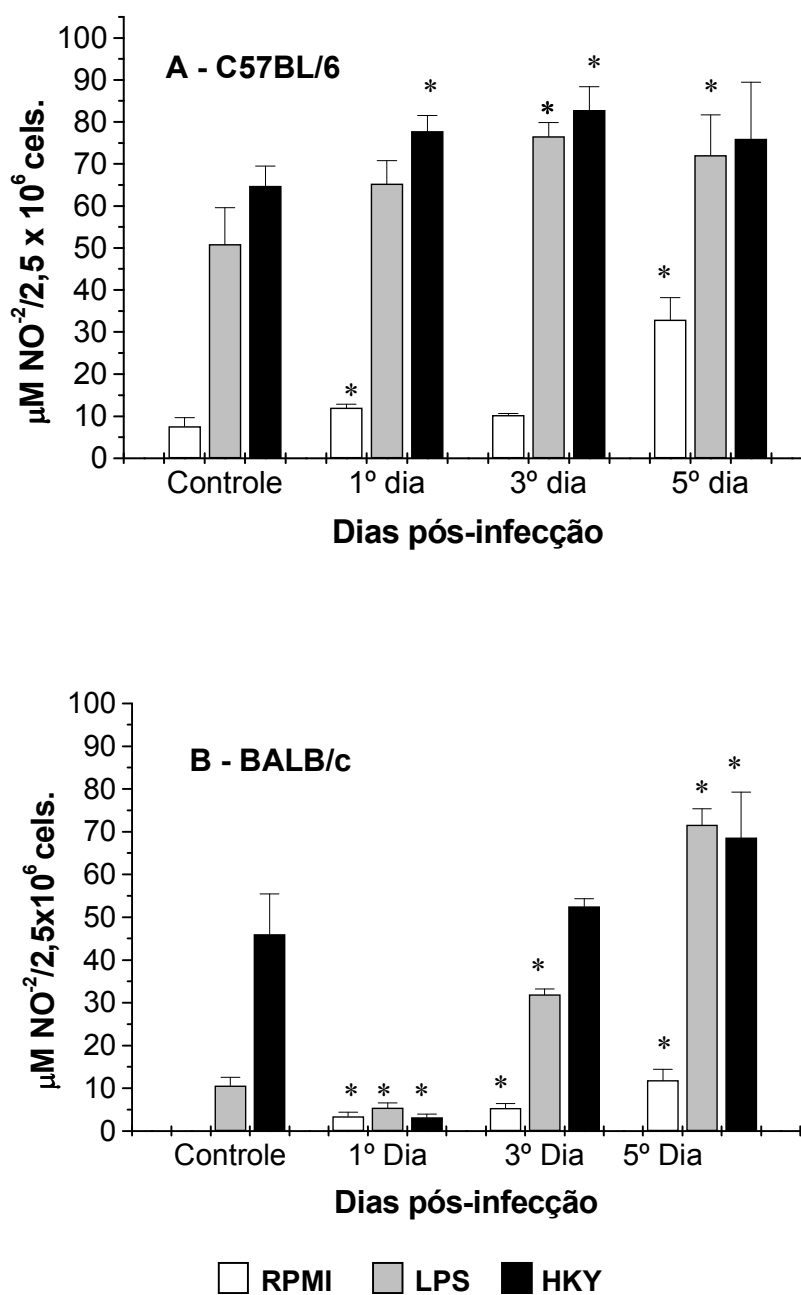


Figura 3 - Produção de NO por camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados com *Y. enterocolitica*, em diferentes dias pós-infecção. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. controle durante a cinética da infecção (teste t *Student*). $p < 0,05$ durante o período de observação (teste ANOVA).

4.3 Análise de citrulina e ornitina em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com *Y. enterocolitica*

4.3.1 Dosagem de citrulina

Em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com *Y. enterocolitica*, não reestimulados, não houve diferença significativa na produção de citrulina, enquanto que, nos reestimulados com LPS ou com HKY, houve diferença significativa durante o período de observação (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Student*, verificamos que houve aumento significativo na produção citrulina pelos macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados, reestimulados com LPS ou com HKY no 1º e 5º dia pós-infecção, enquanto que, nos macrófagos não reestimulados observamos aumento significativo na produção de citrulina apenas no 3º dia (Figura 4).

Não houve diferença significativa na produção de citrulina pelos macrófagos não reestimulados, de camundongos BALB/c infectados, tanto na análise pelo teste ANOVA quanto pelo teste t *Student*, durante o período de observação. Quanto aos macrófagos de camundongos BALB/c infectados, reestimulados com LPS e com HKY, houve diferença significativa na produção de citrulina (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Student*, nos macrófagos de camundongos BALB/c infectados não reestimulados, não houve diferença significativa na produção de citrulina e houve diminuição na produção pelos macrófagos reestimulados com LPS ou com HKY, no 1º dia pós-infecção. No 3º dia, houve aumento significativo na produção de citrulina pelos macrófagos reestimulados com HKY e no 5º dia, pelos macrófagos reestimulados com LPS (Figura 4).

Macrófagos de camundongos C57BL/6 controles e infectados no 1º e 5º dia pós-infecção, produziram quantidade de citrulina significativamente maior quando estimulados *in vitro* com LPS ou com HKY comparado com os não estimulados (Tabela 3).

Macrófagos de camundongos BALB/c controles e infectados no 3º e 5º dia pós-infecção, produziram quantidade de citrulina significativamente maior quando estimulados *in vitro* com LPS ou com HKY, comparado com os não estimulados (Tabela 3).

Não houve diferença significativa na produção de citrulina pelos macrófagos de camundongos controles C57BL/6 e BALB/c, estimulados *in vitro* com LPS, HKY ou não estimulados.

Nos camundongos infectados, não houve diferença significativa na quantidade de citrulina produzida espontaneamente (sem reestímulo) pelos macrófagos de C57BL/6 e de BALB/c no 1º e 5º dia pós-infecção, porém no 3º dia a quantidade de citrulina produzida pelas células de C57BL/6 foi significativamente maior. Nos macrófagos de C57BL/6, reestimulados com HKY ou com LPS a quantidade de citrulina produzida foi significativamente maior do que a produzida pelas células de BALB/c no 1º dia pós-infecção (Tabela 3).

Tabela 3 - Produção de citrulina por macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Y. enterocolitica* em diferentes dias pós-infecção.

		Concentração de Citrulina (nM/mL)			
		Controle	1º Dia	3º Dia	5º Dia
C57BL/6	RPMI	317,8 ± 26,5	332,3 ± 10,0	431,8 ± 48,9*	379,9 ± 48,8
	LPS	391,7 ± 25,2	685,4 ± 94,9*	354,8 ± 77,3	501,6 ± 77,5
	HKY	435,7 ± 29,9	690,8 ± 13,0*	460,6 ± 98,7	625,4 ± 71,8
BALB/c	RPMI	321,4 ± 33,6	318,8 ± 38,9	300,0 ± 55,5	304 ± 26,89
	LPS	382,8 ± 25,9	270,2 ± 29,3	518,6 ± 94,7	627,2 ± 57,6
	HKY	463,5 ± 20,5	295,3 ± 58,6	572,0 ± 25,5	465,33 ± 43,01

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*, HKY: antígeno de *Y. enterocolitica*, RPMI: sem estímulo. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. BALB/c e $p < 0,05$ vs. RPMI (teste t *Student*).

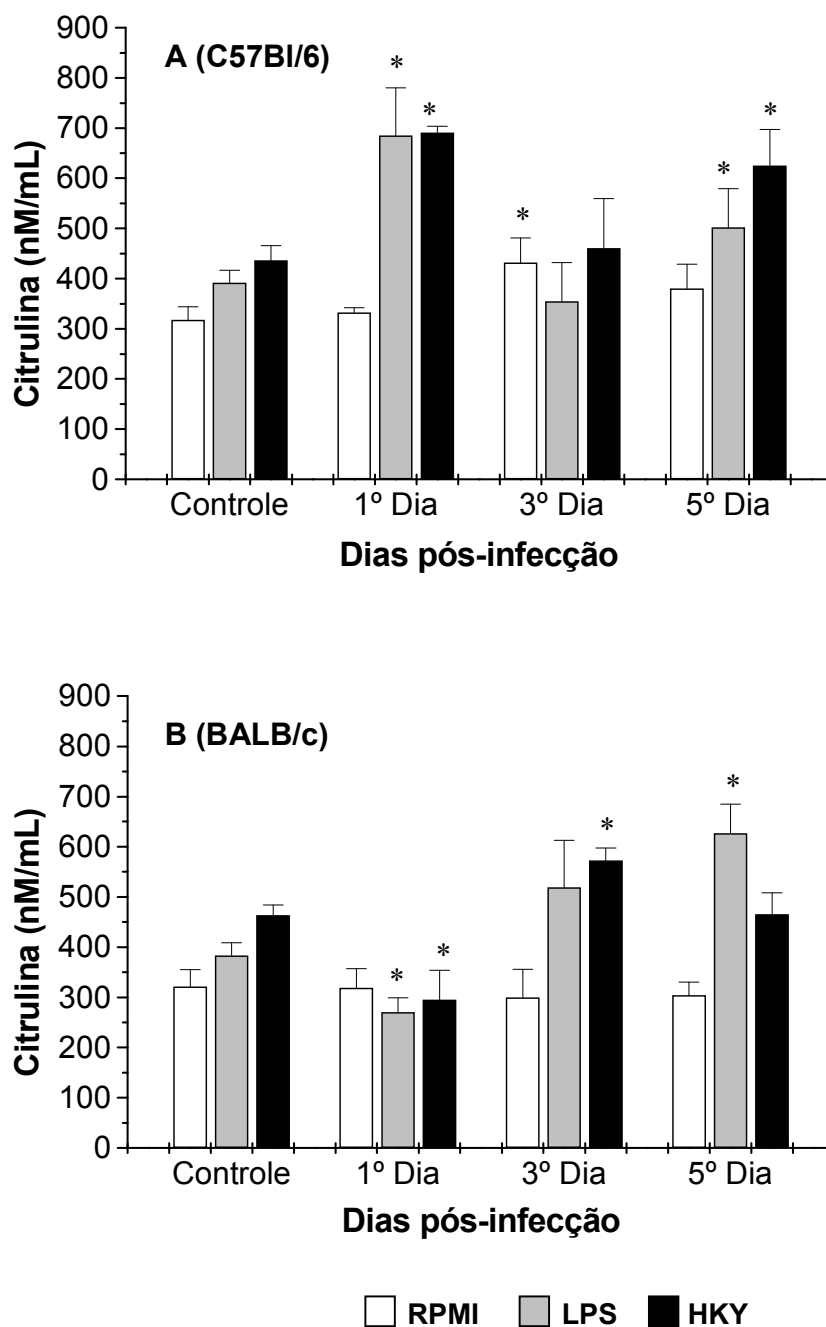


Figura 4 – Produção de citrulina por macrófagos de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados com *Y. enterocolitica* em diferentes dias pós-infecção. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. controle durante a cinética da infecção (teste *t Student*). $p < 0,05$ durante o período de observação (teste ANOVA).

