

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS ARARAQUARA**

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *YERSINIA  
PSEUDOTUBERCULOSIS* SOBRE O COMPORTAMENTO DE  
MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS.**

**ALINE TANSINI**

**ARARAQUARA**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS ARARAQUARA**

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *YERSINIA  
PSEUDOTUBERCULOSIS* SOBRE O COMPORTAMENTO DE  
MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS.**

**ALINE TANSINI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. BEATRIZ MARIA MACHADO DE MEDEIROS**

**ARARAQUARA**

**2008**

## Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

### **Tansini, Aline**

T168i      Influência da infecção por *Yersinia Pseudotuberculosis* sobre o comportamento de macrófagos e células dendríticas. / Aline Tansini. – Araraquara, 2008.  
110 f.

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

Orientador: Beatriz Maria Machado de Medeiros

1. *Yersinia pseudotuberculosis*. 2. Macrófagos. 3. Células dendríticas. 4. Imunologia. I. Medeiros, Beatriz Maria Machado de, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Básica, Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP - Araraquara), com apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), através do auxílio à pesquisa (Proc. nº 06/06964-8), do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Brazil (PADC 2006/13-I) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES/Brazil através da concessão de bolsa.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, José e Elisa, que sempre me incentivaram e apoiaram ao longo do meu caminho. Ao meu irmão André, sempre portador de alegria e carinho.

## AGRADECIMENTOS

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

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

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Maria Machado de Medeiros, pela dedicação, paciência e confiança em mim depositada, sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos e guiando meus passos com atenção e sabedoria.

À amiga Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta, pela colaboração na padronização e execução dos métodos utilizados no trabalho, e ao amigo Luis Gustavo Silva Monnazzi, pelo auxílio no desenvolvimento de algumas metodologias utilizadas.

Às funcionárias do Setor de Pós-graduação, Claudia, Sônia e Laura, pela atenção e empenho sempre dedicados

À bibliotecária Ana Cristina pela revisão das referências bibliográficas

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro

# ÍNDICE

## LISTA DE ABREVIATURAS

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE FIGURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

## CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Amostra bacteriana.....	25
3.3 Infecção experimental dos animais.....	25
3.3.1 Reativação da amostra de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .....	25
3.3.2 Preparo do inóculo.....	26
3.3.3 Esquema de Infecção.....	26
3.4 Preparo do antígeno de <i>Yersinia</i> – HKY.....	26
3.5 Obtenção de macrófagos peritoneais.....	27
3.6 Obtenção e enriquecimento das células dendríticas.....	27
3.7 Imunofenotipagem de células dendríticas.....	28
3.8 Dosagem de óxido nítrico.....	29
3.9 Determinação da atividade da arginase.....	29
3.10 Determinação da produção de citocinas por ELISA.....	29
3.11 Avaliação da capacidade de apresentação de antígenos.....	30
3.11.1 Imunização de camundongos com HKY.....	30
3.11.2 Obtenção e enriquecimento de linfócitos T.....	30
3.11.3 Viabilidade dos linfócitos.....	31
3.11.4 Co-cultivo das células apresentadoras de antígeno e linfócitos.....	31



3.12 Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Dosagem de óxido nítrico em cultura de macrófagos.....	32
4.2 Determinação da atividade da arginase em lisado de macrófagos.....	35
4.3 Determinação de IL-10 em cultura de macrófagos.....	38
4.4 Determinação de IL-12 em cultura de macrófagos.....	41
4.5 Determinação de TNF- $\alpha$ em cultura de macrófagos.....	44
4.6 Determinação de TGF- $\beta$ em cultura de macrófagos.....	47
4.7 Imunofenotipagem de células dendríticas.....	50
4.8 Dosagem de óxido nítrico em cultura de células dendríticas.....	52
4.9 Determinação da atividade da arginase em lisado de células dendríticas.....	55
4.10 Determinação de IL-10 em cultura de células dendríticas.....	58
4.11 Determinação de IL-12 em cultura de células dendríticas.....	61
4.12 Determinação de TNF- $\alpha$ em cultura de células dendríticas.....	64
4.13 Determinação de IL-4 em cultura de células dendríticas.....	67
4.14 Imunofenotipagem de linfócitos.....	67
4.15 Co-cultivo de macrófagos e linfócitos.....	68
4.16 Co-cultivo de células dendríticas e linfócitos.....	69
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
 <b>CAPÍTULO II</b>	
Artigo: “Susceptibility to Yersinia pseudotuberculosis infection is linked to the pattern of macrophage activation”.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula Apresentadora de Antígeno  
BAB – Blood Agar Base  
BSA – Bovine Serum Albumin  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono  
EDTA – Ethylenediamine Tetracetic Acid  
FAE – Epitélio Intestinal Associado ao Folículo  
FBS – Fetal Bovine Serum  
HCl – Ácido Clorídrico  
HKY – Heat-Killed Yersinia  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido Sulfúrico  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Ácido Fosfórico  
IDC – Célula Dendrítica Intersticial  
IL – Interleucina  
iNOS – Inducible NO Synthase  
IFN- $\gamma$  – Interferon-gama  
LC – Célula de Langerhan  
LcrV – Antígeno V  
LPS – Lipopolysaccharide  
MHC – Major Histocompatibility Complex  
MLN – Linfonodos Mesentéricos  
MnCl<sub>2</sub> – Cloreto de manganês  
moDC – Célula Dendrítica Derivada de Monócito  
MTT – brometo 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólio  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NO – Óxido Nítrico  
PAMP – Padrão Molecular Associado ao Patógeno  
PBS – Phosphate Buffered Saline  
pYV – Plasmídeo Yop Virulon  
PP – Placa de Peyer  
SPF – Specif Pathogen Free  
TGF- $\beta$  – Fator de Crescimento Transformante-beta  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral-alfa

TLR – Toll Like Receptor

TSB – Tripic Soy Broth

TTSS – Sistema de Secreção do Tipo III

Yop – Yersinia Outer Protein

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	33
<b>Tabela 2</b> – Atividade da enzima arginase em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	36
<b>Tabela 3</b> – Produção de IL-10 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	39
<b>Tabela 4</b> – Produção de IL-12 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	42
<b>Tabela 5</b> – Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	45
<b>Tabela 6</b> – Produção de TGF- $\beta$ por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	48
<b>Tabela 7</b> – Produção de óxido nítrico por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	53
<b>Tabela 8</b> – Atividade da enzima arginase em células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	56
<b>Tabela 9</b> – Produção de IL-10 por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	59
<b>Tabela 10</b> – Produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	62
<b>Tabela 11</b> – Produção de TNF- $\alpha$ por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle.....	65

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\* p < 0,05).....34
- Figura 2** – Atividade da enzima arginase em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\* p < 0,05).....37
- Figura 3** – Produção de IL-10 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\* p < 0,05).....40
- Figura 4** – Produção de IL-12 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\* p < 0,05).....43
- Figura 5** – Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\* p < 0,05).....46
- Figura 6** – Produção de TGF- $\beta$  por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\* p < 0,05).....49

<b>Figura 7</b> – Expressão de MHC de classe II na superfície de células dendríticas de camundongos controles e infectados. (A – C57BL/6 controle, B – C57BL/6 1º dia pós-infecção, C – BALB/c controle, D – BALB/c 1º dia pós-infecção).....	50
<b>Figura 8</b> – Sub-populações de células dendríticas presentes no baço de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados.....	51
<b>Figura 9</b> – Produção de óxido nítrico por células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média ± SD de observações em duplicata (* p < 0,05).....	54
<b>Figura 10</b> – Atividade da enzima arginase em células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média ± SD de observações em duplicata (* p < 0,05).....	57
<b>Figura 11</b> – Produção de IL-10 por células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média ± SD de observações em duplicata (* p < 0,05).....	60
<b>Figura 12</b> – Produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média ± SD de observações em duplicata (* p < 0,05).....	63
<b>Figura 13</b> – Produção de TNF- $\alpha$ por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com <i>Y. pseudotuberculosis</i> e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média ± SD de observações em duplicata (* p < 0,05).....	66
<b>Figura 14</b> – Análise através de citometria de fluxo da população de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> , obtidos de camundongos imunizados com HKY.....	67

**Figura 15** – Influência da infecção por *Y. pseudotuberculosis* sobre a capacidade de macrófagos estimularem a proliferação de células T. A Proliferação celular foi mensurada através da metodologia do MTT. Resultados representam a DO em 540nm obtida a partir da produção de formazana, e são representadas como média  $\pm$  SD. As dosagens foram realizadas em quadruplicata. \*p<0,05 vs controle.....68

**Figura 16** – Influência da infecção por *Y. pseudotuberculosis* sobre a capacidade de células dendríticas estimularem a proliferação de células T. A Proliferação celular foi mensurada através da metodologia do MTT. Resultados representam a DO em 540nm obtida a partir da produção de formazana, e são representadas como média  $\pm$  SD. As dosagens foram realizadas em quadruplicata. \*p<0,05 vs controle.....69

## RESUMO

A infecção por *Y. pseudotuberculosis* é a causa de doenças intestinais e extraintestinais. A resolução da infecção está relacionada com a ativação de células Th1. Macrófagos e células dendríticas são capazes de orientar a resposta imune adaptativa através da produção de citocinas e apresentação de antígenos às células T. Estas células metabolizam L-arginina por duas vias, utilizando as enzimas iNOS ou arginase. O metabolismo de L-arginina é um importante parâmetro para discriminar o estado de ativação destas células. O objetivo deste estudo foi verificar a influência da infecção por *Y. pseudotuberculosis* sobre o comportamento de macrófagos e células dendríticas de camundongos resistentes (C57BL/6) e suscetíveis (BALB/c). Macrófagos peritoneais e células dendríticas esplênicas foram obtidos em 12 horas, 1º, 3º e 5º dias pós-infecção, cultivados, e foi determinada a produção de NO, atividade da arginase, produção de citocinas e capacidade imunoestimulatória destas células. Durante a infecção, macrófagos e células dendríticas de camundongos C57BL/6 infectados produziram quantidade maiores de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$ , enquanto as células de camundongos BALB/c infectados apresentaram maior atividade da arginase e produção de IL-10. A infecção provocou uma diminuição na capacidade de estimulação de macrófagos e células dendríticas, com menor proliferação de células T nos camundongos BALB/c. Estes resultados sugerem que os mecanismos responsáveis pela resistência e suscetibilidade à infecção podem estar relacionados com diferenças no estado de ativação de macrófagos e células dendríticas.

**Palavras chaves:** *Yersinia pseudotuberculosis*, macrófagos, células dendríticas, óxido nítrico, arginase, citocinas, ativação de célula T



## ABSTRACT

*Y. pseudotuberculosis* infection is the cause of intestinal or extraintestinal diseases. The resolution of infection is connected with activation of Th1 cells. Macrophages and dendritic cells are able to orient the adaptive immune response through the production of cytokines and antigen presentation to T-cells. These cells metabolize L-arginine by two pathways, using the iNOS or arginase enzymes. L-arginine metabolism is an important parameter to discriminate the activate state of these cells. The objective of this study was to verify the influence of *Y. pseudotuberculosis* infection on the behavior of macrophages and dendritic cells from susceptible (BALB/c) and resistant (C57BL/6) mice. Peritoneal macrophages and splenic dendritic cells were obtained on the 12 h, 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> day post-infection, cultured, and the NO production, arginase activity, cytokines production and immunostimulatory capacity of these cells was determined. During the infection, macrophages and dendritic cells from infected C57BL/6 mice produced higher amounts of NO, IL-12 and TNF- $\alpha$ , while the cells from infected BALB/c mice presented higher arginase activity and IL-10 production. The infection leads to a decrease in the immunostimulatory capacity of macrophages and dendritic cells, with T-cell proliferation smaller in the BALB/c mice. These results suggest that mechanisms responsible for the resistance and susceptibility to infection may be connect with differences in the activation state of macrophages and dendritic cells.

**Keywords:** *Yersinia Pseudotuberculosis*, macrophages, dendritic cell, nitric oxide, arginase, cytokines, T-cell activation

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Yersinia*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é constituído por cocos Gram-negativos, não esporulados, oxidase negativos e anaeróbios facultativos. São predominantemente extracelulares (ROSQVIST et al., 1988; SIMONET et al., 1990), sendo que três espécies são patogênicas para o homem, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* (NAKTIN e BEAVIS, 1999).

*Y. pestis* é responsável pelo desenvolvimento da peste bubônica, uma doença sistêmica fatal (CARNIEL, 2002). *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* causam distúrbios gastrointestinais. A ingestão dessas bactérias através de água ou alimentos contaminados desencadeia enterites e linfadenites, geralmente autolimitadas no homem (BOTTONE, 1999). Em pacientes com hemocromatose e imunodeprimidos, a *Yersinia* pode disseminar-se sistemicamente, sendo fatal em 70% dos casos (ABBOTT et al., 1986).

As três espécies possuem tropismo por tecidos linfóides, além de habilidades para proliferação extracelular e escape da resposta imune. Essa evasão dos mecanismos de defesa imune deve-se à capacidade da bactéria de destruir células fagocíticas, suprimir produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e inibir a ativação da resposta imune adaptativa (NAVARRO et al., 2005).

Assim como outras enterobactérias, a *Yersinia* apresenta vários fatores de virulência, que contribuem para a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, sobrevivência e disseminação no organismo. Esses fatores de virulência codificados por genes cromossômicos (*inv*, *ail*, *yst*, *irp2* e *myf*) e por genes plasmidiais (*yadA* e *yop*) promovem sua invasão e paralisam especialmente as funções do sistema complemento e a fagocitose (WUORELA e GRANFORS, 1998; CARNIEL, 2002).

Todas as cepas patogênicas albergam um plasmídeo de 70-kb, chamado pYV (Yop virulon), que é essencial para a virulência bacteriana (CORNELIS et al., 1998; HARTLAND e ROBINS-BROWNE, 1998), e permite que a mesma estabeleça seu nicho ecológico extracelularmente ou no interior de macrófagos (BOTTONE, 1997).

Este plasmídeo codifica um sofisticado sistema de secreção do tipo III (TTSS), a proteína YadA, numerosas proteínas denominadas Yops e o antígeno V (LcrV) (PERRY e FETHERSTON, 1997; CORNELIS et al., 1998).