4.3.2 Dosagem de ornitina

Nos camundongos C57BL/6, durante o período de observação da infecção por *Y. enterocolitica*, houve diferença significativa na produção de ornitina pelos macrófagos não reestimulados e reestimulados com HKY ou LPS (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Student*, houve diminuição significativa na produção de ornitina pelos macrófagos de camundongos C57BL/6 reestimulados com HKY no 1º e 3º dia, enquanto que, nos reestimulados com LPS houve diminuição no 3º dia pós-infecção (Figura 5).

Nos macrófagos de camundongos BALB/c, durante o período de observação da infecção por *Y. enterocolitica*, houve diferença significativa na produção de ornitina pelos macrófagos não reestimulados, reestimulados com HKY e não houve diferença significativa na produção pelos macrófagos reestimulados com LPS (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Student*, houve aumento significativo na produção de ornitina apenas com o reestímulo HKY, no 1º dia e houve diminuição na produção pelos macrófagos não reestimulados, no 3º e 5º dia pós-infecção (Figura 5).

Não houve diferença significativa na produção de ornitina pelos macrófagos de camundongos C57BL/6 controles e infectados, estimulados *in vitro* com LPS ou com HKY, comparado com os não estimulados. Macrófagos de camundongos BALB/c infectados, no 5º dia pós-infecção, produziram quantidade significativamente maior de ornitina, reestimulados com LPS ou com HKY, comparado com os não reestimulados (Tabela 4).

Não houve diferença significativa na produção de ornitina pelos macrófagos estimulados *in vitro* ou não, quando comparamos as duas linhagens de animais controles (Tabela 4).

Nos animais infectados, os macrófagos de camundongos BALB/c não reestimulados produziram quantidade de ornitina significativamente maior que os macrófagos de C57BL/6, no 1º dia pós-infecção. Quando os macrófagos foram estimulados *in vitro* com LPS ou HKY, os de camundongos BALB/c produziram quantidade significativamente maior de ornitina que os de C57BL/6, no 1º e 3º dia pós-infecção (Tabela 4).

Tabela 4 - Produção de ornitina por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6, em diferentes dias pós-infecção.

		Concentração de Ornitina (nM/mL)			
		Controle	1º Dia	3º Dia	5º Dia
C57BL/6	RPMI	1450,8 ± 291,4	999,0 ± 115,9*	767,3 ± 57,6*	1758,7 ± 154,2
	LPS	1354,0 ± 236,4	1268,3 ± 121,1*	883,0 ± 57,5*	1516,0 ± 52,0
	HKY	1553,3 ± 83,7	1188,0 ± 141,2*	871,0 ± 77,8*	1391,0 ± 293,4
BALB/c	RPMI	1539,1 ± 96,9	1484,7 ± 206,3	1097,3 ± 91,3	830,0 ± 127,3
	LPS	1419,3 ± 226,6	1678,3 ± 33,5	1288,0 ± 158,2	1578,3 ± 170,5
	HKY	1332,0 ± 230,1	1745,5 ± 55,3*	1047,2 ± 49,5	1480,7 ± 118,7

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*, HKY: antígeno de *Y. enterocolitica*, RPMI: sem estímulo. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. BALB/c. ■ $p < 0,05$ vs. RPMI (teste t *Student*).

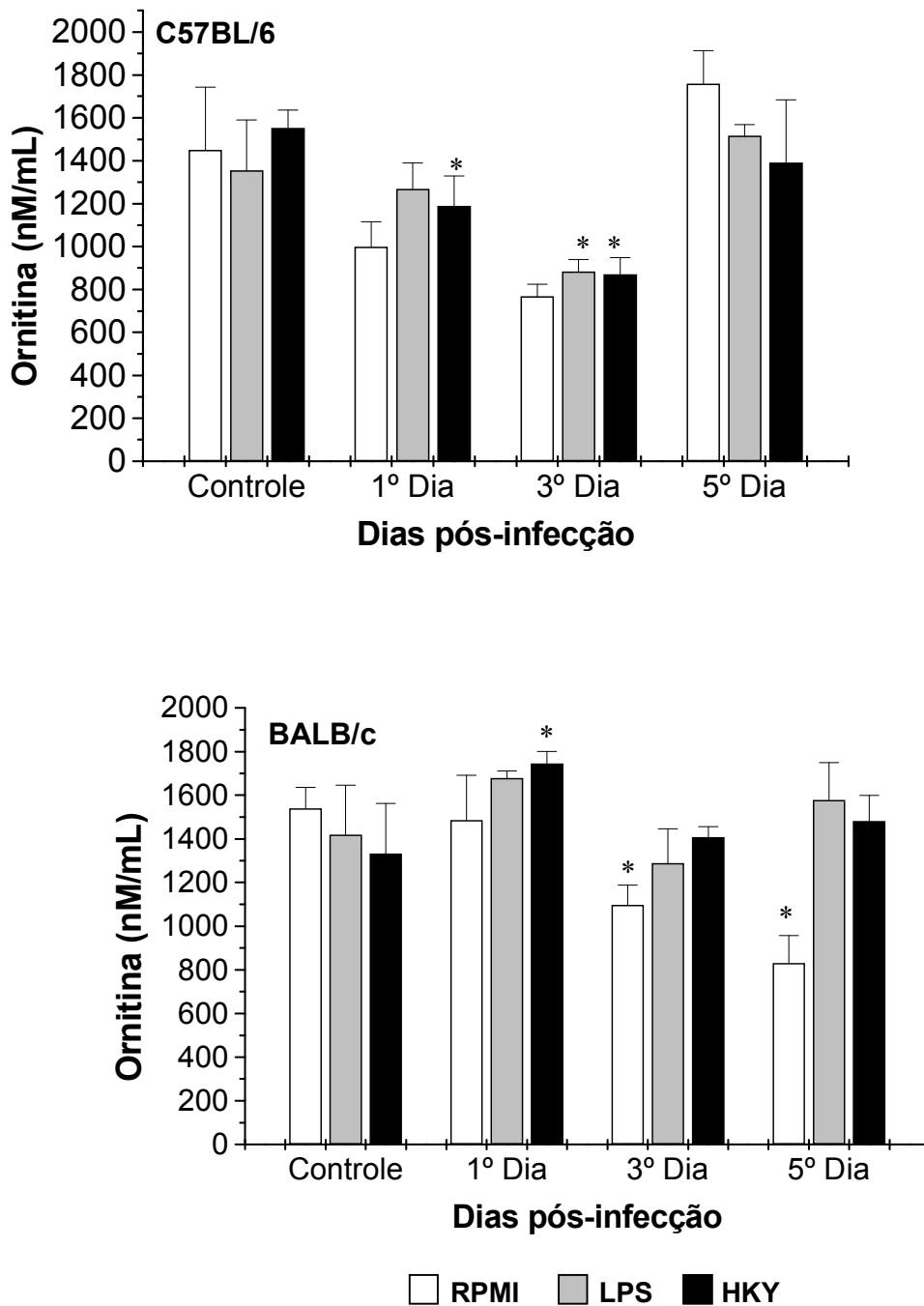


Figura 5 - Produção de ornitina por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6, em diferentes dias pós-infecção. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. controle durante a cinética da infecção (teste *t Student*). $p < 0,05$ durante o período de observação (teste ANOVA).

4.4 Determinação de TGF- β 1 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com *Y. enterocolitica*

Macrófagos de camundongos C57BL/6 controles e infectados com *Y. enterocolitica* não produziram TGF- β 1 em quantidade detectável (Tabela 5).

Nos camundongos BALB/c a infecção por *Y. enterocolitica* levou à diferença significativa na produção de TGF- β 1 pelos macrófagos reestimulados com HKY, com LPS ou sem reestímulo (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Student*, a infecção por *Y. enterocolitica* causou aumento significativo na produção de TGF- β 1 no 1º, 3º e 5º dia, pelos macrófagos de camundongos BALB/c não reestimulados e reestimulados com LPS ou com HKY (Figura 6).

Macrófagos de camundongos BALB/c controles estimulados *in vitro* com LPS ou com HKY, produziram quantidade de TGF- β 1 significativamente maior que a dos macrófagos não estimulados. Macrófagos de camundongos BALB/c infectados, reestimulados com LPS, produziram quantidade de TGF- β 1 significativamente maior que a dos macrófagos não reestimulados, no 3º dia pós-infecção (Tabela 5).

Tabela 5 - Produção de TGF- β 1 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. enterocolitica*, em diferentes dias pós-infecção.

		Concentração de TGF- β 1 (pg/mL)			
		Controle	1º Dia	3º Dia	5º Dia
C57BL/6	RPMI	0	0	0	0
	LPS	0	0	0	0
	HKY	0	0	0	0
BALB/c	RPMI	0	1.331 \pm 185*	1.895 \pm 188*	1.553 \pm 206*
	LPS	346 \pm 90,4*	1.534 \pm 116*	1.524 \pm 75*	1.762 \pm 20*
	HKY	160 \pm 47,9*	1.331 \pm 125*	1.879 \pm 269*	1.818 \pm 201*

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*, HKY: antígeno de *Y. enterocolitica*, RPMI: sem estímulo. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. BALB/c. ■ $p < 0,05$ vs. RPMI (teste t *Student*).

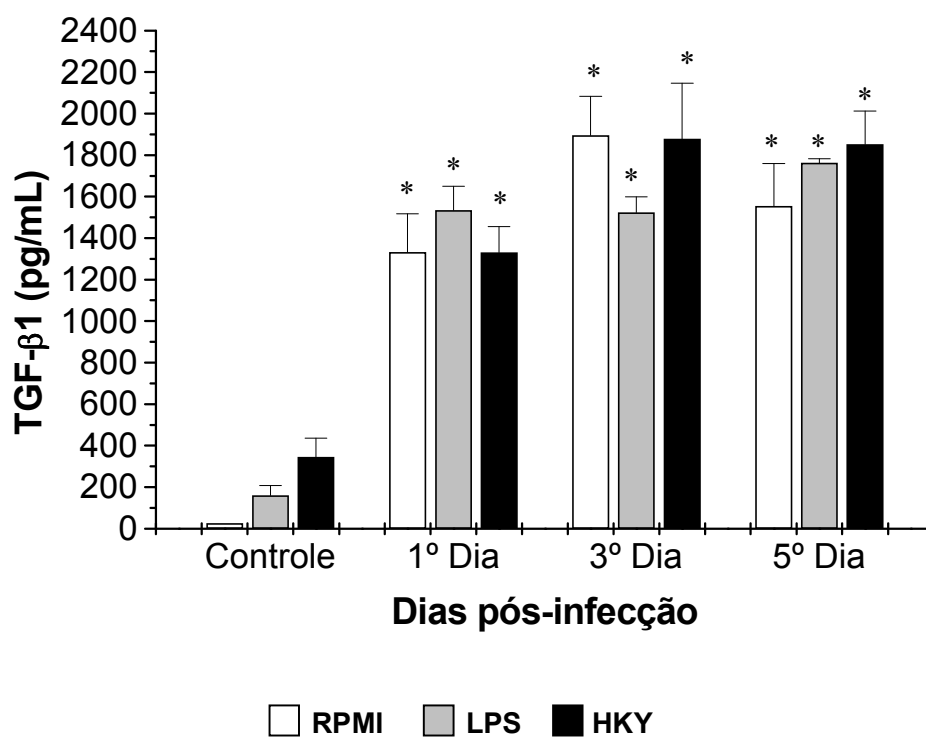


Figura 6 – Produção de TGF-β1 por macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *Y. enterocolitica*, em diferentes dias pós-infecção. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. controle durante a cinética da infecção (teste *t Student*). $p < 0,05$ durante o período de observação (teste ANOVA).

45 Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com Y. enterocolitica

A infecção por *Y. enterocolitica* levou à diferença significativa na atividade fagocítica, tanto dos macrófagos de camundongos C57BL/6 quanto dos macrófagos de camundongos BALB/c (teste ANOVA) (Tabela 6 e Figura 7). Na análise pelo teste *t Student*, a infecção por *Y. enterocolitica* levou ao aumento significativo na atividade fagocítica no 1º, 3º e 5º dia, tanto dos macrófagos de camundongos C57BL/6, quanto dos macrófagos de camundongos BALB/c (Tabela 6 e Figura 7).

Macrófagos de camundongos C57BL/6 apresentaram atividade fagocítica significativamente maior que a dos macrófagos de camundongos BALB/c controles ou infectados com *Y. enterocolitica* no 3º e 5º dia pós-infecção (Tabela 6).

Tabela 6 – Atividade fagocítica de macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Y. enterocolitica*, em diferentes dias pós-infecção.

	Unidades Arbitrárias (U. A.) de Fluorescência			
	Controle	1º Dia	3º Dia	5º Dia
C57BL/6	4.314,3 ± 283,5*	9.171,8 ± 1357,1*	71.959,2 ± 6946,5*	88.620,9 ± 5429,9*
BALB/c	1.738,5 ± 227,5	5.410,2 ± 936,3	42.524,0 ± 740,4	73.873,5 ± 9163,8

* $p < 0,05$ vs. BALB/c (teste *t Student*). Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 2 experimentos.

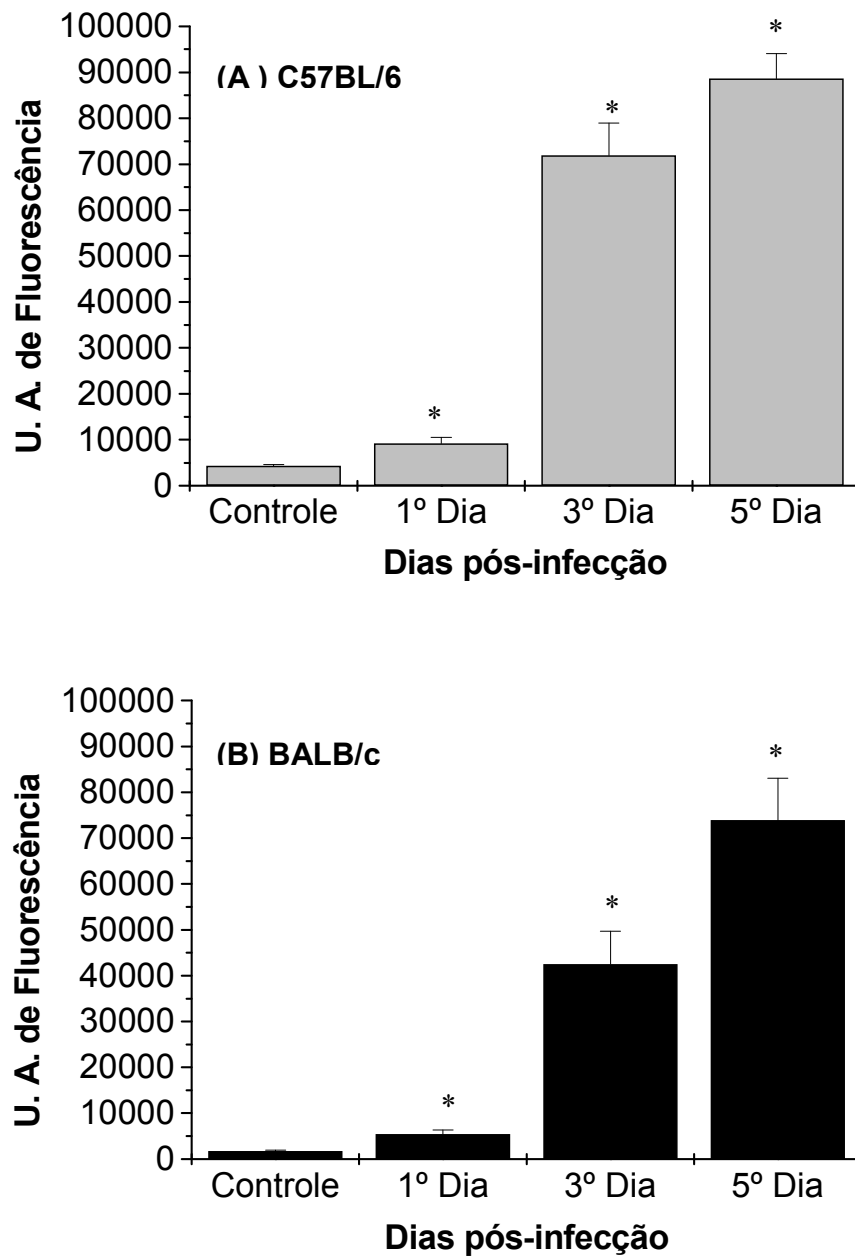


Figura 7 – Atividade fagocítica de macrófagos de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados com *Y. enterocolitica*, em diferentes dias pós-infecção. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 2 experimentos. * $p < 0,05$ vs. controle durante o período de observação (teste t *Student*). $p < 0,05$ durante o período de observação (teste ANOVA).

4.6 Determinação de IL-4 em linfócitos do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com *Y. enterocolitica*

Linfócitos de camundongos C57BL/6 controles e infectados com *Y. enterocolitica* não produziram IL-4 em quantidade detectável, durante o período de observação. Linfócitos de camundongos BALB/c produziram pequena quantidade de IL-4 e somente no 5º dia pós-infecção (Tabela 7).

Tabela 7 - Produção de IL-4 por linfócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. enterocolitica* em diferentes dias pós-infecção.

		Concentração de IL-4 (pg/mL)			
		Controle	1º Dia	3º Dia	5º Dia
C57BL/6	Con A	0	0	0	0
	HKY	0	0	0	0
	RPMI	0	0	0	0
BALB/c	Con A	0	0	0	17,8 ± 3,3*
	HKY	0	0	0	8,7 ± 0,9*
	RPMI	0	0	0	5,0 ± 0,3*

Con A: concanavalina, HKY: antígeno de *Y. enterocolitica*, RPMI: sem estímulo. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. C57BL/6 e $p < 0,05$ vs. RPMI (teste *tStudent*). A sensibilidade do teste era de 5 pg/mL.

4.7. Determinação de IFN- γ em linfócitos do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados ou não com *Y. enterocolitica*

Nos camundongos C57BL/6, a infecção por *Y. enterocolitica* levou à diferença significativa na produção de IFN- γ , pelos linfócitos não reestimulados e reestimulados com Con A ou HKY, durante o período de observação (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Sudent*, houve aumento significativo na produção de IFN- γ , pelos linfócitos não reestimulados, no 3º e 5º dia pós-infecção. Nos macrófagos reestimulados com Con A, foi observado aumento na produção no 1º, 3º e 5º dia pós-infecção, enquanto que, quando reestimulados com HKY, verificamos aumento no 3º e 5º dia (Figura 8).

Linfócitos de camundongos C57BL/6 controles e infectados, estimulados *in vitro* com Con A ou com HKY, produziram quantidade significativamente maior de IFN- γ , que os não estimulados, em todos os dias do período de observação. Linfócitos de camundongos C57BL/6 produziram quantidade significativamente maior de IFN- γ comparado com os linfócitos de BALB/c, no 1º, 3º e 5º dia pós-infecção (Tabela 8).