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

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

O LcrV é secretado no meio extracelular, onde atua inibindo a inflamação, através da interação com o receptor Toll-like do tipo 2, sendo que sua atividade imunomodulatória está associada à supressão de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e indução de interleucina-10 (IL-10) (BRUBAKER, 2003).

As Yops (“*Yersinia* outer proteins”), um conjunto de onze proteínas, desempenham uma função central na virulência por permitir à bactéria evadir-se da fagocitose, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e desencadear a apoptose de fagócitos (HARTLAND e ROBINS-BROWNE, 1998; CORNELIS, 2002). São sintetizadas em meio deficiente de cálcio e na fase exponencial de crescimento a 37°C, sendo, portanto, reguladas por estímulos extracelulares de cálcio e de temperatura (BOTTONE, 1997).

A principal função das Yops é inibir a resposta imune do hospedeiro (TRÜLZSCH et al., 2005), sendo que 6 diferentes Yops são efetoras intracelulares, YopH, YpkA (chamada de YopO em *Y. enterocolitica*), YopT, YopE, YopM e YopJ (chamada de YopP em *Y. enterocolitica*) (NAVARRO et al., 2005).

Ao menos 4 Yops (YopH, YopE, YopT, YpkA/YopO) estão envolvidas com a inibição da fagocitose, por causar disfunções no citoesqueleto de leucócitos polimorfonucleares (BLISKA e BLACK, 1995; GROSDENT et al., 2002). YopH e YopE suprimem a produção de espécies reativas de oxigênio por inibir o “burst oxidativo” (BLISKA e BLACK, 1995), e também estão associadas à inibição da capacidade fagocítica de células dendríticas (ADKINS et al., 2007). YopM está associada com a depleção de células “natural killer” (NK) e modulação da expressão gênica das células infectadas do hospedeiro (SKRZYPEK et al., 2003). Por fim, a YopJ/YopP inibe o recrutamento de polimorfonucleares para os sítios de infecção (DENECKER et al., 2002), induz apoptose em macrófagos (MILLS et al., 1997; MONACK et al., 1998) e diminui a imunoestimulação das células dendríticas, suprimindo a expressão de moléculas de superfície, fundamentais na apresentação do antígeno às células T (SCHOPPET et al., 2000).

Estudos realizados *in vitro*, evidenciaram a capacidade de *Y. enterocolitica* em induzir apoptose também em células dendríticas, indicando a YopP como importante fator de indução dessas mortes (ERFURTH et al., 2004).

Kramer e Wiedig (2005), em estudo *in vitro* com uma amostra selvagem (portadora do plasmídeo de virulência) e uma amostra mutante para YopP de *Y. enterocolitica*, concluíram que a porcentagem de células dendríticas mortas após as distintas infecções, foi 50% maior nos animais inoculados com a bactéria selvagem, ou seja, aquela portadora do gene para expressão de YopP, indicando o papel dessa proteína na indução da apoptose

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

Na evolução da infecção causada por *Y. pseudotuberculosis*, o microrganismo adquirido por via oral é capturado pelas células M, localizadas no epitélio intestinal associado ao folículo (FAE) e especializadas na defesa contra patógenos. Após algumas horas, a *Yersinia* coloniza folículos linfóides conhecidos como Placas de Peyer (PP), podendo expandir-se para os linfonodos mesentéricos (MLN) (AUTENRIETH e FIRSHING, 1996). As cepas virulentas proliferam no tecido linfóide associado ao intestino e lâmina própria, onde causam destruição tecidual localizada, com formação de micro abscessos (ROBINS-BROWNE et al., 1985; TZIPORI et al., 1987). A bactéria pode também disseminar-se para o baço e fígado, causando infecção sistêmica, e podendo levar à morte do animal (MECSAS et al., 2001).

Cepas virulentas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são usualmente encontradas na forma de agregados bacterianos extracelulares, em tecidos linfóides de animais infectados por mais de 12 horas. Cepas curadas do plasmídeo de virulência são capazes de colonizar transitoriamente os linfonodos mesentéricos e os baços dos animais, entre uma a 48 horas após a infecção oral, sendo posteriormente contidas em granulomas e eliminadas (ROBINS-BROWNE et al., 1985; LIAN et al., 1987).

Estudos recentes demonstram que a colonização do baço e fígado pode ocorrer antes da replicação nos tecidos linfóides intestinais, indicando que a infecção hepatoesplênica não requer, necessariamente, a disseminação prévia da bactéria para PP e MLN (BARNES et al., 2006).

Experimentos com camundongos infectados com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*, selvagem e mutantes com deleção no gene para produção de YopH e YopE, reafirmaram a capacidade do microrganismo de produzir infecção em sítios sistêmicos. Entretanto, os resultados mostraram que as cepas mutantes não foram capazes de colonizar o

baço e fígado, ou seja, promover infecção sistêmica, sugerindo a importância desses fatores de virulência na disseminação do patógeno e evasão da resposta imune do hospedeiro (LOGSDON e MECSAS, 2006).

O controle da infecção por *Yersinia* enteropatogênica inicia-se com a primeira linha de defesa do sistema imune, envolvendo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células NK (LIAN et al., 1987; AUTENRIETH et al., 1996; KERSCHEN et al., 2004). Subseqüentemente, uma importante resposta imune adaptativa é requerida para combater a infecção (VOGEL et al., 1993; IGWE et al., 1999), sendo que a sua resolução está associada à ativação de células Th1 (AUTENRIETH e HEESEMANN, 1992; AUTENRIETH et al., 1996).

Desse modo, o balanço entre as citocinas produzidas por células Th1 e Th2 pode alterar a evolução da infecção. As respostas induzidas por células Th1 são importantes para eliminação da *Yersinia*, mediando a recuperação e imunidade à bactéria; em oposição, as respostas mediadas por células Th2 estão relacionadas com a suscetibilidade à infecção (AUTENRIETH et al., 1994; BOHN e AUTENRIETH, 1996).

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

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

Algumas citocinas, especialmente a IL-10, podem regular negativamente a resposta inflamatória. Durante a yersiniose em camundongos BALB/c, a IL-10 parece agir antagonicamente à IL-12 (BOHN e AUTENRIETH, 1996).

A modulação das respostas Th1 e Th2 está diretamente relacionada com o reconhecimento e apresentação dos antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), que induzem a diferenciação dos linfócitos, dependendo do tipo de citocina secretada (BRONTE e ZANOVELO, 2005).

Desse modo, através da apresentação de antígenos às células T e produção de diversas moléculas, macrófagos e células dendríticas orientam a resposta imune adaptativa, conduzindo para expansão e diferenciação de linfócitos específicos (BRONTE e ZANOVELO, 2005).

Os macrófagos, células do sistema fagocítico mononuclear, são caracterizados por fenótipo heterogêneo, consequência de ampla distribuição tecidual, diferenciação celular variada, resultante de adaptações aos microambientes onde residem, e responsividade a muitos estímulos endógenos e exógenos (GORDON, 2003).

São células essenciais na defesa do hospedeiro (NATHAN e HIBBS, 1991), responsáveis por iniciar a resposta imune inata contra microrganismos, através do reconhecimento de produtos microbianos denominados PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) que interagem com receptores específicos para componentes bacterianos, como os “Toll Like Receptors” (TLR) (TAYLOR et al., 2005). Os TLRs são receptores ancestrais que conferem especificidade ao sistema imune inato (MEDZHITOV e JANEWAY, 1997).

Antígenos microbianos, produtos tumorais, células T efectoras Th1 e Th2 e seus produtos secretados, influenciam a heterogeneidade e o estado de ativação das populações de macrófagos (MUNDER et al., 1998). Dependendo do padrão de ativação, alguns autores se referem aos macrófagos como células M1 ou M2.

A ativação “clássica” pode ocorrer em presença de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), após o reconhecimento de PAMPs (LPS, lipoproteínas, etc.), ou através de sinais endógenos (proteínas de choque térmico, etc.). Macrófagos ativados pela via clássica, chamados M1, em geral produzem níveis elevados de IL-12 e baixos níveis de IL-10, participando como indutores e efetores de resposta imune Th1. Estas células apresentam ainda atividades citotóxicas, resultado de sua capacidade de secretar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e superóxido) e pró-inflamatórias, com liberação de citocinas TNF, IL-1 e IL-6 (MANTOVANI et al., 2004).

A persistência do processo inflamatório frequentemente resulta em danos teciduais e ao DNA, podendo contribuir para o desenvolvimento de câncer (DE VISSER et al., 2006). Por essa razão, no decorrer da resposta imune, a inflamação deve ser combatida através do desenvolvimento de mecanismos antiinflamatórios (RAUH et al., 2005).

Mediadores distintos foram reportados como inibidores do desenvolvimento de células M1, atribuindo propriedades antiinflamatórias aos macrófagos, os quais são coletivamente designados M2, provenientes de uma ativação “alternativa”. Células M2 referem-se a várias formas de ativação de macrófagos, incluindo aquelas após exposição a IL-4 e IL-13, e também a complexos imunes, IL-10 ou glicocorticóides (GORDON, 2003). Geralmente, células M2 produzem níveis reduzidos de citocinas inflamatórias, secretam moléculas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , e induzem resposta imune Th2 (MANTOVANI et al., 2004).

A presença de macrófagos com fenótipo M2 em indivíduos saudáveis (na placenta, pulmões e sítios imunes) bem como em doenças inflamatórias crônicas (artrite reumatóide, aterosclerose), sugere que essas células exercem proteção contra danos da resposta imune, devido à elevada produção de fatores envolvidos na remodelação tecidual, aumento da atividade de fibroblastos (SONG et al., 2000) e promoção de angiogênese (KODELJA et al., 1997).

A principal via efetora de macrófagos é mediada por produção de óxido nítrico (NO) através da enzima “inducible NO synthase” (iNOS), usando L-arginina como substrato. A via metabólica alternativa utiliza arginase para converter L-arginina em L-ornitina, tendo como produto final uréia (MUNDER et al., 1999).

A iNOS é pertencente à uma família de enzimas conhecidas como NOS. Três isoformas distintas de NOS foram descritas como produto de três diferentes genes, apresentando diferenças na localização intracelular, regulação e propriedades catalíticas. NOS1 (também denominada nNOS) é prevalente em neurônios; NOS2 (conhecida com iNOS) está presente em várias células do sistema imune; e NOS3 (também chamada eNOS) é encontrada em células endoteliais (BRONTE e ZANOVELO, 2005).

Anfíbios e mamíferos expressam duas isoformas de arginase, I e II. Ambas isoformas catalisam a mesma reação, com uréia como produto final. Contudo, são codificadas por diferentes genes, além de possuírem diferentes distribuições celulares (JENKINSON et al., 1996). Arginase I é uma enzima citosólica, expressa exclusivamente no fígado (KANYO et al., 1996). Arginase II é mitocondrial, distribuída em vários tecidos, principalmente rim, glândulas mamárias, próstata, intestino e cérebro (JENKINSON et al., 1996).

A regulação do balanço iNOS/arginase por mediadores Th1, como IFN- $\gamma$  e LPS, e por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, sugere que a análise do nível de NO e atividade da arginase em populações distintas de macrófagos refletem seu estado de ativação (BRONTE e ZANOVELLO, 2005). Contudo, LPS, comumente conhecido como indutor de citocinas Th1, pode ativar a expressão de ambos, arginase e iNOS, em macrófagos e outras células imunes (MILLS et al., 2000; BRONTE et al., 2003).

Ao contrário da iNOS, pouco é conhecido sobre a regulação e função das arginases no sistema imune. Acredita-se que a arginase participe da regulação da síntese de NO por competição pelo substrato. Outras funções incluem envolvimento em processos de reparação e remodelação tecidual e ações antiinflamatórias (JENKINSON et al., 1996).

As células dendríticas são outro grupo de APCs, encontradas em quase todos os tecidos periféricos, bem como em órgãos linfóides primários (timo e medula óssea) e secundários

(linfonodos, PP e baço) (GUERMONPREZ et al., 2002). Desempenham papéis importantes em toda a resposta imune, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, como liberação de IFNs do tipo I no combate à invasão e replicação viral, regulação da resposta Th e apresentação de antígenos às células T (PULENDRAN, 2005).

As células dendríticas humanas são leucócitos derivados de células progenitoras da medula óssea, originadas de 2 linhagens, mielóide e linfóide (BANCHEREAU et al., 2000; SHORTMAN e LIU, 2002). Células dendríticas derivadas de linhagens distintas diferem na sua distribuição tecidual, produção de citocinas e condições de crescimento (ADAMS et al., 2005).

A linhagem mielóide, caracterizada por expressar CD11c e pouco CD123, dá origem às DCs convencionais ou “mielóides”, compostas por: células de Langerhans (LCs), células dendríticas intersticiais (IDCs) e células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (SZABOLCS et al., 1996; GATTI et al., 2000). As moDCs podem ser encontradas em órgãos linfóides periféricos e na circulação sanguínea, onde produzem grandes quantidades de TNF- $\alpha$  em resposta a patógenos e outras causas de inflamação (ROSSI e YOUNG, 2005).

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

Células dendríticas “mielóides” são ainda subdivididas em sub-populações, porém informações precisas sobre as funções de cada sub-população são obscuras (HEATH et al., 2004). No baço murino duas principais populações de células dendríticas podem ser encontradas, CD11c<sup>+</sup> CD8- $\alpha$ <sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>. As distintas sub-populações diferem na produção de citocinas, sendo que células CD11b<sup>+</sup> secretam maiores quantidades de IL-12 (MALDONADO-LOPEZ et al., 2001), capacidade de capturar células apoptóticas e apresentação cruzada de antígenos, onde peptídeos derivados de antígenos exógenos associam-se a moléculas de MHC de classe I (JUNG et al., 2002; HEATH et al., 2004).

A linhagem linfóide, por sua vez, é precursora das células dendríticas plasmocitóides, reconhecidas por serem CD11c<sup>-</sup> e possuírem elevada expressão de CD123 (GROUARD et al., 1997). Células dendríticas plasmocitóides são células importantes na imunidade inata antiviral e na autoimunidade. Encontradas no sangue e órgãos linfóides, são células produtoras de IFNs  $\alpha$  e podem estar associadas a respostas imunes anti-tumorais (ADAMS et al., 2005).

Quando expostas aos produtos microbianos, as células dendríticas sofrem maturação e migram para órgãos linfóides secundários, locais de ativação de células T (NIESS e REINECKER, 2006).



Células dendríticas utilizam diversos mecanismos para capturar os antígenos: fagocitose, endocitose, pinocitose e interação com receptores específicos. As proteínas dos antígenos são processadas em peptídeos e apresentadas na superfície celular ligadas a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I ou II, onde serão reconhecidas por células T antígeno-específicas (ADAMS et al., 2005). Antígenos adquiridos no ambiente extracelular são tipicamente processados e apresentados associados às moléculas de MHC de classe II, enquanto moléculas de MHC de classe I associam-se a antígenos presentes no compartimento citosólico (GUERMONPREZ et al., 2003; HOUDE et al., 2003; ACKERMAN et al., 2005).

O processo de maturação das DCs estimula numerosas propriedades imunogênicas, como expressão de moléculas co-estimuladoras, secreção de citocinas e apresentação de antígenos (SCANDELLA et al., 2002; MAILLIARD et al., 2004), que maximizam sua habilidade em produzir ativação e proliferação de linfócitos T (GRANUCCI et al., 2005). Em contraste, na ausência de inflamação, as células mantêm-se no estágio imaturo, não sendo capazes de ativar efetivamente as células T, promovendo a proliferação abortiva ou anergia dos linfócitos T, mecanismo responsável pelo estabelecimento da tolerância periférica (STEINMAN et al., 2003).

Produtos microbianos constituem uma forma fisiológica de ativação das células dendríticas mielóides e plasmocitóides (JARROSSAY et al., 2001; KADOWAKI et al., 2001). Assim como os macrófagos, as células dendríticas expressam receptores de reconhecimento de padrões que interagem com produtos microbianos e moléculas do tecido hospedeiro lesado (ROSSI e YOUNG, 2005). Dentre esses receptores estão os TRLs (QI et al., 2003). A interação com os diferentes ligantes de TLRs, estimula a maturação das células dendríticas e induz a secreção de citocinas, modulando o balanço Th1/Th2 de acordo com as interações microbianas (REIS E SOUSA et al., 1999; MOSER e MURPHY, 2000). Tal indução é conduzida, pelo menos em parte, pela secreção de IL-10 ou IL-12 (LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2001), sendo que IL-10 estimula respostas Th2 e IL-12 induz células Th1, produtoras de IFN-  $\gamma$  (TRINCHIERI, 1995).

Outro grupo de receptores de reconhecimento de padrões expressos por células dendríticas, é constituído pelos receptores de lectina tipo C, os quais interagem com carboidratos de glicoproteínas de antígenos próprios e alguns patógenos, que exploram essa interação para evadir da ativação imune. Células dendríticas residentes ou não ativadas expressam estes receptores, enquanto células dendríticas ativadas e maduras têm baixa expressão de receptores de lectina tipo C (EBNER et al., 2004).

Desse modo, TLRs e receptores de lectina tipo C trabalham para balancear tolerância imunológica e ativação celular (HAWIGER et al., 2001; LIU et al., 2002).

Células dendríticas murinas, seguindo o exemplo dos macrófagos, são capazes de metabolizar arginina através de duas vias, envolvendo as enzimas iNOS ou arginase (MUNDER et al., 1999), sendo que a produção de NO a partir de arginina, catalisada pela enzima iNOS, é uma das importantes vias efetoras utilizadas pelo sistema imune (KROENCKE et al., 1995; ADLER et al., 1997).

Estudos de Munder et al. (1999), demonstraram que citocinas produzidas por células Th1 e Th2 influenciam o balanço do metabolismo de arginina pelas diferentes vias. Observou-se que a atividade da arginase foi aumentada por citocinas Th2 (IL-4, IL-10), enquanto citocinas Th1 induziram iNOS.

Estudos prévios indicam que a infecção por *Yersinia* pode ter como alvo macrófagos e células dendríticas, o que contribuiria para uma diminuição dos mecanismos efetores do sistema imune contra a bactéria. Macrófagos infectados por *Yersinia* apresentam uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (BLISKA e BLACK, 1995) e de TNF- $\alpha$  em cultura (PALMER et al., 1998). Além disso, foi observado que a infecção ocasionada por esta bactéria também determina a apoptose dos macrófagos (MILLS et al., 1997; MONACK et al., 1998).

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

Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos de produção de IL-10 e IL-12 na yersiniose, e se as diferenças nos padrões de ativação de macrófagos e células dendríticas podem influenciar na suscetibilidade e resistência à infecção com amostras patogênicas de *Yersinia*.

O presente trabalho analisou o papel de macrófagos e células dendríticas na evolução da infecção por *Y. pseudotuberculosis*, em camundongos suscetíveis e resistentes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar a influência da infecção por *Y. pseudotuberculosis* sobre o comportamento de macrófagos e células dendríticas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar a via de metabolização da arginina utilizada por macrófagos e células dendríticas de animais infectados.
- Analisar a secreção de citocinas (IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) por macrófagos.
- Analisar a secreção de citocinas (IL-4, IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ ) por células dendríticas.
- Investigar a capacidade de apresentação de antígenos de macrófagos e células dendríticas dos animais infectados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6, SPF (“Specif Pathogen Free”), com idade entre 6 e 8 semanas, adquiridas do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP).

Após a retirada das condições originais (SPF), os animais foram transportados em mini-isoladores e alojados no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, onde foram mantidos em isoladores, com acesso à ração e água esterilizadas em autoclave a 120°C por 15 minutos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp, parecer nº35/2006.

#### 3.2 Amostra bacteriana

*Yersinia pseudotuberculosis* YpIII pIB1, portadora de plasmídeo de virulência. A amostra foi cedida gentilmente pelo Dr. Hans Wolf-Watz do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Umea, Suécia, e estocada a -80°C, em TSB (Tryptic Soy Broth) e glicerol.

#### 3.3 Infecção experimental dos animais

##### 3.3.1 Reativação da amostra de *Yersinia pseudotuberculosis*

Previamente à inoculação dos animais, a amostra bacteriana foi reativada através da passagem em camundongos.

Para tanto, uma alçada da amostra em estoque foi semeada em meio TSB, incubada a 25°C por 24 horas e, posteriormente, plaqueada em meio BAB (“Blood Agar Base”) e incubada novamente a 25°C durante 48 horas, para a obtenção de crescimento bacteriano e preparo de uma suspensão contendo 10<sup>10</sup> UFC/mL, padronizada em escala 3 de Mac Farland e apresentando densidade ótica igual a 0,36 em 550 nm, ajustada com auxílio de espectrofotômetro (Du<sup>R</sup> 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer – BECKMAN). A partir dessa suspensão, foi preparada a dose (10<sup>8</sup> UFC/mL) para inoculação de 2 camundongos por via intravenosa com 0,2 mL de suspensão bacteriana. Decorrido um período de 24 horas da

inoculação, os animais foram sacrificados, seus baços retirados e macerados em 1 mL de solução estéril de NaCl 0,85%. O produto resultante dessa maceração foi semeado em meio de cultura BAB e incubado a 25°C por 48 horas. A partir deste crescimento foi preparado o inóculo para os experimentos.

### **3.3.2 Preparo do inóculo**

Após a reativação da amostra bacteriana, foi preparado o inóculo utilizado na infecção dos animais. A partir do crescimento bacteriano, resultante do plaqueamento do baço, preparou-se uma diluição em solução estéril de NaCl 0,85%, cuja densidade óptica foi ajustada em 0,36 a 550 nm, suficiente para promover um crescimento bacteriano de  $10^{10}$  UFC/mL. A partir dessa suspensão “mãe” preparou-se aquela que foi utilizada para inoculação dos animais ( $10^7$  UFC/mL). Para confirmação da dose utilizada no inóculo, 0,1 mL da suspensão contendo  $10^4$  UFC/mL foi plaqueada em meio de cultura BAB, a fim de se proceder a contagem do número de colônias.

### **3.3.3 Esquema de infecção**

Para realização das análises com macrófagos, lotes de 16 animais por grupo de experimento foram infectados com amostra de *Yersinia pseudotuberculosis*. Nos experimentos utilizando células dendríticas, lotes de 30 animais foram infectados com amostra de *Yersinia pseudotuberculosis*. Em todos os experimentos manteve-se o mesmo número de animais não infectados como controle.

A inoculação foi realizada por via intragástrica, utilizando-se sonda gástrica de polietileno e volume de 0,25 mL de suspensão bacteriana por camundongo. Grupos de animais infectados e controles foram sacrificados e o exsudato peritoneal ou os baços foram obtidos (em condições assépticas) em 12 horas, 1º, 3º e 5º dias após a infecção, e as respectivas suspensões celulares de macrófagos, células dendríticas e linfócitos, preparadas como descrito a seguir.

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

A amostra bacteriana foi cultivada como descrito anteriormente, morta pelo calor através de incubação a 60°C por 1 hora, coletada por centrifugação, lavada duas vezes com PBS (“Phosphate-Buffered Saline”), pH 7,2, e ressuspendida no mesmo. Esta suspensão bacteriana foi congelada e posteriormente liofilizada para que, na forma de pó, fosse possível a sua utilização na concentração adequada, 10 µg de liofilizado/mL.

### 3.5 Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos infectados e controles foram previamente inoculados com 3mL de Tioglicolato 3% por via intraperitoneal, com a finalidade de estimular os macrófagos desta cavidade. Após 3 dias de estímulo, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e posteriormente exposta a cavidade peritoneal. As células peritoneais foram coletadas por meio de injeção de 5 mL de PBS, pH 7,2 estéril, gelado, seguido de massagem peritoneal. As células obtidas foram então lavadas duas vezes por centrifugação a 200 g por 5 minutos a 4°C, e a seguir ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640, para contagem em câmara de Neubauer, realizada através da coloração com Líquido de Lazarus.

Após a contagem, ajustou-se a concentração em  $5 \times 10^6$  células/mL e as mesmas foram distribuídas em placas de 48 cavidades. As placas, contendo 500 µL de células por cavidade, foram incubadas durante 1 hora em estufa a 37°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, para aderência das células. As células não aderentes foram removidas por inversão brusca da placa e as aderentes foram cultivadas por 48 horas, nas mesmas condições de temperatura, tensão de CO<sub>2</sub>, e na presença de 10 µg/mL de LPS (*Escherichia coli* O111B4 – Sigma), ou 10 µg/mL de HKY, ou mesmo na presença apenas de RPMI-1640.

O RPMI-1640 utilizado durante todo o processo foi suplementado com L-glutamina 2 mM, 2-Mercaptoetanol  $5 \times 10^{-2}$  M, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), e 10% de soro fetal bovino (“Fetal Bovine Serum” – FBS), sendo denominado RPMI-1640 suplementado.

Após a cultura dos macrófagos, foi realizada centrifugação da placa a 800g por 10 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi imediatamente utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO). Outra parte foi coletada e armazenada a -80°C para posterior determinação das citocinas secretadas (IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), através da técnica de ELISA. Por fim, no lisado de macrófagos foi realizada a determinação da atividade da arginase.

### 3.6 Obtenção e enriquecimento das células dendríticas

Células dendríticas foram obtidas do baço de animais infectados e controles.

Após o sacrifício dos camundongos em câmara de CO<sub>2</sub>, os baços foram removidos e incubados por 30 minutos em RPMI-1640 suplementado, descrito no item 3.5, contendo 1 mg/mL de colagenase (tipo IA – Sigma). A seguir, foram macerados para a liberação das células. Suspensões celulares constituídas de um “pool” de células de 3 animais foram lavadas

duas vezes através de centrifugação a 200 g durante 10 minutos. Os sedimentos foram ressuspendidos em 5 mL de cloreto de amônio 0,83% e 1 mL de FBS e deixados em repouso por cinco minutos, à temperatura ambiente, a fim de se promover a lise de hemácias. A seguir, as células foram lavadas 2 vezes com tampão A (PBS + 5% FBS + 5mM EDTA), através de centrifugação a 200 g durante 10 minutos, e ressuspendidas em solução de BSA (densidade de 1,08 g/mL – Sigma), sendo centrifugadas por 40 minutos, 250 g, 4°C. Após a coleta das células da camada intermediária formada, estas foram lavadas, ressuspendidas em tampão A e sua concentração foi ajustada para que não excedesse  $10^8$  céls/mL.

As suspensões celulares foram incubadas com Fcblock (BD PharMingen), por 15min, 4°C, lavadas e ressuspendidas em tampão A. Em seguida, procedeu-se à purificação das células dendríticas utilizando MicroBeads CD11c (Miltenyi Biotec), conforme as instruções do fabricante.

As células dendríticas obtidas foram cultivadas por 48 horas, em estufa a 37°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, e na presença de 10 µg/mL de LPS (*Escherichia coli* O111B4 – Sigma), ou 10 µg/mL de HKY, ou mesmo na presença apenas de RPMI-1640.

Após a cultura, foi realizada centrifugação da placa a 800 g por 10 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi imediatamente utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO). Outra parte foi coletada e armazenada a -80°C para posterior determinação das citocinas secretadas (IL-4, IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ ), através da técnica de ELISA. Por fim, no lisado de células dendríticas foi realizada a determinação da atividade da arginase.

### **3.7 Imunofenotipagem de células dendríticas**

Para verificação do rendimento após o processo de purificação, as células dendríticas foram marcadas por 30 minutos em gelo com anticorpo monoclonal anti-CD11c-FITC (BD PharMingen). Da mesma maneira, as células foram marcadas com anti-I-A/I-E-PE (BD PharMingen) a fim de se analisar a expressão de moléculas de MHC de classe II, e com anti-CD11b-PE e anti-CD8- $\alpha$ -PECy<sub>7</sub> (BD PharMingen) para determinação das sub-populações. Todas as amostras foram analisadas através de citometria de fluxo em Citômetro BD FACS-Canto (BD Biosciences).

### 3.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A dosagem de NO foi realizada utilizando-se uma alíquota do sobrenadante de cultura de macrófagos e células dendríticas.