Linfócitos de camundongos BALB/c controles e infectados com *Y. enterocolitica*, não estimulados *in vitro*, não produziram IFN- γ em quantidade detectável; os estimulados *in vitro* com Con A produziram IFN- γ no 1º, 3º e 5º dia pós-infecção e os estimulados *in vitro* com HKY fizeram-no apenas no 5º dia (Tabela 8). Durante o período de observação da infecção, houve diferença significativa na produção de IFN- γ pelos linfócitos de camundongos BALB/c reestimulados com Con A (teste ANOVA). Na análise pelo teste t *Student*, houve aumento significativo na produção de IFN- γ pelos linfócitos reestimulados com Con A, no 1º, 3º e 5º dia pós-infecção (Figura 8).

Linfócitos de camundongos BALB/c controles e infectados estimulados *in vitro* com Con A, produziram quantidade significativamente maior de IFN- γ que os não estimulados no 1º, 3º e 5º dia pós-infecção. As células estimuladas *in vitro* com HKY produziram maior quantidade de IFN- γ que as células não estimuladas, apenas no 5º dia pós-infecção (Tabela 8).

Tabela 8 - Produção de IFN- γ por linfócitos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados por *Y. enterocolitica* em diferentes dias pós-infecção.

		Concentração de IFN- γ (pg/mL)			
		Controle	1º Dia	3º Dia	5º Dia
C57BL/6	Con A	944 \pm 131,5*	2.480 \pm 276,7*	2.139 \pm 506,6*	2.431 \pm 107,3*
	HKY	394 \pm 67,3*	450 \pm 154,5*	1.394 \pm 191,2*	1.547 \pm 433,9*
	RPMI	0	0	315 \pm 42,3*	259 \pm 13,1*
BALB/c	Con A	67 \pm 3,2	303 \pm 94,9	363 \pm 72,9	726 \pm 46,1
	HKY	0	0	0	259 \pm 8,4
	RPMI	0	0	0	0

Con A: concanavalina, HKY: antígeno de *Y. enterocolitica*, RPMI: sem estímulo. Os resultados correspondem à média dos valores de cinco camundongos em cada grupo. Resultados reproduzidos em 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. C57BL/6 e $p < 0,05$ vs. RPMI (teste *tStudent*). A sensibilidade do teste era de 5 pg/mL.

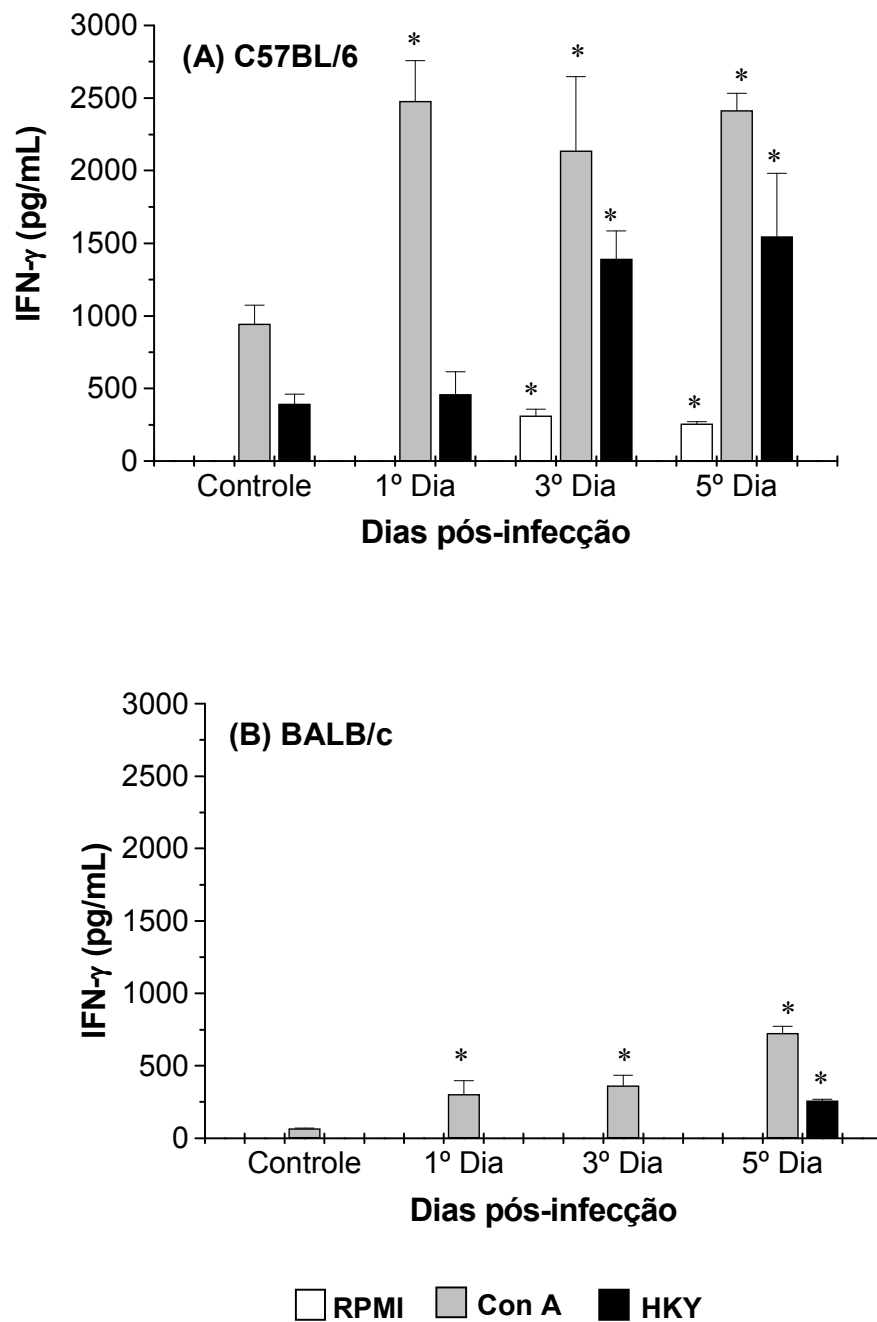


Figura 8 - Produção de IFN- γ por linfócitos de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) infectados por *Y. enterocolitica* em diferentes dias pós-infecção. * $p < 0,05$ vs. controle durante o período de observação (teste t *Student*). $p < 0,05$ durante o período de observação (teste ANOVA). A sensibilidade do teste era de 5 pg/mL.

5. DISCUSSÃO

Para verificar a influência da infecção por *Y. enterocolitica* na modulação de macrófagos M1 e M2, nós utilizamos o modelo animal de infecção intravenosa (i.v.) em camundongos resistentes (C57BL/6) e suscetíveis (BALB/c).

A aplicação i.v. de *Y. enterocolitica* O:8 WA 2707, portadora do plasmídeo de virulência (pYV), em camundongos C57BL/6 (2×10^4 células/mL) e BALB/c (5×10^2 células/mL), causou infecção sistêmica em poucos dias. No modelo murino de infecção por *Y. enterocolitica* tanto a via oral quanto a via i.v. de administração da bactéria podem ser usadas para estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese e na resposta imune (HANDLY et al. 1994). Embora a via oral seja usualmente a rota natural de infecção por *Y. enterocolitica*, a via i.v. de administração da bactéria foi escolhida por ser um modelo experimental bastante utilizado em nosso laboratório e em outros, com resultados que se correlacionam à doença em humanos, particularmente nas infecções sistêmicas em imunocomprometidos. As concentrações bacterianas utilizadas nos inóculos foram as DL_{50} parenterais determinadas por Auntenrieth et al. (1993a), para as linhagens C57BL/6 (resistente) e BALB/c (suscetível).

Os macrófagos podem ser ativados classicamente (para a defesa) ou alternativamente (para o reparo tecidual). A principal via inflamatória efetora dos macrófagos é mediada pelo NO, molécula antimicrobiana crucial, gerada pela iNOS usando arginina como substrato (MACMICKING et al., 1997). A via alternativa do metabolismo da arginina é catalizada pela arginase, que converte arginina em uréia e

ornitina, a qual pode promover a replicação celular/cicatrização, por ser um precursor das poliaminas e do colágeno (WILLIAMS-ASHMAN e CANELLAKIS, 1979).

A via utilizada pelos macrófagos no metabolismo da arginina pode alterar a resposta inflamatória de diferentes maneiras. Macrófagos de camundongos de linhagens resistentes (com perfil Th1) e de linhagens suscetíveis (com perfil Th2) podem ativar, de formas opostas, o metabolismo da arginina em resposta ao mesmo estímulo (MILLS et al., 2000).

Nos primeiros 5 dias da infecção por *Y. enterocolitica*, nos macrófagos de camundongos C57BL/6 não reestimulados, houve aumento na produção de NO, os níveis de citrulina permaneceram elevados ou aumentaram e os níveis de ornitina aumentaram apenas no 5º dia. Nos macrófagos reestimulados com LPS ou HKY, houve aumento nos níveis de NO, os níveis de citrulina permaneceram elevados ou aumentaram e os níveis de ornitina se mantiveram ou diminuíram.

Nos macrófagos de camundongos BALB/c não reestimulados, houve aumento na produção de NO durante o período de observação, porém os níveis foram inferiores aos observados para os macrófagos de C57BL/6; os níveis de citrulina não alteraram, porém foram inferiores aos observados para C57BL/6 e os níveis de ornitina diminuíram no 3º e 5º dia pós-infecção. Nos macrófagos estimulados com LPS ou HKY, houve diminuição na quantidade de NO/citrulina produzida e os níveis ornitina se mantiveram elevados ou aumentaram.

Nossos resultados para NO/citrulina e ornitina são semelhantes aos relatados por Mills et al (2000), em estudo com animais não infectados, onde verificaram que

macrófagos de camundongos BALB/c aumentaram a produção de ornitina quando estimulados com LPS e/ou IFN- γ , enquanto que macrófagos de C57BL/6 diminuíram a produção de ornitina em resposta ao LPS.