A avaliação foi realizada mensurando-se a concentração de nitrito acumulado (produto estável da degradação do NO), com utilização do reagente de Griess, conforme o método de Green et al. (1982). Para tal, 50 µL do meio de cultura foi incubado com igual volume de reagente de Griess (sulfanilamida 1%, naftilenodiamina dihidrocloro 0,1% em 5% de ácido fosfórico) por 10 minutos, à temperatura ambiente. As absorvâncias foram medidas a 550 nm em leitor de ELISA (Microplate Reader-Model 550-BIORAD). As concentrações de nitrito foram obtidas a partir de uma curva padrão previamente preparada com concentrações molares conhecidas de NaNO<sub>2</sub>. Os valores foram expressos em µmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/2,5x10<sup>6</sup> células.

### 3.9 Determinação da atividade da arginase

A mensuração da uréia foi realizada mediante a observação de ocorrência da reação de hidrólise de L-arginina pela enzima arginase, em lisado de células (CORRALIZA et al., 1994).

As células obtidas após a cultura foram lisadas com 100 µL de Triton X-100 0,1%. Após 30 minutos sobre um agitador, foram adicionados 100µL de Tris-HCl 25 Mm. e 100 µL de MnCl<sub>2</sub> 100 mM, e incubados por 10 minutos a 56°C, para ativação da enzima. A hidrólise da L-arginina foi conduzida por incubação de 100 µL do lisado com 100 µL de L-arginina 0,5 M (pH 9,7) a 37°C por 60 minutos. A reação foi paralisada com 900 µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) e H<sub>2</sub>O, na proporção 1:3:7. A concentração de uréia foi mensurada a 540 nm, após adição de 40 µL de α-isonitrosopropiofenona 9% (Sigma), dissolvido em etanol 100%, seguido de incubação a 95°C por 30 minutos.

Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de uréia por minuto.

### 3.10 Determinação da produção de citocinas por ELISA.

Para o estudo dos efeitos da infecção dos camundongos com *Y. pseudotuberculosis* sobre a secreção de citocinas por macrófagos e células dendríticas, as células foram cultivadas como descrito anteriormente e os sobrenadantes coletados após 48 horas de incubação para determinação de IL-12 (p70), IL-10, TNF-α e TGF-β, para macrófagos e de IL-4, IL-12 (p70),



IL-10, TNF- $\alpha$  para células dendríticas, utilizando kits comerciais (OptEIA ELISA set, BD PharMingen).

As microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram adsorvidas com um anticorpo de captura de cada respectiva citocina pesquisada e incubadas “overnight” à 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS com 0,05% Tween-20 e bloqueadas com 200  $\mu$ l de PBS com 10% de FBS, pH7,0 à temperatura ambiente por 1 hora, e novamente lavadas 3 vezes. Foram adicionados à placa 100  $\mu$ l de cada citocina padrão ou do sobrenadante teste. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas, e lavadas 5 vezes. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ l/cavidade do Detector de Trabalho (Anticorpo de Detecção + Reagente Enzimático) em cada cavidade. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e lavadas 7 vezes. Foram, então, adicionados 100  $\mu$ l do substrato (10mM de tampão citratofosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50  $\mu$ l de Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N)

A absorbância foi lida a 450nm em leitor de ELISA (Microplate Reader-Model 550-BIORAD), e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas.

### **3.11 Avaliação da capacidade de apresentação de antígenos dos macrófagos**

#### **3.11.1 Imunização de camundongos com KHY para obtenção dos linfócitos T antígeno-específicos**

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram inoculados por via intraperitoneal com 10  $\mu$ g de KHY misturados com 1 mg de hidróxido de alumínio em solução salina 0,15 M. Decorridos 14 dias, os camundongos receberam uma segunda dose de 10  $\mu$ g do antígeno em solução salina. A partir de 7 dias após a 2<sup>a</sup> inoculação, os linfócitos T destes animais foram isolados e utilizados no co-cultivo com macrófagos e células dendríticas.

#### **3.11.2 Obtenção e enriquecimento dos linfócitos T**

Camundongos imunizados com antígeno de *Y. pseudotuberculosis* foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. O baço de cada animal foi retirado em condições assépticas e transportado para uma placa de Petri pequena, contendo 5 mL de PBS, pH 7,2, gelado. A seguir os baços foram macerados cuidadosamente para liberação das células. A suspensão celular obtida foi transferida para tubos cônicos de polietileno, graduados, lavada 2 vezes por centrifugação a 200 g por 10 min. As células foram ressuspendidas em 5 mL de cloreto de amônio 0,83% e 1 mL de

FBS e deixadas em repouso por cinco minutos, afim de se promover a lise das hemácias. Foi então realizada nova centrifugação, e as células foram ressuspensas em 5 mL de RPMI-1640 suplementado, para se efetuar a terceira lavagem.

Após esta lavagem, os linfócitos T foram purificados utilizando o kit de isolamento Pan T Cell (Miltenyi Biotec), de acordo com as instruções do fabricante.

Os linfócitos T antígeno-específicos serviram como sensores para a eficácia da apresentação de antígenos pelos macrófagos e células dendríticas.

### **3.11.3 Viabilidade dos linfócitos**

A viabilidade dos linfócitos foi avaliada através da técnica de exclusão com Azul Trypan 0,2%. Em um volume desta solução foi adicionado um volume da suspensão celular, na diluição apropriada, e as células viáveis contadas em Câmara de Neubauer.

### **3.11.4 Co-cultivo das células apresentadoras de antígeno (macrófagos ou células dendríticas) e linfócitos**

Células T provenientes dos animais imunizados com HKY foram colocadas em placas de 96 cavidades, na densidade de  $5 \times 10^5$  células/cavidade, e co-cultivadas com  $2 \times 10^4$  células (macrófagos ou células dendríticas)/cavidade provenientes dos camundongos infectados e controles, na presença de 10  $\mu\text{g/mL}$  de antígeno de *Yersinia* (HKY). Após 4 dias, foi realizada a medida da proliferação celular através de um ensaio colorimétrico do MTT [brometo 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólio], desenvolvido por Mosmann (1983). O MTT (Sigma) foi adicionado às culturas, em uma concentração de 5 mg/mL, e incubado por 4 horas adicionais. A redução do sal tetrazólio pelas células vivas, forma um produto formazana, insolúvel e azul. Posteriormente as placas foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm.

### **3.12 Análise estatística**

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

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Dosagem de Óxido Nítrico em cultura de macrófagos

A determinação de NO foi realizada em sobrenadante de cultura (48 horas) de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS, e somente meio RPMI.

Macrófagos de camundongos C57BL/6 controles estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, produziram quantidade significativamente maior de NO que camundongos BALB/c. Nos camundongos C57BL/6 infectados, a produção de NO foi significativamente maior que nos camundongos BALB/c durante todo o período de infecção, nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo (Tabela 1).

Analisando a produção de NO por camundongos BALB/c no decorrer da infecção, observou-se que ocorreu uma diminuição significativa em 12 horas e no 1º dia pós-infecção nos macrófagos estimulados com HKY e LPS. No 3º dia pós-infecção, macrófagos apresentaram aumento na produção de NO comparado aos resultados do início da cinética, porém a elevação foi significativa apenas nas células não estimuladas. No 5º dia pós-infecção, observou-se aumento significativo na produção de NO por macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo (Figura 1).

Nos camundongos C57BL/6, a infecção levou, no 1º dia pós-infecção, à diminuição significativa na produção de NO nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo. No 3º dia pós-infecção, macrófagos apresentaram aumento na produção de NO, significativo apenas nas células não estimuladas, seguido de aumento significativo no 5º dia pós-infecção nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo (Figura 1).

De maneira geral, macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6, apresentaram uma diminuição na produção de NO no início da infecção, sendo esta mais acentuada nos camundongos BALB/c. No 3º e 5º dias pós-infecção ocorreu aumento na produção de NO, com maior elevação nos camundongos C57BL/6.

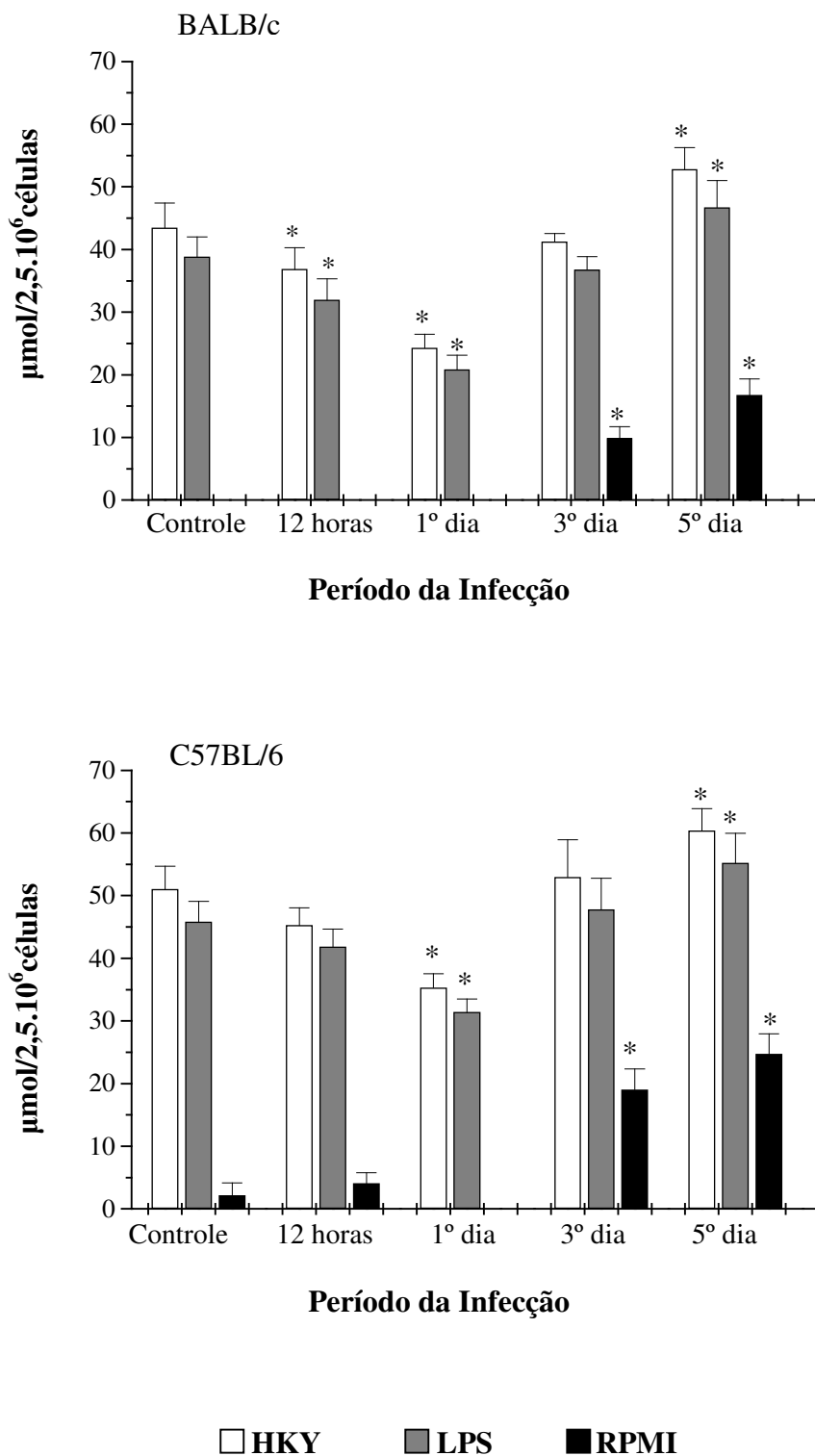
**Tabela 1** – Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Concentração de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μmol/2,5.10 <sup>6</sup> células)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/c</b>	HKY	43,47 ± 3,93 <sup>♦</sup>	36,86 ± 3,39 <sup>*♦</sup>	24,33 ± 2,13 <sup>*♦</sup>	41,29 ± 1,26 <sup>♦</sup>	52,80 ± 3,47 <sup>*♦</sup>
	LPS	38,83 ± 3,17 <sup>♦</sup>	31,98 ± 3,32 <sup>*♦</sup>	20,88 ± 2,23 <sup>*♦</sup>	36,78 ± 2,11 <sup>♦</sup>	46,73 ± 4,27 <sup>*♦</sup>
	RPMI	0 <sup>♦</sup>	0 <sup>♦</sup>	0	9,89 ± 1,84 <sup>*♦</sup>	16,76 ± 2,57 <sup>*♦</sup>
<b>C57BL/6</b>	HKY	51,05 ± 3,67	45,28 ± 2,78	35,30 ± 2,22 <sup>*</sup>	52,97 ± 5,93	60,39 ± 3,05 <sup>*</sup>
	LPS	45,86 ± 3,23	41,85 ± 2,81	31,40 ± 2,10 <sup>*</sup>	47,79 ± 4,98	55,22 ± 4,09 <sup>*</sup>
	RPMI	2,19 ± 1,98	4,07 ± 1,70	0 <sup>*</sup>	19,04 ± 3,28 <sup>*</sup>	24,73 ± 3,24 <sup>*</sup>

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

♦ p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/c com a linhagem C57BL/6



**Figura 1** – Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Determinação da atividade da arginase em lisado de macrófagos

A determinação da atividade da arginase foi realizada em lisado de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS e somente meio RPMI.

Macrófagos de camundongos BALB/c controles, estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, apresentaram atividade de arginase significativamente maior que camundongos C57BL/6. Nos camundongos BALB/c infectados, a atividade da arginase foi significativamente maior que nos camundongos BALB/c durante todo o período de infecção, exceto em 12 horas pós-infecção, nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo (Tabela 2).

No decorrer da infecção, ocorreu um aumento significativo na atividade da arginase nos macrófagos de camundongos BALB/c estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, obtidos em 12 horas e 1º dia pós-infecção. No 3º dia pós-infecção, observou-se uma diminuição na atividade da arginase comparado aos resultados anteriores, contudo ainda mantendo-se significativamente elevada em relação ao grupo controle. No 5º dia da infecção, macrófagos estimulados com HKY não apresentaram alteração significativa na atividade da arginase, enquanto as células estimuladas com LPS e sem estímulo mantiveram uma produção significativamente elevada (Figura 2).