NO estudo de Pujol e Bliska (2005), os níveis de NO produzidos por macrófagos infectados por *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* foram mais baixos do que os de células infectadas por *Y. enterocolitica*, sugerindo que *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são capazes de interferir na ativação de macrófagos e produção de NO. Em nosso estudo, os resultados mostraram que a infecção por *Y. enterocolitica* pode interferir na produção de NO pelos macrófagos de diferentes maneiras. Em camundongos BALB/c esta infecção leva a uma supressão da produção de NO, enquanto que em camundongos C57BL/6 leva a uma ativação.

Quanto às vias utilizadas no metabolismo da arginina, verificamos também que em camundongos não infectados (controles) não houve diferença significativa na produção de citrulina e ornitina quando macrófagos de camundongos C57BL/6 e de BALB/c foram comparados. Entretanto, a quantidade de NO produzida pelos macrófagos de C57BL/6 controles estimulados *in vitro* com LPS, HKY ou não estimulados, foi maior do que a produzida pelos macrófagos de BALB/c. Esses resultados são concordantes com relatos de vários estudos demonstrando que macrófagos de camundongos de linhagens com perfil Th1 são mais facilmente ativados para produção de NO do que os macrófagos de linhagens com perfil Th2 (DILEEPAN et al., 1995; LIEW et al., 1991; STENGER et al., 1994).

No 1º dia pós-infecção os macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados, não reestimulados e reestimulados com LPS ou HKY, produziram maior ou igual

quantidade de NO/citrulina e menor quantidade de ornitina comparada com os macrófagos de BALB/c. Adicionalmente, no 3º dia pós-infecção, os macrófagos de C57BL/6 produziram maior quantidade de NO e menor quantidade de ornitina comparada com os de BALB/c. No 5º dia pós-infecção não houve diferença significativa nas quantidades de NO/citrulina e ornitina produzidas pelos macrófagos dos camundongos das duas linhagens.

Heterogeneidade e plasticidade são características típicas de células da série monócitos/macrófagos. Em resposta a citocinas e a produtos microbianos, os fagócitos mononucleares expressam funções especializadas e polarizadas (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2004). Baseados na nomenclatura Th1 e Th2 muitos autores se referem aos macrófagos polarizados como células M1 (classicamente ativados) e M2 (alternativamente ativados).

Há muita controvérsia a respeito de quando os macrófagos M1 e M2 surgem durante a diferenciação e de até em que grau estas células podem trocar de fenótipos (GORDON, 2003; STOUT e STUTTLES, 2004), porém estudos recentes com enfoques genéticos começaram a esclarecer os mecanismos que fundamentam a polarização de macrófagos (RAUH et al., 2005). Sly et al. (2004) demonstraram que SHIP (*Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase*), um potente regulador negativo da via PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) em células hematopoiéticas, reprime citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS e a produção de NO por macrófagos derivados de medula óssea *in vitro*. Rauh et al. (2005) mostraram que macrófagos peritoneais (PMØs) e macrófagos alveolares (AMØs) de camundongos SHIP^{-/-} são M2-programados, enquanto que as mesmas células de camundongos SHIP^{+/+} são M1-

programados, sugerindo que SHIP atua como um importante regulador negativo na indução do fenótipo M2.

Em nosso estudo, utilizando camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados por *Y. enterocolitica*, verificamos que na fase recente (1º e 3º dia pós-infecção), os macrófagos de C57BL/6 (M1) fizeram principalmente a via iNOS, produzindo elevada quantidade de NO e pouca ornitina; enquanto que os macrófagos de BALB/c fizeram preferencialmente a via arginase, produzindo pouco NO e elevada quantidade de ornitina. Esta resposta era esperada, uma vez que a ativação dos macrófagos para a via iNOS, com produção de NO, é importante para controle desta infecção (AUTENRIETH et al., 1994 e de BOHN e al., 1994). Mills et al. (2000) haviam demonstrado anteriormente que os macrófagos de C57BL/6 (M1) fazem principalmente a via iNOS, enquanto que os macrófagos de BALB/c fazem preferencialmente a via arginase, porém trabalhando com macrófagos de animais não infectados.

Diante desses resultados podemos concluir que a infecção por *Y. enterocolitica* estimula nos primeiros dias (1º e 3º dia pós-infecção) preferencialmente a modulação de macrófagos M1 nos camundongos C57BL/6 e a modulação de macrófagos M2 nos camundongos BALB/c.

Adicionalmente, os macrófagos de C57BL/6 aumentaram a produção de NO/citrulina em relação aos animais controles a partir do 1º dia após a infecção por *Y. enterocolitica*, enquanto que nos macrófagos de BALB/c o aumento foi observado apenas no 5º dia. Esses resultados estão de acordo com relatos de Dileepan et al. (1995), nos quais macrófagos de C57BL/6 respondem mais rapidamente na ativação da

via iNOS do que os macrófagos de BALB/c. A resposta inflamatória inicial para erradicação de microrganismos invasores, de células tumorais e para a promoção de respostas do tipo Th1 ocorre por meio dos macrófagos classicamente ativados (M1), enquanto que a fase de resolução para remoção de restos celulares, angiogênese, remodelamento de tecidos, cicatrização de feridas e para a promoção de respostas tipo Th2 ocorre por meio de macrófagos alternativamente ativados (M2), (GORDON, 2003; MOSSER, 2003). Nossos resultados mostram que a população predominante de macrófagos (M1 ou M2) nos primeiros dias da infecção (do 1º ao 3º dia) parece ser importante na determinação da suscetibilidade ou resistência à *Y. enterocolitica*.

Como no 5º dia pós-infecção, as quantidades de NO/citrulina produzidas pelos macrófagos de ambas as linhagens foram semelhantes, demonstrando que aparentemente estavam utilizando uma mesma via no metabolismo da arginina (via iNOS); concluímos que nos camundongos BALB/c, a infecção por *Y. enterocolitica*, também pode levar à modulação de macrófagos M1, porém mais tardiamente que nos C57BL/6. Podemos especular se a partir do 5º dia após a infecção por *Y. enterocolitica* a modulação de macrófagos M1 e M2 ocorreria de forma semelhante nas duas linhagens e até quando esse perfil M1 ou M2 se mantém, utilizando um período de observação mais longo. Em testes preliminares ao experimento, observamos que no 7º e 10º dia pós-infecção os perfis foram semelhantes ao do 5º dia (dados não mostrados).

Conforme relatado anteriormente, macrófagos M1e M2 de camundongos infectados com *Y. enterocolitica* são propensos a ativar a via iNOS e via arginase, respectivamente. Para verificar a base molecular dessa diferença, medimos a produção de TGF- β 1 pelos macrófagos M1 e M2. Em nosso estudo, macrófagos de camundongos

C57BL/6 (M1) controles e infectados com *Y. enterocolitica* não produziram TGF- β 1, enquanto que os de BALB/c (M2) produziram quantidade elevada desta citocina. Em estudo utilizando animais não infectados, Mills et al. (2000) relataram que os macrófagos M1 apresentaram uma resposta caracterizada pela produção predominante de NO em resposta ao LPS ou IFN- λ exógeno, enquanto que macrófagos M2 produziram preferencialmente TGF- β 1.

Quanto à produção de TGF- β 1, nos macrófagos de camundongos BALB/c a infecção por *Y. enterocolitica* causou, já no 1º dia, um aumento de 8,32 vezes (LPS) e 4,43 vezes (HKY) na quantidade de TGF- β 1 produzida em relação à produção por macrófagos de animais controles. No 3º e 5º dia pós-infecção, os níveis de TGF- β 1 produzidos por macrófagos de camundongos BALB/c mantiveram-se elevados. TGF- β é uma citocina multifuncional envolvida na regulação das respostas inflamatórias (LETTERIO e ROBERTS, 1998). Há observações de que a administração de altas concentrações de TGF- β 1 recombinante limita a proteção em camundongos infectados com *Y. enterocolitica* (AUTENRIETH et al., 1996). O mais importante efeito do TGF β em macrófagos é sua capacidade de limitar a produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio pelas células ativadas por LPS ou IFN- γ (BOGDAN & NATHAN, 1993).

O aumento observado na produção de TGF- β 1 pelos macrófagos de camundongos BALB/c no 1º dia pós-infecção, está coerente com a diminuição da produção de NO/citrulina acima relatada, para a mesma linhagem neste dia. A falta de produção, isto é, a não detecção do TGF- β 1 produzido pelos macrófagos de C57BL/6 está coerente com a elevação e manutenção de níveis elevados de NO observados

durante o período de observação da infecção. TGF- β 1 regula negativamente a via iNOS e regula positivamente a via arginase (VOLDOVOTZ et al., 1993; BOUTARD et al., 1995). TGF β regula iNOS em nível transcricional e pós-transcricional, resultando em regulação negativa dos níveis de RNAm e supressão da expressão e da atividade desta enzima (LETTERIO e ROBERTS, 1998). Por outro lado, NO inibe a produção de TGF- β 1 (DIEFENBACH et al., 1998). Há uma correlação inversa entre a produção de NO e de TGF- β 1, assim as respostas M1 e M2 ocorrem em parte devido à regulação autócrina dos macrófagos (MILLS et al., 2000).

A fagocitose é importante no controle de infecções por *Y. enterocolitica*. (HANSKI et al., 1991; AUTENRIETH et al., 1996). Em nosso estudo a infecção por *Y. enterocolitica* levou a um aumento da atividade fagocítica tanto nos macrófagos de camundongos C57BL/6 como nos macrófagos de camundongos BALB/c, porém os macrófagos de camundongos C57BL/6 apresentaram atividade fagocítica maior que a dos macrófagos de camundongos BALB/c, em todos os pontos da cinética de infecção. A maior atividade fagocítica dos macrófagos de camundongos C57BL/6 (M1), também observada em animais controles, pode estar contribuindo para maior resistência desta linhagem à infecção por *Y. enterocolitica*.