De modo semelhante, nos camundongos C57BL/6, a infecção produziu um aumento significativo na atividade da arginase nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, obtidos em 12 horas e 1º dia pós-infecção. No 3º dia pós-infecção, observou-se uma diminuição na atividade da arginase comparado aos resultados do início da infecção, contudo ainda mantendo-se significativamente elevada. No 5º dia pós-infecção, macrófagos estimulados com HKY e LPS apresentaram diminuição significativa na atividade da arginase (Figura 2).

Analisando de maneira geral, macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6, apresentaram aumento da atividade da arginase no início da infecção, com maior elevação no 1º dia pós-infecção, sendo mais precoce e acentuado nos camundongos BALB/c, seguido de progressiva diminuição nos 3º e 5º dias pós-infecção, com atividades significativamente menores nos camundongos C57BL/6.

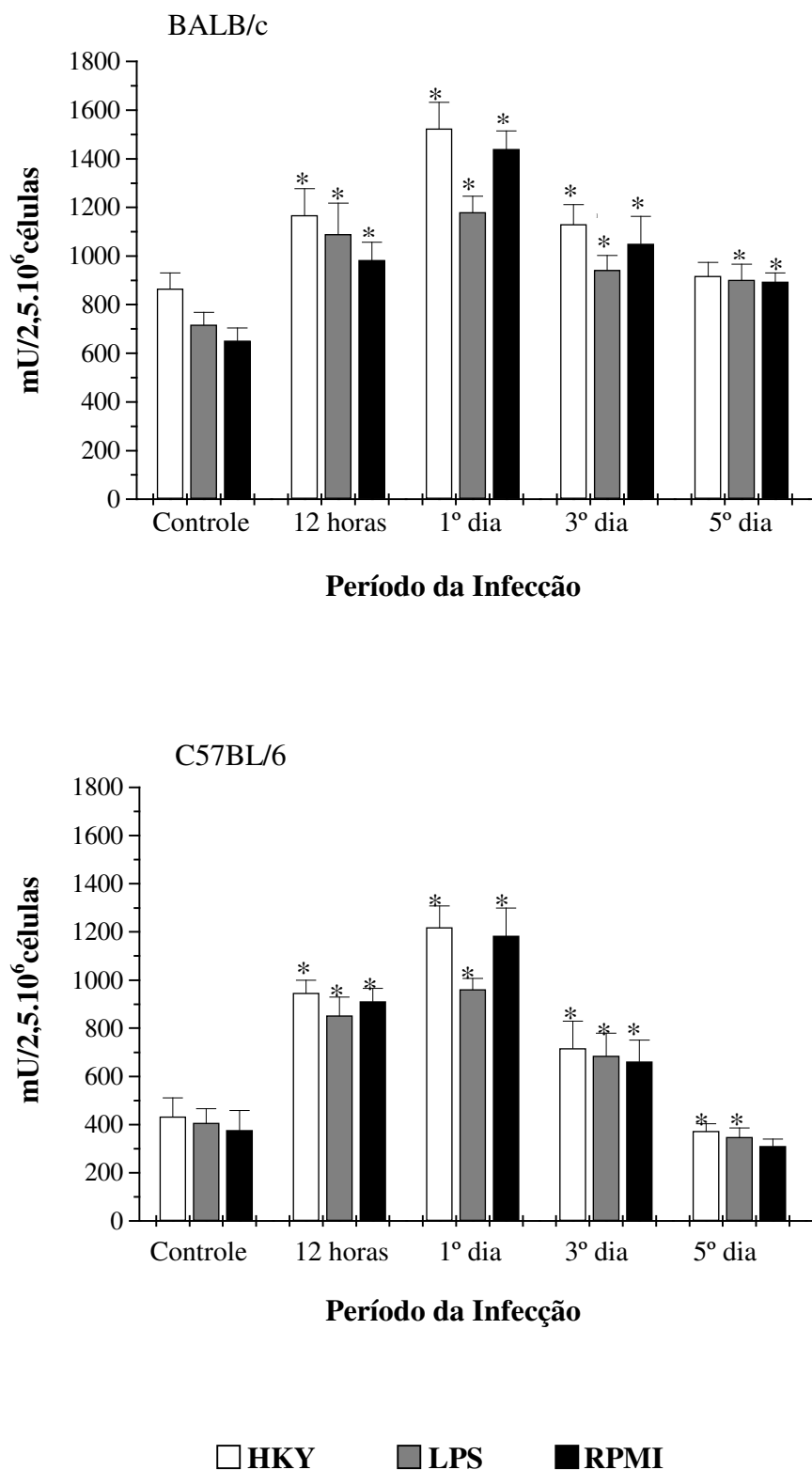
**Tabela 2** – Atividade da enzima arginase em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Atividade da arginase (mU/2,5.10 <sup>6</sup> células)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	865,75 ± 64,38 <sup>♦</sup>	1167,33 ± 109,55*	1524,67 ± 106,88 <sup>♦</sup>	1130,25 ± 81,34 <sup>♦</sup>	918,5 ± 55,00 <sup>♦</sup>
	LPS	717,5 ± 50,48 <sup>♦</sup>	1089,67 ± 127,61*	1180,33 ± 65,03 <sup>♦</sup>	942,5 ± 59,96 <sup>♦</sup>	901,25 ± 65,53 <sup>♦</sup>
	RPMI	652,00 ± 51,34 <sup>♦</sup>	983,33 ± 73,82*	1440,00 ± 73,99 <sup>♦</sup>	1050 ± 113,45 <sup>♦</sup>	895,25 ± 35,16 <sup>♦</sup>
<b>C57BL/6</b>	HKY	433,25 ± 77,27	946,33 ± 53,50*	1218,67 ± 89,81*	717,25 ± 111,92*	372,75 ± 30,84*
	LPS	406,75 ± 58,35	852,33 ± 77,78*	962,00 ± 45,13*	685,75 ± 93,49*	348,25 ± 38,01*
	RPMI	376,75 ± 82,29	911,67 ± 54,12*	1184,33 ± 114,07*	661,75 ± 88,95*	310,75 ± 28,72

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

♦ p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/c com a linhagem C57BL/6



**Figura 2** – Atividade da enzima arginase em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\*  $p < 0,05$ ).



### 4.3 Determinação de IL-10 em cultura de macrófagos

A dosagem de IL-10 foi realizada em sobrenadante de cultura (48 horas) de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS, e somente meio RPMI.

Macrófagos de camundongos BALB/c controles estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, produziram quantidade significativamente maior de IL-10 que camundongos C57BL/6, resultado reproduzido durante todo o período de infecção (Tabela 3).

No decorrer da infecção, verificou-se uma elevação significativa na produção de IL-10 por macrófagos de camundongos BALB/c, observada em 12 horas e 1º dia pós-infecção, com maior aumento no 1º dia nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo. A partir do 3º dia pós-infecção, a liberação da citocina apresentou queda, sendo que a menor concentração significativa foi obtida no 5º dia da infecção, nas células estimuladas com HKY, LPS e sem estímulo (Figura 3).

Analisando a produção de IL-10 pelos macrófagos dos camundongos C57BL/6 infectados, observou-se que não ocorreu alteração significativa em 12 horas pós-infecção, seguido de aumento significativo no 1º dia, nos macrófagos estimulados com HKY e LPS. A partir do 3º dia da infecção, verificou-se diminuição na concentração da citocina, com queda significativa no 5º dia pós-infecção, nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo (Figura 3).

De modo geral, macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram uma elevação na produção de IL-10 no início da infecção, mais predominante nos camundongos BALB/c, seguido de diminuição no 5º dia pós-infecção, com menores concentrações na linhagem C57BL/6.

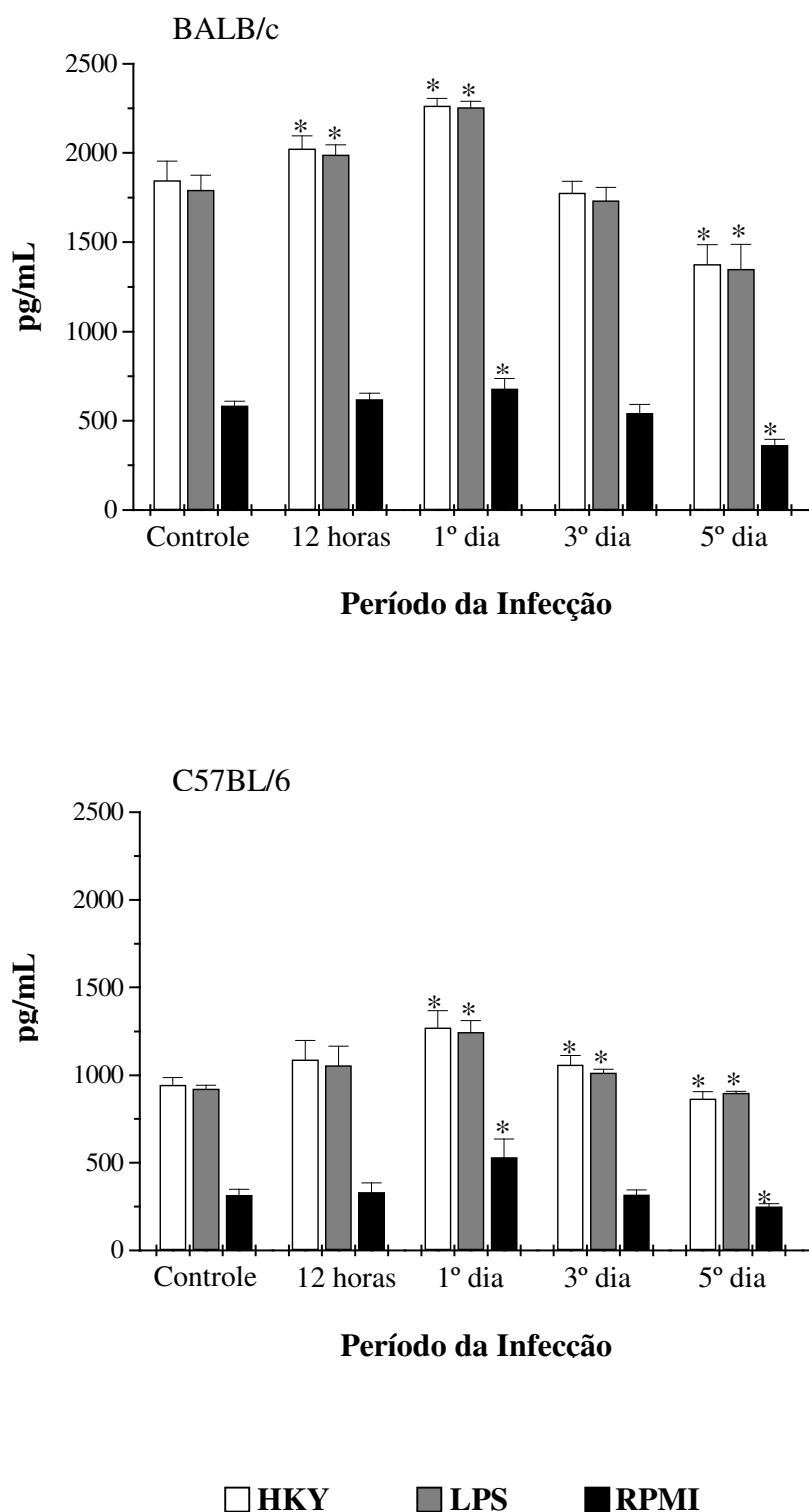
**Tabela 3** – Produção de IL-10 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Concentração de IL-10 (pg/mL)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	1846,43 ± 108,82♦	2024,47 ± 71,08*♦	2263,57 ± 42,05*♦	1775,00 ± 66,44♦	1375,36 ± 110,88*♦
	LPS	1791,43 ± 84,34♦	1988,93 ± 56,19*♦	2255,54 ± 34,72*♦	1733,22 ± 74,96♦	1350,36 ± 137,55*♦
	RPMI	584,52 ± 24,76♦	619,76 ± 35,46♦	679,82 ± 57,84*♦	543,04 ± 48,56♦	364,64 ± 31,73*♦
<b>C57BL/6</b>	HKY	943,57 ± 43,49	1088,09 ± 109,77	1271,43± 96,08*	1058,40 ± 54,59*	855,48 ± 39,53*
	LPS	921,19 ± 21,12	1055,47 ± 108,58	1244,64 ± 67,32*	1014,22 ± 19,39*	867,14 ± 10,53*
	RPMI	315,72 ± 34,37	331,43 ± 52,67	530,54 ± 105,39*	317,18 ± 26,90	249,05 ± 18,24*

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

♦ p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/c com a linhagem C57BL/6



**Figura 3** – Produção de IL-10 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.4 Determinação de IL-12 em cultura de macrófagos

A concentração de IL-12 foi determinada por dosagem da citocina em sobrenadante de cultura (48 horas) de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS, e somente meio RPMI.

Macrófagos de camundongos C57BL/6 controles estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, produziram quantidade significativamente maior de IL-12 que camundongos BALB/c, resultado observado durante todo o período de infecção (Tabela 4).

Analisando a produção de IL-12 durante a infecção, observou-se comportamento semelhante dos macrófagos das duas linhagens quanto à liberação da citocina.

Em 12 horas após a infecção, não foi constatada alteração significativa nas concentrações de IL-12 em ambos os camundongos. Verificou-se diminuição significativa no 1º dia da infecção, nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo. As concentrações apresentaram aumento significativo no 3º e 5º dias pós-infecção, com maior elevação no último dia da cinética, nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, tanto em camundongos BALB/c quanto C57BL/6 (Figura 4).

Em resumo, macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram uma diminuição na produção de IL-12 no início da infecção, mais predominante nos camundongos BALB/c, seguido de elevação no 3º e 5º dias pós-infecção, com valores mais acentuados para linhagem C57BL/6.