Em nosso estudo verificamos que no modelo murino de infecção por *Y. enterocolitica* o baço foi o principal órgão afetado, ocorrendo formação de abscessos. Nos camundongos C57BL/6 infectados, observamos aumento no peso do baço de 2,02 vezes no 3º dia e 1,66 vezes no 5º dia; enquanto que, nos camundongos BALB/c o aumento foi de 1,18 vezes em ambos os dias. Além disso, no 3º e 5º dia pós-infecção, nos C57BL/6 foi constatada a presença de abscessos no baço de 100% dos animais,

enquanto que nos BALB/c, os abscessos ocorreram em 60% dos animais. Estudos iniciados por Autenrieth et al. (AUTENRIETH et al., 1993a; AUTENRIETH et al., 1994), seguidos pelos de Bohn et al. (BOHN et al., 1994; BOHN et al., 1996; BOHN et al., 1998a) envolvendo vários mecanismos potenciais para explicar a maior resistência de camundongos C57BL/6 em relação à dos BALB/c, no modelo de administração i.v. de *Y. enterocolitica*, demonstraram que os baços dos camundongos C57BL/6 fazem uma resposta inflamatória mais pronunciada, caracterizada por esplenomegalia, remoção das bactérias e uma ativação mais rápida de células T CD4⁺ e CD8⁺, que contribui para a maior resistência desta linhagem à infecção (AUTENRIETH et al., 1994).

Sabe-se que linfócitos T de diferentes linhagens de camundongos têm tendência a produzir diferentes perfis de citocinas Th1 ou Th2 (HSIEH et al. 1995). Em nosso estudo observamos que linfócitos de camundongos C57BL/6 não infectados produziram quantidade elevada de IFN- γ e não produziram IL-4, enquanto que os linfócitos de camundongos BALB/c não infectados produziram pouco IFN- γ e não produziram IL-4. Esses resultados são concordantes com relatos de Heinzl et al. (HEINZEL et al., 1989; HEINZEL et al., 1991) nos quais células T CD4⁺ de camundongos C57BL/6 expressaram altos níveis de RNAm do IFN- γ e o RNAm da IL-4 foi indetectável. São ainda parcialmente concordantes com dados de Mills et al. (2000), onde linfócitos de camundongos não infectados C57BL/6 produziram maior quantidade de IFN- γ do que os de BALB/c, enquanto que os de BALB/c produziram mais IL-4 comparados com os de C57BL6.

Quanto às citocinas Th1e Th2, não detectamos a produção de IL-4 pelos linfócitos de camundongos C57BL/6 controles ou infectados, enquanto que os linfócitos

de BALB/c infectados produziram quantidade detectável apenas no 5º dia pós-infecção. Esses resultados são parcialmente concordantes com os observados por Authenrieth e al. (1994) que relataram ausência de IL-4 ou IL-5 detectáveis em sobrenadantes de culturas de linfócitos de camundongos BALB/c *in vitro*, nos primeiros dias (dias 1 a 7) após infecção por *Y. enterocolitica*. Handley et al. (2004) relataram que os níveis de IL-4 intracelular estavam abaixo do limite de detecção (20 pg/mL), nos tecidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, porém eles utilizaram a via oral de infecção. Outros estudos, entretanto, relataram produção de IL-4 por linfócitos de camundongos BALB/c infectados (BOHN et al., 1994; BOHN e AUTENRIETH, 1996; HEINZEL et al., 1989; HEINZEL et al., 1991; MILLS et al., 2000). As principais fontes de IL-4 e IL-13 no organismo, bem como os estímulos que levam à liberação destas citocinas com funções cooperativas e não redundantes, na polarização de células Th2, suscetibilidade a certas doenças e proteção contra doenças parasitárias, ainda não estão bem definidas (GORDON, 2003). É possível que a produção de IL-4 extracelular pelos linfócitos da maioria dos animais de nosso estudo esteja abaixo da sensibilidade do Kit utilizado (5 pg/mL) ou ainda que a citocina tenha sido produzida e posteriormente consumida pelas células em multiplicação.

Durante a infecção os linfócitos de camundongos C57BL/6, estimulados por Con A ou HKY, aumentaram significativamente a produção de IFN- γ . Os linfócitos de camundongos BALB/c estimulados por Con A, também aumentaram a produção de IFN- γ , porém o nível alcançado no 5º dia pós-infecção (726 pg/mL) foi menor do que o observado para os animais C57BL/6 controles e infectados (944 pg/mL e 2.431 pg/mL respectivamente).

Linfócitos de camundongos C57BL/6 infectados por *Y. enterocolitica* produziram maior quantidade de IFN- γ do que os de BALB/c e não produziram IL-4 durante o período de observação. Assim, em nosso estudo, os linfócitos de camundongos C57BL/6 produziram uma resposta tipicamente Th1. Autenrieth et al. (1994) demonstraram que células T isoladas de camundongos C57BL/6 produziram quantidade significativa de IFN- γ após estímulo com HKY, enquanto que células T de camundongos BALB/c não o fizeram. A neutralização *in vivo* de IFN- γ abole a resistência à *Y. enterocolitica* e leva à progressão fatal da doença (AUTENRIETH e HEESEMANN, 1992; AUTENRIETH et al., 1994). A indução precoce de uma resposta celular Th1 específica e a rápida produção de IFN- γ altera o curso da infecção e se mostrou essencial para a resolução da infecção. O IFN- γ tem papel importante no controle da infecção por *Y. enterocolitica*, sugerindo que os macrófagos ativados contribuem para a recuperação (AUTHENRIETH, et al., 1994, BOHN et al., 1994).

Por outro lado, observamos que os linfócitos de camundongos BALB/c, produziram uma resposta tipicamente Th2 com produção de IL-4 e pequena produção de IFN- γ , que é ineficiente no combate ao microrganismo (AUTHENRIETH, et al., 1994, BOHN e AUTHENRIETH, 1996). A IL-4 não é protetora na infecção por *Y. enterocolitica* em camundongos BALB/c; já foi demonstrado que a administração de anticorpos anti-IL-4 antes da infecção por *Y. enterocolitica*, transforma camundongos BALB/c suscetíveis em animais resistentes, enquanto que o mesmo tratamento não afeta de maneira significativa os camundongos C57BL/6 *Yersinia*-resistentes (AUTHENRIETH, et al., 1994). É possível que a maior produção de IL-4 nos camundongos BALB/c esteja relacionada com sua suscetibilidade aumentada à *Yersinia*.

Em nosso estudo verificamos que macrófagos de camundongos C57BL/6 produziram maior quantidade de NO/citrulina, menores quantidades de ornitina, não produziram TGF- β 1 e apresentaram maior atividade fagocítica quando comparados aos macrófagos de camundongos BALB/c. Os linfócitos dos C57BL/6 não produziram IL-4 e produziram maior quantidade de IFN- γ , enquanto que os de BALB/c produziram IL-4 no 5º dia pós-infecção e produziram menor quantidade de IFN- γ .

De maneira geral, no 1º e 3º dia após infecção com *Y. enterocolitica*, os macrófagos de camundongos C57BL/6 reestimulados ou não, aumentaram a produção de NO/citrulina, diminuíram a produção de ornitina e não produziram TGF- β 1; enquanto que os macrófagos de camundongos BALB/c diminuíram a produção de NO/citrulina, aumentaram a produção de ornitina e de TGF- β 1. Os linfócitos de C57BL/6 aumentaram a produção de IFN- γ , alcançando níveis elevados já no 1º dia, enquanto que os de BALB/c apresentaram um aumento mais discreto, alcançando níveis bem menores.

O tipo e a intensidade da resposta elaborada por uma linhagem de camundongo são provavelmente determinados pela tendência de seus macrófagos e linfócitos às respostas Th1 ou Th2. Assim, pode ocorrer sinergismo (macrófagos M1 e linfócitos Th1), levando a uma resposta predominantemente Th1; ou antagonismo (macrófagos M1 e linfócitos Th2). Nossos resultados juntos mostraram que no 1º e 3º dia, nos camundongos C57BL/6, a infecção por *Y. enterocolitica* promove preferencialmente a modulação de macrófagos M1 e linfócitos Th1, enquanto que nos camundongos BALB/c, promove preferencialmente a modulação de macrófagos M2 e de linfócitos Th2. Portanto, a população predominante de macrófagos nos primeiros

dias da infecção experimental de camundongos por *Y. enterocolitica* parece ser importante na determinação da resistência ou suscetibilidade da linhagem.

Está muito bem estabelecido que os linfócitos T (Th1 e Th2) podem influenciar as respostas imunes de formas opostas. Por outro lado, vários estudos forneceram evidências de que macrófagos podem influenciar a resposta de linfócitos.

Nossos resultados proporcionaram importantes esclarecimentos sobre a resposta inicial dos macrófagos na infecção experimental por *Y. enterocolitica* em camundongos resistentes e suscetíveis, sugerindo que a modulação racional da resposta imune contra esse microrganismo dependerá em parte da capacidade de estimular a via apropriada de metabolismo da arginina nos macrófagos, isto é, estimular a modulação de macrófagos M1. Entretanto, são necessários vários outros estudos com finalidade de entender melhor o envolvimento dos macrófagos M1 e M2 na determinação da resposta Th1 ou Th2 para futuramente explorar a possibilidade de alterar o curso da resposta imune, tornando-a mais eficaz.

6. CONCLUSÕES

1. A infecção por *Y. enterocolitica* estimula nos primeiros dias (1º e 3º), preferencialmente, a modulação de macrófagos M1 nos camundongos C57BL/6 e a modulação de macrófagos M2 nos camundongos BALB/c.

2. A infecção por *Y. enterocolitica* pode interferir de diferentes maneiras na produção de NO pelos macrófagos no 1º dia pós-infecção. Em camundongos BALB/c esta infecção leva à supressão da produção de NO, enquanto que em camundongos C57BL/6 leva à ativação.

3. Nos camundongos BALB/c, a infecção por *Y. enterocolitica* também pode levar à modulação de macrófagos M1, porém mais tardiamente que nos C57BL/6.

4. A infecção por *Y. enterocolitica*, resulta em aumento na produção de TGF- β 1 pelos macrófagos de camundongos BALB/c.

5. Macrófagos M1 de camundongos C57BL/6 infectados com *Y. enterocolitica* possuem atividade fagocítica maior que os macrófagos M2 de camundongos BALB/c.

6. A população predominante de macrófagos (M1 ou M2) nos primeiros dias da infecção (1º e 3º dia) parece ser importante na determinação da suscetibilidade ou resistência à *Y. enterocolitica*.

7. A infecção por *Y. enterocolitica* estimula nos primeiros dias (1º e 3º), nos camundongos C57BL/6, preferencialmente a modulação de linfócitos Th1 e a modulação de linfócitos Th2, nos camundongos BALB/c.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 2, p. 283-318, 1984.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature immunology**, New York v. 2, p. 675-680, 2001.

ALBINA, J. E.; MILLS, C. D.; HENRY Jr, W. L.; CALDWELL, M. D. Temporal expression of different pathways of L-arginine metabolism in healing wounds. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 144, p. 3877-3880, 1990.

ALBINA, J. E.; ABATE, J. A.; MASTROFRANCESCO, B. Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. **Journal of surgical research**, New York, v. 1, p. 55 -97, 1993.

ALIPRANTIS, A. O.; YANG, R. B.; MARK, M. R.; SUGGETT, S.; DEVAUX, B.; RADOLF, G. R.; GODOWSKI, P.; ZYCHLINSKY, A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. **Science**, Washington, v. 285, p. 736-739, 1999.

ANDERSON, K.; CARBALLERA, N.; MAGUSSON, K. E.; PERSON, C.; STENDAHL, O.; WOLF-WATZ, H.; FÄLLMAN, M. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signaling associated with phagocytosis. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 20, p. 1057-1069, 1996.

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. **Infection and immunity**, Washington, v. 62, p. 2590 -2599, 1994.

AUTENRIETH, I. B.; BEER, M.; HANTSHMANN, P.; PREGER, S.; VOGEL, U.; HEYMER, B.; HEESEMANN, J. The cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in different inbred strains of mice: evidence for an important role of T lymphocytes. **Zentralblatt für bakteriologie**, Stuttgart, v. 278, p. 383-395, 1993a.

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

AUTENRIETH, I. B.; KEMPF, V.; SPRIZ, T.; PREGER, S.; SCHENELL, A. Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrines and cytokines. **Infection and immunity**, Washington, v. 64, p. 1357-1368, 1996.

AUTENRIETH, I. B.; TINGLE, A.; RESK-KUNZ, A.; HEESEMANN, J. T. Lymphocyte mediates protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cells clones specific for *Y. enterocolitica* **Infection and immunity**, Washington, v. 60, p. 1140-1149, 1992.

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. **Infection and immunity**, Washington, v. 61, p. 2585-2595, 1993c.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and control of immunity. **Nature**, London, v. 392, p. 245-252, 1998.

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

BLISCA, J. B.; BLACK, D. S. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. **Infection and immunity**, Washington, v. 63, p. 681-685, 1995.

BLISCA, J. B.; CLEMENS, J. C.; DIXON, J. E.; FALKOW, S. The *Yersinia* tyrosine phosphatase: specificity of bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 176, p. 1625-1630, 1992.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, New York, v. 2, p. 907-916, 2001.

BOGDAN, C., NATHAN, C. Modulation of immune macrophages function by transforming growth factor beta, interleukin-4 and interleukin-10. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 685, p. 713-739, 1993.

BOHN, E.; AUTENRIETH, I. IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 156, p. 1458-1468, 1996.

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

BOHN, E.; SCHMITT, E.; BILFELD, C.; NELL, A.; SHULTE, R.; AUTENRIETH, I. B. Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. **Infection and immunity**, Washington, v. 66, p. 2213-2220, 1998a.

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

BOUTARD, V.; HAVOUI, R.; FOUNQUERAY, B.; PHILIPPE, C.; MOULINOX, J. P.; BAUD, L. Transforming growth factor- β stimulates arginase activity in macrophages: implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 155, p. 2077-84, 1995.

BOUZA, E.; DOMINGUEZ, A.; MESEGUER, M.; BUZON, L.; BOIXEDA, D.; REVILO, M. J.; RAFAEL, L.; MARTINEZ BETRAN, J. *Yersinia enterocolitica* septicaemia. **American journal of clinical pathology**, Baltimore, v. 74, p. 404-409, 1980.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. **Critical reviews in microbiology**, Boca Raton, v. 5, p. 211-241, 1977.

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

CARTER, P. B. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 11, p. 164-70, 1975.

CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. Animal models for human disease. **American journal of pathology**, New York, v. 81, p. 703-705, 1974.

CHAKKALATH, H. R. and TITUS, R. G. *Leishmania major*-parasitized macrophages augment Th2-type T cell activation. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 153, p. 4378-4387, 1994.

CORNELIS, G.; LAROCHE, Y.; BALLIGAND, G.; SORY, M. P.; WAUTERS, G. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. **Reviews of infectious diseases**, Chicago, v. 9, p. 64-87, 1987.

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

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, J.; MACMICKING, J.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Type I interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, Cambridge, v. 8, p. 77-87, 1998.

DILEEPAN, K. N.; PAGE, J. C.; STECHCHULTE, J. D. Direct activation of murine peritoneal macrophages for nitric oxide production and tumor cell killing by interferon- γ . **Journal of interferon and cytokine research**, New York, v. 15, p. 387-394, 1995.

- EL TAHIR, Y.; SKURNIK, M. YadA the multifaceted *Yersinia* adhesin. **International journal of medical microbiology**, Stuttgart, v. 291, p. 209-218, 2001.
- FÄLLMAN, M.; ANDERSON, K.; HAKANSON, S.; MAGNUSSON, K. F.; STENDHAL, O.; WOLF-WATZ, H. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. **Infection and immunity**, Washington, v. 63, p. 3117-3124, 1995.
- FARGEAS, C.; WU, C. Y.; NAKAJIMA, T.; COX, D.; NUTMAN, T.; DELESPESE, G. Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. **European journal of immunology**, Weinheim, v.22, p.2173-2176, 1992.
- FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, Washington, v. 135, p. 442-447, 1987.
- GRANT, T.; BENNETT-WOOD, V.; ROBINS-BROWNE, R. M. Characterization of the interaction between *Yersinia enterocolitica* biotype A, phagocytes and epithelial cells *in vitro*. **Infection and immunity**, Washington, v.67, p. 4367-4375, 1999.
- GREEN, L. C. D.; WAGNER, D. D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKEPPER, P. L. WISHNOK, J.; TANNEBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, New York, v. 126, p. 131-138, 1982.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology**, London, v. 3, p. 23-35, 2003.
- GUAN, K.; DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. **Science**, Washington, v. 249, p. 553-556, 1990.
- HAKANSSON, S.; GALYOV, E. E. E.; ROSQVIST, R.; WOLF-WATZ, H. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to inner surface of the HeLa plasma membrane. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 20, p. 593-603, 1996.
- HANCOCK, G. E.; SCHAEGLER, W. R.; MacDONALD, T. T. Multigenic control to *Yersinia enterocolitica* in inbred strains of mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 56, p. 532-533, 1998.
- HANCOCK, G. E.; SCHAEGLER, W. R.; Mac DONALD, T. T. *Yersinia enterocolitica* infection in resistant and susceptible strains of mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 53, p. 26-31, 1986.
- HANDLEY, S. A. H.; DUBE, P. H.; REVELL, P. A.; MILER, V. L. Characterization of oral *Yersinia enterocolitica* infection in three different strains of inbred mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 72, p. 1645-1656, 2004.

HANSKI, C.; KUTSCHKA, U.; SCHMORANZER, H. P.; NAUMANN, M.; STALLMACH, A.; HAHN, H.; MENGE, H.; RIECKEN, O. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. **Infection and immunity**, Washington, v. 57, p. 673-678, 1989.

HANSKI, C.; NAUMANN, M.; GRÜTZAKAU, A.; PLUSCHKE, G.; FRIDERICH, B.; HAHN, H. Humoral and cellular defenses against intestinal murine infection with *Yersinia enterocolitica*. **Infection and immunity**, Washington, v. 59, p. 1106-1111, 1991.

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

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R.; YI, E. C.; GOODLETT, D. R.; ENG, J. K.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M.; ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, London, v. 410, p. 1099-1103, 2001.

HEESEMAN, J.; GAEDE, K.; AUTENRIETH, I. B. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis. **Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica**, Copenhagen, v. 101, p. 417-429, 1993.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of interferon-gamma, interleukin 2, interleukin 4 and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 7011-7015, 1991.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis: evidence for expansion of distinct helper T subsets. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 169, p. 59-72, 1989.

HEMMI, H. O.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA **Nature**, London, v. 408, p. 720-745, 2000.

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

HOFFMAN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOVITZ, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, Washington, v. 284, p. 1313-1318, 1999.

- HSIEH, C. S.; MACATONIA, A.; O' GARRA, MURPHY, K. M. T cell genetic background determines default T helper phenotype development *in vitro*. **Journal Clinical experimental immunology**, London, v. 181, p. 713-721, 1995.
- IRIARTE, M. and CORNELIS, G. R. YopT, A new *Yersinia* Yop effector protein, affects cytoskeleton of host cells. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 29, p. 915-929, 1998.
- JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, D. W. Comparative properties of arginases. **Comparative Biochemistry Physiology** London, v. 114, p. 107-32, 1996.
- KALINSKI, P.; HILKENS, C. M.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG. T cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunology today**, Cambridge, v. 20, p. 5561-5567, 1999.
- LEE, T. S.; CHAU, L. Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. **Nature medicine**, New York, v. 8, p. 240-246, 2002.
- LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of macrophages in the wound repairs: a study with hydrocortisone and anti-macrophage serum. **American journal of pathology**, New York, v. 78, p. 71-100, 1975.
- LEIRISALO-REPO, M.; SUORANTA, H. Ten-year follow up study of patients with *Yersinia* arthritis. **Arthritis and rheumatism**, Atlanta, v. 31, p. 533-537, 1988.
- LETTERIO, J. J., ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 16, p. 137-161, 1998.
- LEUNG, K. Y.; REISNER, B. S.; A.; STRALEY, S. C. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 58, p. 3262-3271, 1990.
- LIEW, F. Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, M.; ROGERS, V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 21, p. 3009-3014, 1991.
- LIU, T.; NISHIMURA, H.; MATSIGUCHI, T.; YOSHIKAI, Y. Difference in IL-12 and IL-15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/c and C57BL/6 mice. **Cell immunology**, New York, v. 202, p. 31-40, 2000.
- LOUIS, C. A.; REICHNER, J. S.; HENRY, W. L., Jr.; MASTROFRANCESCO, B.; GOTOH, T.; MORI, M.; ALBINA, J. Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: regulation by oxygen tension., **American journal of physiology**, New York, v. 274, p. R775-82, 1998.