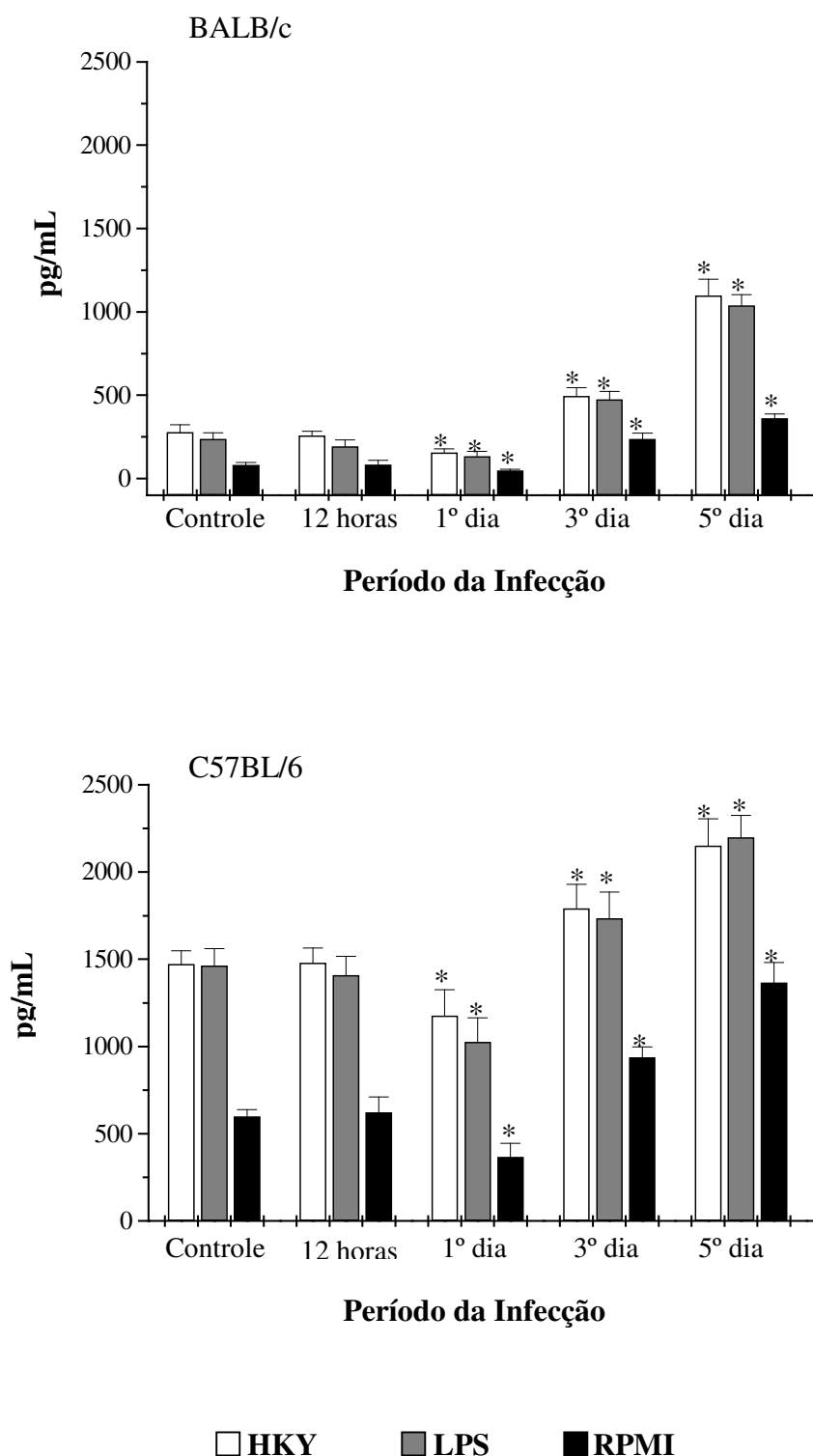
**Tabela 4** – Produção de IL-12 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Concentração de IL-12 (pg/mL)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	277,13 ± 45,71♦	257,13 ± 27,11♦	156,07 ± 20,81*♦	494,00 ± 51,86*♦	1097,75 ± 98,26*♦
	LPS	236,63 ± 36,32♦	193,38 ± 37,99♦	131,92 ± 30,86*♦	474,00 ± 48,54*♦	1037,75 ± 64,39*♦
	RPMI	82,13 ± 14,34♦	84,00 ± 25,29♦	47,75 ± 6,61*♦	236,50 ± 35,97*♦	360,25 ± 27,76*♦
<b>C57BL/6</b>	HKY	1470,88 ± 78,54	1479,00 ± 85,40	1176,08 ± 150,36*	1791,42 ± 137,68*	2150,25 ± 155,44*
	LPS	1462,75 ± 97,62	1409,00 ± 107,36	1025,25 ± 139,66*	1734,08 ± 150,82*	2199,00 ± 126,70*
	RPMI	598,25 ± 40,93	621,50 ± 89,13	366,92 ± 77,67*	937,75 ± 60,05*	1366,50 ± 114,61*

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

♦ p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/c com a linhagem C57BL/6



**Figura 4** – Produção de IL-12 por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.5 Determinação de TNF- $\alpha$ em cultura de macrófagos

A determinação da concentração de TNF- $\alpha$  foi realizada em sobrenadante de cultura (48 horas) de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS e somente meio RPMI.

Macrófagos de camundongos C57BL/6 controles estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, produziram quantidade significativamente maior de TNF- $\alpha$  que camundongos BALB/c. O mesmo foi observado durante todo o período de infecção dos camundongos infectados (Tabela 5).

Durante a infecção, macrófagos de camundongos BALB/c estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, não apresentaram alteração significativa na produção de TNF- $\alpha$  em 12 horas de infecção, seguido de diminuição significativa no 1º dia pós-infecção. A partir do 3º dia da infecção, verificou-se aumento significativo na concentração da citocina, sendo mais acentuado no 5º dia pós-infecção (Figura 5).

A determinação da concentração de TNF- $\alpha$  por macrófagos de camundongos C57BL/6, mostrou uma ligeira elevação no início da infecção, ocorrida apenas nas células estimuladas com HKY e LPS. No 1º dia pós-infecção, a liberação da citocina sofreu diminuição significativa, tanto nos macrófagos estimulados com HKY e LPS quanto nos sem estímulo. No 3º dia da infecção, um aumento significativo nos macrófagos estimulados com HKY e LPS foi observado, o qual se acentuou no 5º dia pós-infecção, incluindo a produção por macrófagos não estimulados (Figura 5).

Analisando a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos das duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, observamos que ambos os camundongos apresentaram diminuição significativa no 1º dia pós-infecção. A partir do 3º dia da infecção, uma elevação significativa foi determinada, contudo com maior produção por camundongos C57BL/6.

**Tabela 5** – Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

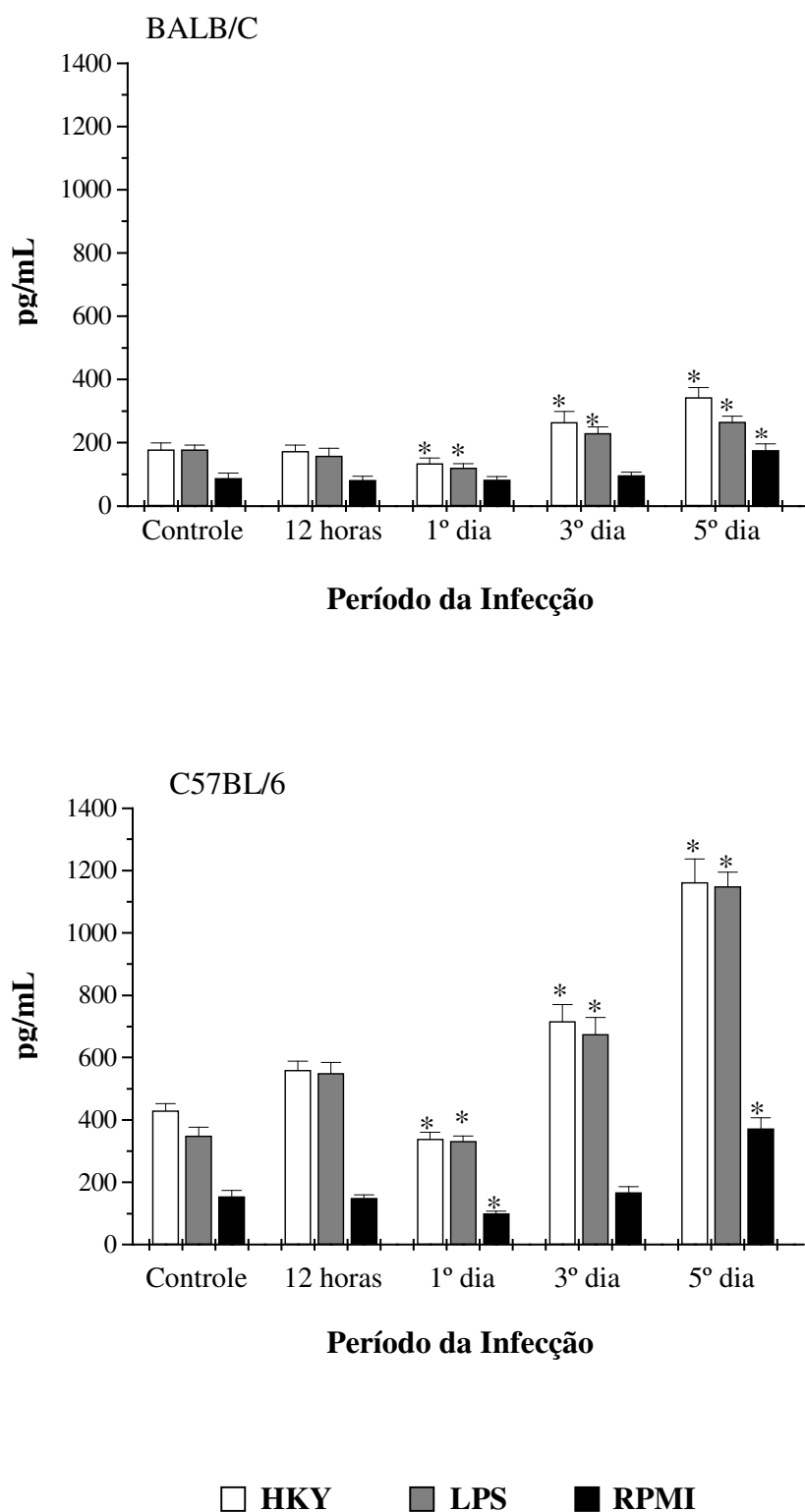
		Concentração de TNF- $\alpha$ (pg/mL)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	178,02 $\pm$ 20,87 $\blacklozenge$	172,94 $\pm$ 19,26 $\blacklozenge$	135,00 $\pm$ 16,09* $\blacklozenge$	265,00 $\pm$ 33,99* $\blacklozenge$	342,78 $\pm$ 31,51* $\blacklozenge$
	LPS	178,49 $\pm$ 13,57 $\blacklozenge$	158,65 $\pm$ 23,54 $\blacklozenge$	120,24 $\pm$ 13,97* $\blacklozenge$	230,00 $\pm$ 20,30* $\blacklozenge$	265,79 $\pm$ 17,43* $\blacklozenge$
	RPMI	91,35 $\pm$ 10,46 $\blacklozenge$	81,83 $\pm$ 12,16 $\blacklozenge$	79,29 $\pm$ 8,66 $\blacklozenge$	96,90 $\pm$ 10,29 $\blacklozenge$	176,75 $\pm$ 20,01* $\blacklozenge$
<b>C57BL/6</b>	HKY	529,92 $\pm$ 22,83	560,55 $\pm$ 28,48	339,76 $\pm$ 20,24*	716,55 $\pm$ 52,74*	1162,94 $\pm$ 74,23*
	LPS	449,44 $\pm$ 26,84	508,81 $\pm$ 34,00	331,98 $\pm$ 16,66*	675,84 $\pm$ 53,09*	1149,29 $\pm$ 45,32*
	RPMI	155,16 $\pm$ 18,65	149,60 $\pm$ 10,95	100,24 $\pm$ 7,14*	167,26 $\pm$ 19,48	371,98 $\pm$ 35,65*

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

$\blacklozenge$  p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/c com a linhagem C57BL/6





**Figura 5** – Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.6 Determinação de TGF- $\beta$ em cultura de macrófagos

A dosagem de TGF- $\beta$  foi realizada em sobrenadante de cultura (48 horas) de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS e somente meio RPMI

Macrófagos de camundongos BALB/c controles estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, produziram quantidade significativa de TGF- $\beta$ , enquanto macrófagos de camundongos C57BL/6 controles, não produziram a citocina (Tabela 6).

A análise da produção de TGF- $\beta$  por macrófagos de camundongos BALB/c demonstrou uma elevação significativa na concentração da citocina durante a infecção, sendo que a partir do 3º dia começou a ser observada ligeira queda. No 5º dia pós-infecção, a diminuição dos níveis de TGF- $\beta$  se acentuou, apresentando valores semelhantes aos dos animais controles (Figura 6).

Em macrófagos de camundongos C57BL/6, por sua vez, a liberação de TGF- $\beta$  foi reconhecida apenas em 12 horas e 1º dia pós-infecção, em pequenos níveis comparados ao mesmo período da infecção dos camundongos BALB/c (Figura 6).

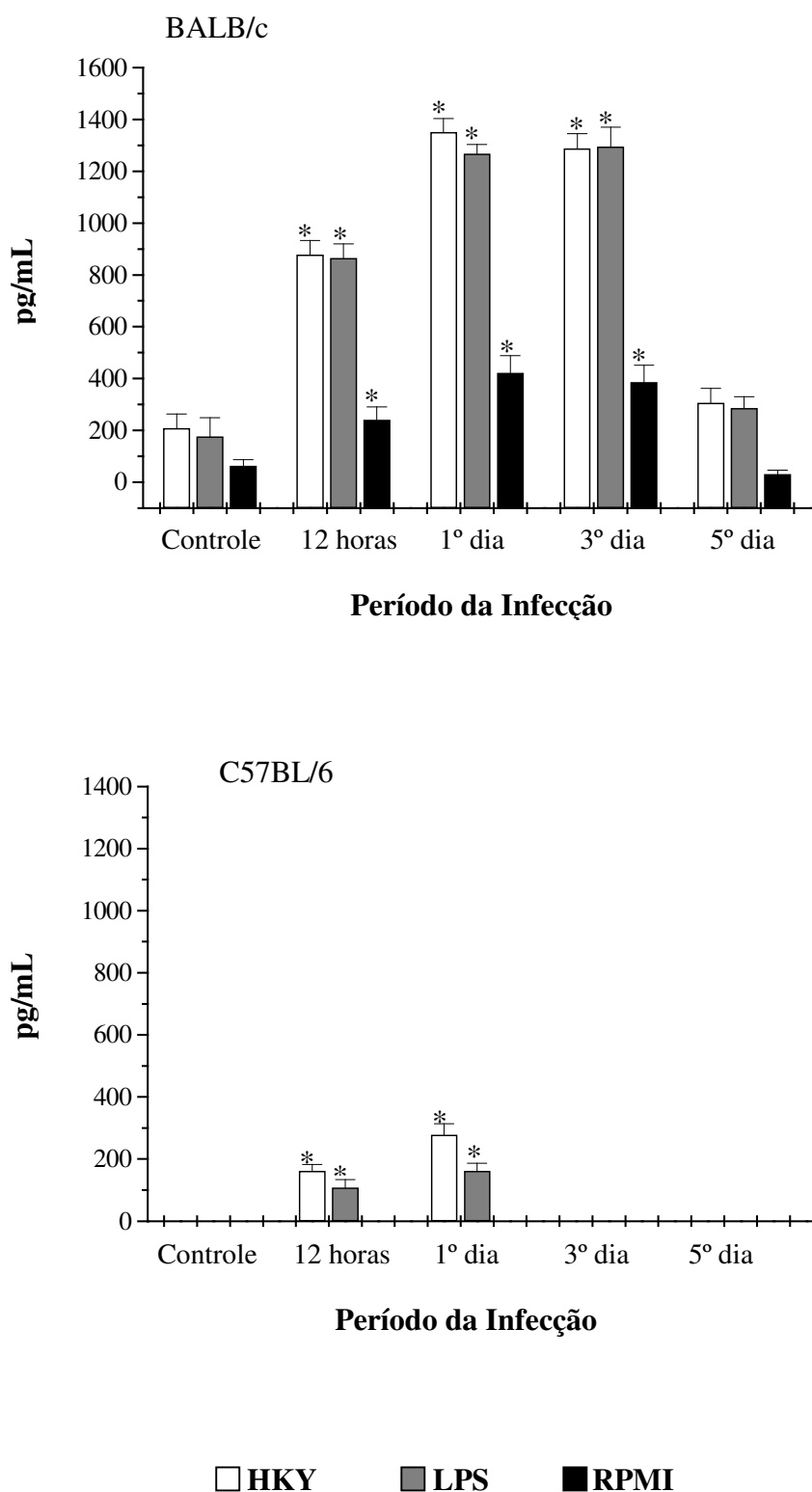
**Tabela 6** – Produção de TGF- $\beta$  por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Concentração de TGF- $\beta$ (pg/mL)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	208,00 $\pm$ 54,77 $\blacklozenge$	878,00 $\pm$ 55,68* $\blacklozenge$	1351,33 $\pm$ 51,32* $\blacklozenge$	1288,00 $\pm$ 57,15* $\blacklozenge$	305,50 $\pm$ 56,79 $\blacklozenge$
	LPS	175,50 $\pm$ 72,74 $\blacklozenge$	864,67 $\pm$ 55,08* $\blacklozenge$	1268,00 $\pm$ 36,06* $\blacklozenge$	1295,50 $\pm$ 74,55* $\blacklozenge$	285,50 $\pm$ 44,25 $\blacklozenge$
	RPMI	63,00 $\pm$ 23,80 $\blacklozenge$	241,33 $\pm$ 49,33* $\blacklozenge$	421,33 $\pm$ 66,58* $\blacklozenge$	385,50 $\pm$ 67,02* $\blacklozenge$	31,33 $\pm$ 15,28 $\blacklozenge$
<b>C57BL/6</b>	HKY	0	161,33 $\pm$ 20,82*	278,00 $\pm$ 36,06*	0	0
	LPS	0	108,00 $\pm$ 26,46*	161,33 $\pm$ 25,17*	0	0
	RPMI	0	0	0	0	0

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

$\blacklozenge$  p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/c com a linhagem C57BL/6



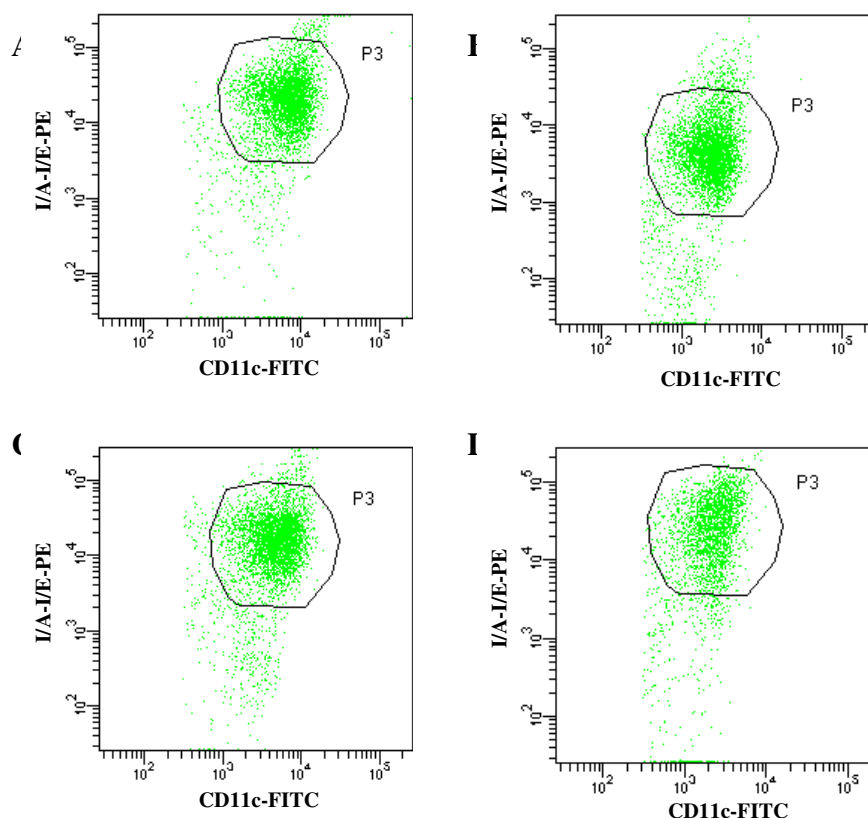
**Figura 6** – Produção de TGF- $\beta$  por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em triplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.7 Imunofenotipagem de células dendríticas

Células dendríticas foram obtidas do baço de animais controles (não infectados) e infectados, através da metodologia de separação magnética utilizando MicroBeads CD11c, e marcadas com anticorpos anti-CD11c-FITC, a fim de se verificar a eficácia da purificação, anti-I/A-I/E-PE, com objetivo de analisar a expressão de moléculas de MHC de classe II, e com anti-CD11b-PE e anti-CD8- $\alpha$ -PECy<sub>7</sub>, para determinação das sub-populações. As células foram analisadas no citômetro de fluxo.

Do total de células utilizadas no teste (pool de 6 animais), 50-60% foram identificadas como células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>).

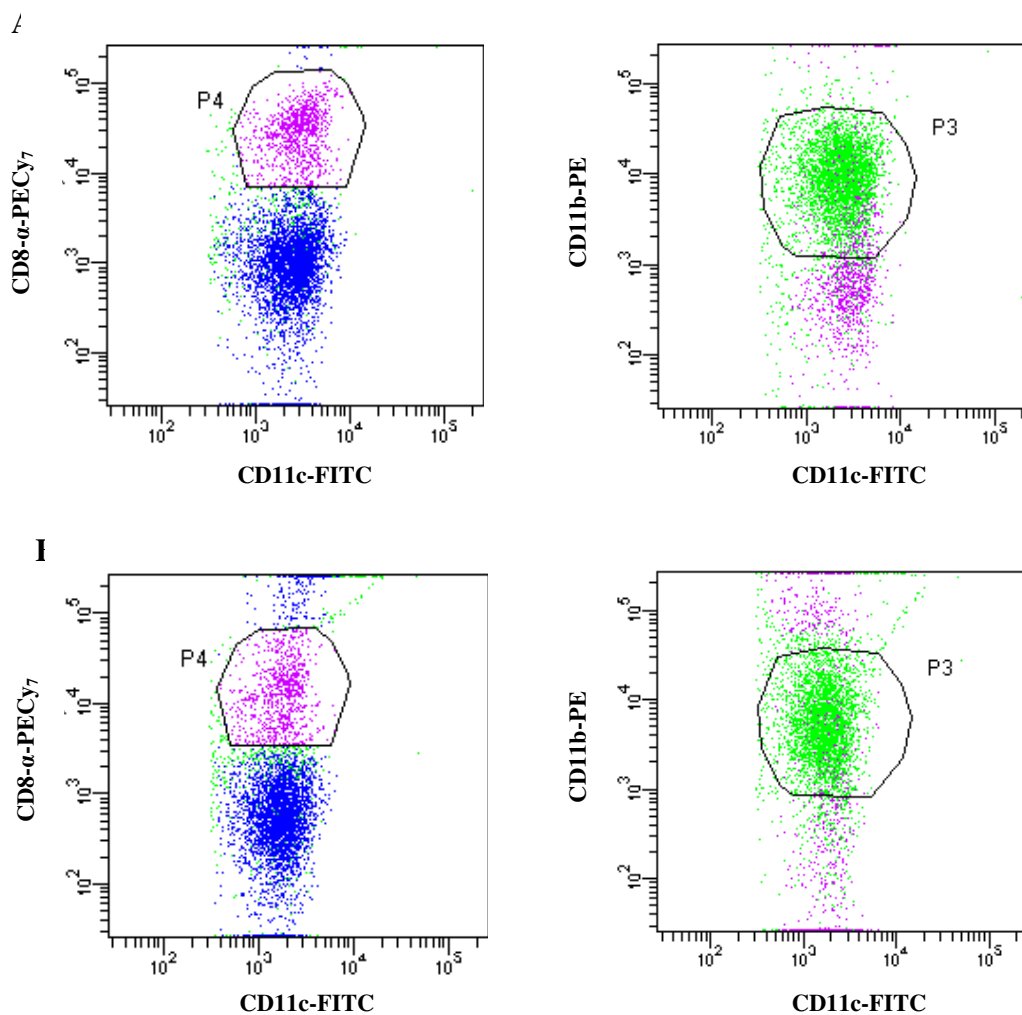
Camundongos controles apresentaram 90% de expressão de MHC de classe II na linhagem C57BL/6 e 89% na linhagem BALB/c. A análise da expressão do MHC II na superfície das células infectadas mostrou discreta diminuição apenas no 1º dia pós-infecção, com 87% de expressão nos camundongos C57BL/6 e 85% nos camundongos BALB/c, como ilustrado na Figura 7.



**Figura 7** – Expressão de MHC de classe II na superfície de células dendríticas de camundongos controles e infectados. (A – C57BL/6 controle, B – C57BL/6 1º dia pós-infecção, C – BALB/c controle, D – BALB/c 1º dia pós-infecção).

A determinação das sub-populações de células dendríticas obtidas do baço dos camundongos não-infectados (controles), mostrou presença de aproximadamente 68% de células  $CD11b^+$  e 19% de células  $CD8-\alpha^+$  nos camundongos BALB/c, e 70% de células  $CD11b^+$  e 17% de células  $CD8-\alpha^+$  nos camundongos C57BL/6 (Figura 8).

Não foi observada alteração na composição das sub-populações após a infecção.



**Figura 8** – Sub-populações de células dendríticas presentes no baço de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) não infectados.

#### 4.8 Dosagem de Óxido Nítrico em cultura de células dendríticas

A determinação de NO foi realizada em sobrenadante de cultura (48 horas) de células dendríticas esplênicas obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS, e somente meio RPMI.

Células dendríticas de camundongos C57BL/6 controles, estimuladas com HKY, LPS, produziram quantidade significativamente maior de NO que as células de camundongos BALB/c. Nos camundongos C57BL/6 infectados, a produção de NO foi significativamente maior que nos camundongos BALB/c durante todo período de infecção, exceto no 1º dia pós-infecção, quando não foi observada produção de NO por ambas as linhagens de camundongos (Tabela 7).

Em 12 horas e 1º dia pós-infecção não houve produção de NO por células dendríticas de camundongos BALB/c. No 3º dia pós-infecção, a produção de NO determinada foi significativamente menor que a obtida nas células dendríticas dos camundongos controles, nas células estimuladas com HKY e LPS, e ausência de produção nas células não estimuladas. No 5º dia pós-infecção, observou-se aumento significativo na produção de NO, nas células estimuladas com HKY e LPS (Figura 9).

Nos camundongos C57BL/6, a infecção provocou diminuição significativa na produção de NO em 12 horas pós-infecção, nas células estimuladas com HKY e LPS, e ausência de produção nas células sem estímulo. No 1º dia pós-infecção não foi observada produção de NO. No 3º dia pós-infecção, células dendríticas de camundongos infectados apresentaram produção de NO significativamente menor que a determinada nos camundongos controles, seguida de aumento significativo no 5º dia pós-infecção nos macrófagos estimulados com HKY e LPS e ausência de produção nas células dendríticas não estimuladas (Figura 9).

De maneira geral, células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6, apresentaram ausência ou pequena produção de NO no início da infecção. No 3º pós-infecção, ambas as linhagens de camundongos apresentaram produção de NO por células estimuladas com HKY e LPS, contudo significativamente menor comparada com a produção dos camundongos controles. No 5º dias pós-infecção foi determinado aumento significativo na produção de NO, com maior elevação nos camundongos C57BL/6.