MACKANES, G. B. Cellular Immunity. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 130, p. 428-437, 1971.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 15, p. 323-350, 1997.

MALDONATO-LOPES, R.; DE SMEDT, T.; MICHEL, P.; GODFROID, J.; PAJAK, B.; HEIMAN, C.; THIELEMANS, K.; LEO, O.; URBAIN, J.; MOSER, M. CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 189, p. 587-592, 1999.

MALOY, K. J.; SALAUN, L.; CHAHILL, R. CD4⁺CD25⁺ TR cells suppress innate immune pathology through cytokin-dependent mechanisms. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 197, p. 111-119, 2003.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunology**, v. 29, p. 819-822, 2001.

MANTOVANI, A., SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophages activation and polarization. **Trends in immunology**, Oxford, v. 25, p. 677-686, 2004.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, Jr. C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, Cambridge, v. 91, p. 295-298, 1997.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and a T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology today**, Cambridge, v. 20, p. 469-473, 1999.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, M. J.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 164, p. 6166-6173, 2000.

MILLS, C. D.; SHEARER, J.; EVANS, R.; CALDWELL, M. D. Macrophage arginine metabolism and inhibition or stimulation of cancer. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 149, p. 2709-2714, 1992.

MICHEL, T.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. **Molecular biological analysis of nitric oxide synthases. In: Methods in nitric oxide research**. New York : Wiley & Sons, 1996, p.161-175.

MOSMANN, T. R.; CHERVINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A. Two types of murine helper T cell clone.1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 136, p. 2348-2357, 1986.

- MOSMANN, T. R. and COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional proprieties. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of leukocyte biology**, Winston-Salem, v. 73, p. 209-212, 2003.
- MUELLER, I.; FRUTH, U.; LOUIS, J. A. Immunobiology of experimental *leishmaniasis*. **Medical microbiology and immunology**, Berlin, v. 181, p. 1-12, 1992.
- MULDER, B.; MICHIELS, T.; SIMONET, M.; SORY, M. P.; CORNELIS, G. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. **Infection and immunity**, Washington, v. 57, p. 2534-2541, 1989.
- MUNN, D. H.; ZHOU, M., ATTWOOD, J. T., BONDAREV, I., CONWAY, S. J., MARSHALL, B., BROWN, C. MELLOR, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, Washington, v. 28, p. 1191-1193, 1998.
- MUNDER, M.; EICHMANN, J.; MORAN, M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 163, p. 3771-3777, 1999.
- NAGELKERKEN, L.; GOLLOB, K. J.; TIELEMANS, M.; COLFMAN, R. L. Role of transforming growth factor-beta in the preferential induction of T helper cells of type 1 by staphylococcal enterotoxin B. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 23, p. 2306-2310, 1993.
- NATHAN, C. F.; HIBBS Jr., J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 3, p. 65-70, 1991.
- NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America** Washington, v. 97, p. 8841-8848, 2000.
- O' GARRA, A. and MURPHY, K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte functions. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 6, p. 458-466, 1994.
- OZISKY, A.; UNDERHILL, D. M.; FONTENOT, J. D.; HAJAR, A. M.; SMITH, K. D.; WILSON, C. B. SCHOEDER. I.; ADEREM, A. The repertoire for patten recognition of patphogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 13766-13771, 2000.

PUJOL, C.; BLISKA, J. B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae., **Clinical immunology**, Orlando, v. 117, p. 216-226, 2005.

PULENDRAN, B. SMITH, J. L.; GASPARY, G.; BRASEL, K.; PETTIT, D.; MARASKOVISKY, E.; MALISZEWSKI, C. R. Dendritic cell subsets differentially regulate the immune response *in vivo* **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p.1036-1041, 1999.

RAGSDALE, R. L.; GRASSO, R. J. An improvement spectrophotometric assay for quantitating phagocytosis in culture of murine peritoneal macrophages. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 123, p. 259-267, 1989.

RAUH, M. J.; HO, V.; PEREIRA, C.; SHAM, A.; SLY, L. M.; LAM, V.; HUXHAM, L.; MIUNCHINTON, A.I.; MULK, A.; FRYSTAL, GT. SHIP reres the generation of alternatively activated macrophages, **Immunity**, Cambridge, v. 23, p. 361-3774, 2005.

RISSOAN, M. C.; SOUNELIS, V.; KADOWAKI, N.; GROUARD, G.; BRIERE, F.; DE WAAL MALEFYT, R.; LIU, Y. J. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. **Science**, Washington, v. 283, p. 1183-1186, 1999.

ROGGENKAMP, A.; BITTNER, T.; LEITRITZ, L.; SING, A.; HEESEMANN, J. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) in the virulence of *Yersinia enterocolitica* sorotype O:8. **Infection and immunity**, Washington, v. 65, p. 4705-4710, 1997.

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

ROSQVIST, R.; FORSBERG, A.; RIPILÄLINEN, M.; BEGMAN, T.; WOLF-WATZ, H. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defense. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 4, p. 657-667, 1990.

RUCKEDESCHER, K.; MACHOLD, J.; SCHUBERT, S.; PIERRE, J.; ZUMBIHL, R.; LIAUTARD, J. P.; HEESEMANN, J.; ROUOUT, B. *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation on macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38 and cJun NH₂-terminal kinase: correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor alfa production. **Journal of biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, p. 15920-15927, 1997a.

RUCKDESCHEL, K.; MANUEL, O. RICHITER, K., JACOBI, C. A.; TRULZSCH, K.; RAUOT, B.; HEESEMANN *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 166, p. 1823-1831, 2001.

RUCKDESCHEL, K.; ROGGENKAMP, A.; SHUBERT, S.; HEESEMANN, J. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion to microbicidal action of neutrophils. **Infection and immunity**, Washington, v. 64, p. 727-733, 1996.

RUCKDESCHEL, K.; ROGGENKAMP, A.; LAFONT, V.; MANGEAT, P.; HEESEMANN, J.; ROUOT, B. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. **Infection and immunity**, Washington, v. 65, p. 4813-4821, 1997b.

SCHINDLER, H.; BOGDAN, C. NO as signaling molecule: effects on kinases. **In. Journal of immunology**, Baltimore, v. 1, p. 1443-1455, 2001.

SILVERSTEIN, A. M. **A history of Immunology**. London: Academic Press, 1989, 363 p.

SING, A.; ROST, D.; TVARDOVSKAIA, N.; ROGGENKAMP, A.; WIEDMANN, A.; KIRSCHNING, C. J.; AEPFELBACHER, M.; HEESEMANN, J. *Yersinia* V-antigen exploits Toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 196, p. 1017-1024, 2002.

SLY, L. M.; RAUH, M. J.; KALENSNIKOFF, J.; SONG, C. H.; KRISTAL, G. LPS-induced up regulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance, **Immunity**, Cambridge, v. 21, p. 227-239, 2004.

SORY, M. P.; CORNELIS, G. R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 14, p. 583-594, 1994.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 180, p. 783-793, 1994.

STRALEY, S. C.; PLANO, G. V.; SKRAYPEK, E.; BLISKZ, J. B. Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. **Infection and immunity**, Washington, v. 63, p. 3105-3110, 1993.

STOUT, R. D.; STUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **Journal of leukocyte biology**, Winston-Salem, v. 76, p. 1-5, 2004.

TAKEUCHI, O. R.; HOSHINO, T.; KAWAI, H.; SANJO, H.; TAKADA, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Differential role of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, Cambridge, v.11, p. 443-451, 1999.

TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; MUHLRADT, P. F.; MORR, M.; RADOLF, J. D.; ZICHLINSKI, A.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Discrimination of bacterial lipoprotein by Toll-like receptor 6. **International immunology**, Oxford, v. 13, p. 993-940, 2001.

TABRIZI, S. N.; ROBINS-BROWNE, R. M. Influence of a 70 kilobase virulence plasmid on the ability of *Yersinia enterocolitica* to survive phagocytosis in vitro. **Microbial pathogenesis**, London, v. 13, p. 171 -179, 1992.

UNANUE, E. R. Antigen-presenting function of macrophage. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 2, p. 395-428, 1984.

UNE, T. Studies of *Yersinia enterocolitica*: II. Interaction with cultured cells *in vivo*. **Microbiology and immunology, Tokyo**, v. 21, p. 365-37, 1977.

VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β . **Clinical and experimental immunology**, London, v. 178, p. 605-13, 1993.

WILLIAMS-ASHMAN, H. G.; CANELLARIS, Z. N. Polyamines in mammalian biology and medicine. **Perspectives in biology and medicine**, Chicago, v. 22, p. 421-453, 1979.

WU, G.; MORRIS Jr., S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemistry international**, Sydney, v. 336, p. 1-17, 1998.

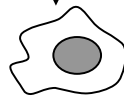
ZANG, Y.; BLISKA, J. B. Role of toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to *Yersinia* infection. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, p. 1513-1519, 2003.

ANEXO

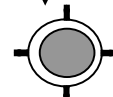
Y. enterocolitica (i.v.)



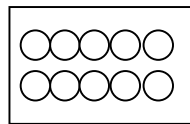
1º dia
3º dia
5º dia



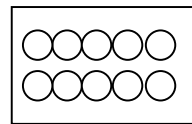
macrófagos



linfócitos



macrófagos



linfócitos

37° C, 5% CO₂, 95% umidade

48 horas

NO
citrulina
ornitina
TGF-β1

C57BL/6

NO ↑
citrulina = ou ↑
ornitina = ou ↓
TGF-β1 -

**Modulação de
macrófagos M1**

48 horas

BALB/c

NO ↓
citrulina = ou ↓
ornitina = ou ↑
TGF-β1 ↑

**Modulação de
macrófagos M2**

24 horas

IL-4

24 horas

IFN-γ

C57BL/6

IL-4 -
IFN-γ (alto) ↑

BALB/c

IL-4 +
IFN-γ (baixo) ↑

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)