**Tabela 7** – Produção de óxido nítrico por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

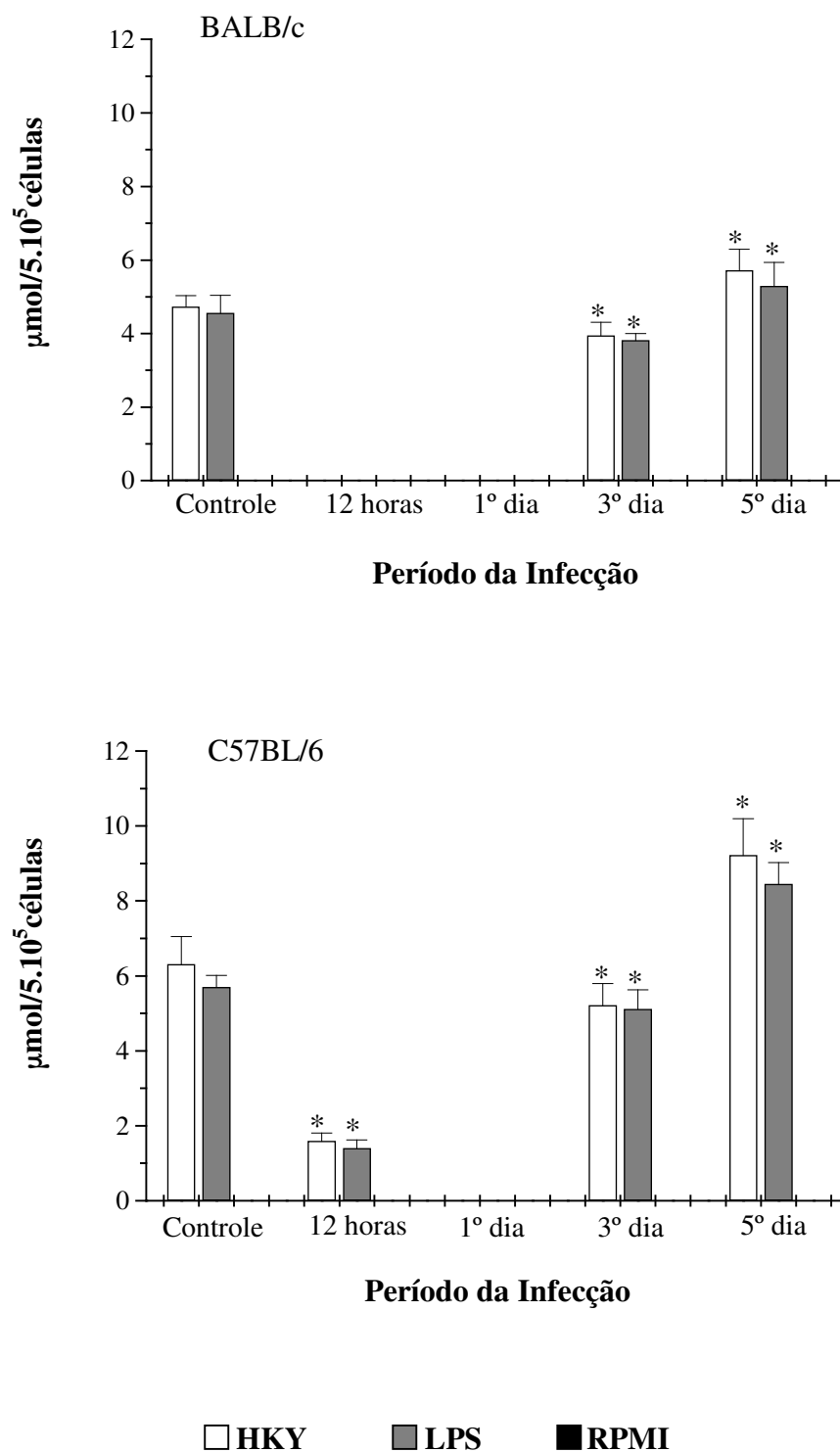
		Concentração de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μmol/5.10 <sup>5</sup> células)				
		Controle	12horas	1º dia	3º dia	5º dia
<b>BALB/C</b>	HKY	4,74 ± 0,30 <sup>♦</sup>	0	0	3,95 ± 0,36 <sup>*♦</sup>	5,72 ± 0,58 <sup>*♦</sup>
	LPS	4,56 ± 0,48 <sup>♦</sup>	0	0	3,82 ± 0,19 <sup>*♦</sup>	5,29 ± 0,64 <sup>*♦</sup>
	RPMI	0	0	0	0	0
<b>C57BL/6</b>	HKY	6,31 ± 0,75	1,59 ± 0,18 <sup>*</sup>	0	5,22 ± 0,58 <sup>*</sup>	9,22 ± 0,98 <sup>*</sup>
	LPS	5,70 ± 0,31	1,41 ± 0,21 <sup>*</sup>	0	5,12 ± 0,51 <sup>*</sup>	8,46 ± 0,57 <sup>*</sup>
	RPMI	0	0	0	0	0

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

♦ p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/C com a linhagem C57BL/6





**Figura 9** – Produção de óxido nítrico por células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em duplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.9 Determinação da atividade da arginase em lisado de células dendríticas

A determinação da atividade da arginase foi realizada em lisado de células dendríticas esplênicas obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS e somente meio RPMI.

Células dendríticas de camundongos BALB/c controles, estimuladas com HKY, LPS e sem estímulo, apresentaram atividade de arginase significativamente maior que as células de camundongos C57BL/6. Durante todo o período da infecção, a atividade da arginase foi significativamente maior nos camundongos BALB/c que nos camundongos C57BL/6, exceto no 3º dia pós-infecção, quando não foi encontrada alteração significativa entre as duas linhagens (Tabela 8).

No decorrer da infecção, ocorreu um aumento significativo na atividade da arginase nas células dendríticas de camundongos BALB/c estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, obtidos em 12 horas e 1º dia pós-infecção. No 3º e 5º dias pós-infecção, observou-se diminuição na atividade da arginase comparada aos resultados anteriores, contudo ainda mantendo-se significativamente elevada em relação ao grupo controle (Figura 10).

Resultados semelhantes foram obtidos para os camundongos C57BL/6, onde a infecção provocou um aumento significativo na atividade da arginase nas células dendríticas estimuladas com HKY, LPS e sem estímulo, obtidos em 12 horas e 1º dia pós-infecção. No 3º e 5º dias pós-infecção, observou-se uma diminuição na atividade da arginase comparado aos resultados do 1º dia pós-infecção, contudo ainda mantendo-se significativamente elevada em relação à atividade da enzima obtida nas células dendríticas dos camundongos controles (Figura 10).

Analisando a atividade da arginase nas duas linhagens de camundongos estudadas, foi observado que células dendríticas de ambas, BALB/c e C57BL/6, apresentaram aumento da atividade da arginase na início da infecção, com maior elevação no 1º dia pós-infecção, sendo mais acentuado nos camundongos BALB/c, seguido de diminuição nos 3º e 5º dias pós-infecção.

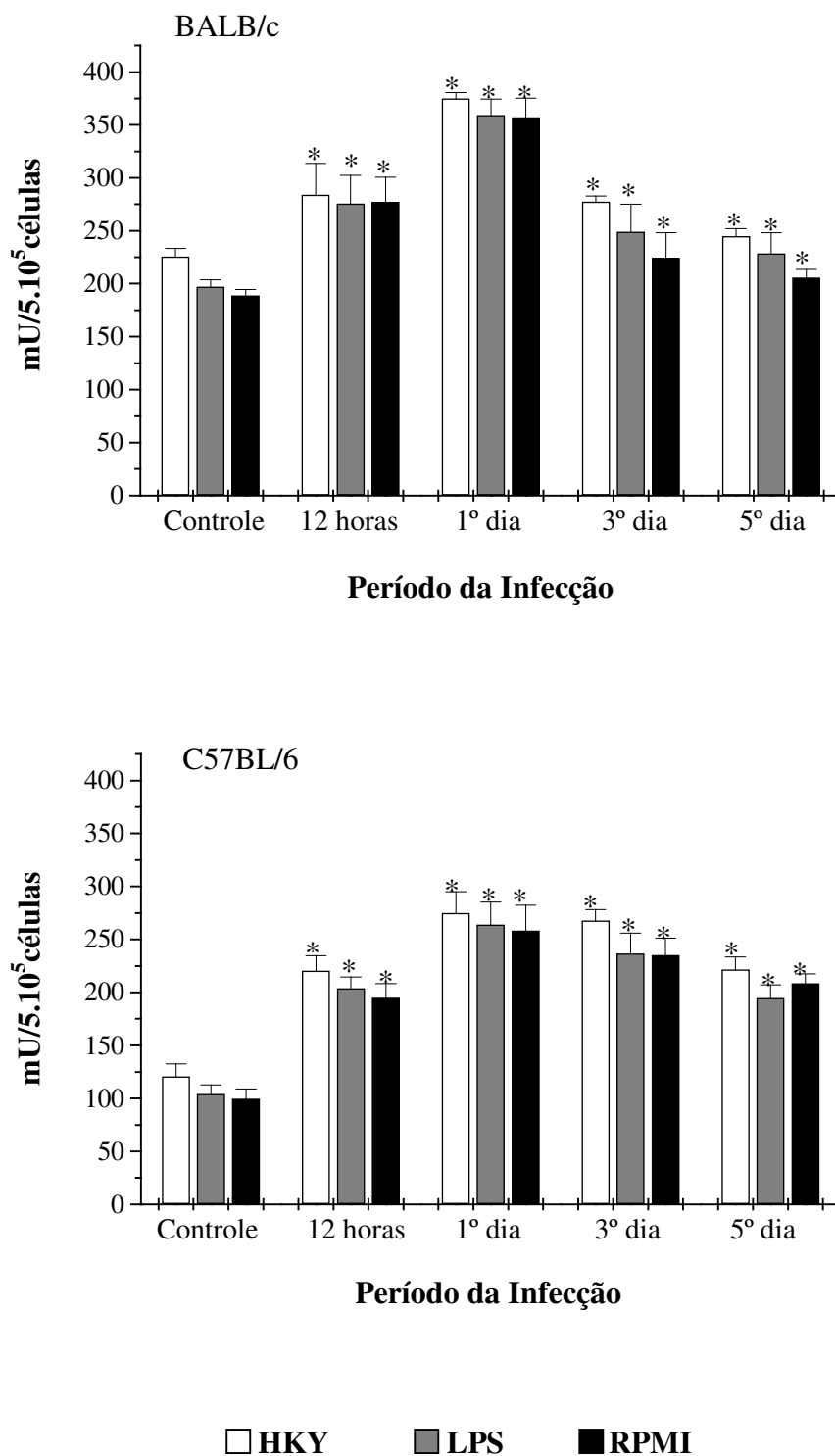
**Tabela 8** – Atividade da enzima arginase em células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Atividade da arginase (mU/5.10 <sup>5</sup> células)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	225,43 ± 8,02 <sup>◆</sup>	283,91 ± 29,70 <sup>*◆</sup>	374,79 ± 5,76 <sup>*◆</sup>	277,36 ± 5,29 <sup>*</sup>	244,76 ± 7,07 <sup>*◆</sup>
	LPS	197,11 ± 6,60 <sup>◆</sup>	275,67 ± 26,69 <sup>*◆</sup>	359,10 ± 15,21 <sup>*◆</sup>	249,16 ± 25,80 <sup>*</sup>	228,70 ± 19,40 <sup>*◆</sup>
	RPMI	188,79 ± 5,67 <sup>◆</sup>	277,19 ± 23,45 <sup>*◆</sup>	357,17 ± 18,24 <sup>*◆</sup>	224,48 ± 23,67 <sup>*</sup>	205,79 ± 7,70 <sup>*</sup>
<b>C57BL/6</b>	HKY	120,62 ± 12,06	220,47 ± 14,28 <sup>*</sup>	275,04 ± 19,99 <sup>*</sup>	267,64 ± 10,65 <sup>*</sup>	221,46 ± 12,02 <sup>*</sup>
	LPS	104,23 ± 8,47	203,86 ± 10,74 <sup>*</sup>	263,97 ± 21,37 <sup>*</sup>	236,69 ± 19,30 <sup>*</sup>	194,52 ± 12,73 <sup>*</sup>
	RPMI	99,67 ± 9,27	194,83 ± 13,68 <sup>*</sup>	258,25 ± 24,00 <sup>*</sup>	235,07 ± 16,31 <sup>*</sup>	208,74 ± 8,62 <sup>*</sup>

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

◆ p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/C com a linhagem C57BL/6



**Figura 10** – Atividade da enzima arginase em células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em duplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.10 Determinação de IL-10 em cultura de células dendríticas

A dosagem de IL-10 foi realizada em sobrenadante de cultura (48 horas) de células dendríticas esplênicas obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS, e somente meio RPMI.

Células dendríticas de camundongos BALB/c controles estimuladas com HKY, LPS e sem estímulo, produziram quantidade significativamente maior de IL-10 que células de camundongos C57BL/6, resultado reproduzido durante todo o período da infecção (Tabela 9).

Em 12 horas e 1º dia pós-infecção, verificou-se uma elevação significativa na produção de IL-10 por células dendríticas de camundongos BALB/c, com maior aumento no 1º dia pós-infecção nas células dendríticas estimuladas com HKY, LPS e sem estímulo. No 3º e 5º dias pós-infecção, a produção da citocina apresentou queda, porém mantendo-se significativamente mais elevada comparada aos controles, nas células estimuladas com HKY e LPS. Nas células dendríticas sem estímulo não foi observada alteração significativa na produção de IL-10, no 3º e 5º dias pós-infecção (Figura 11).

A determinação da produção de IL-10 por células dendríticas de camundongos C57BL/6 infectados, mostrou aumento significativo em 12 horas e 1º dia pós-infecção. A partir do 3º dia da infecção, verificou-se diminuição na concentração da citocina, contudo os níveis mantiveram-se significativamente elevados em relação ao controle, nas células estimuladas com HKY e LPS. Nas células dendríticas sem estímulo não foi observada alteração significativa na produção de IL-10, no 3º e 5º dias pós-infecção (Figura 11).

De modo geral, células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram elevação na produção de IL-10 durante a infecção com *Y. pseudotuberculosis*, mais predominante nos camundongos BALB/c. No 3º e 5º dias pós-infecção, os níveis da citocina começaram a diminuir, porém mantendo-se ainda elevados em relação aos controles, em ambas as linhagens.

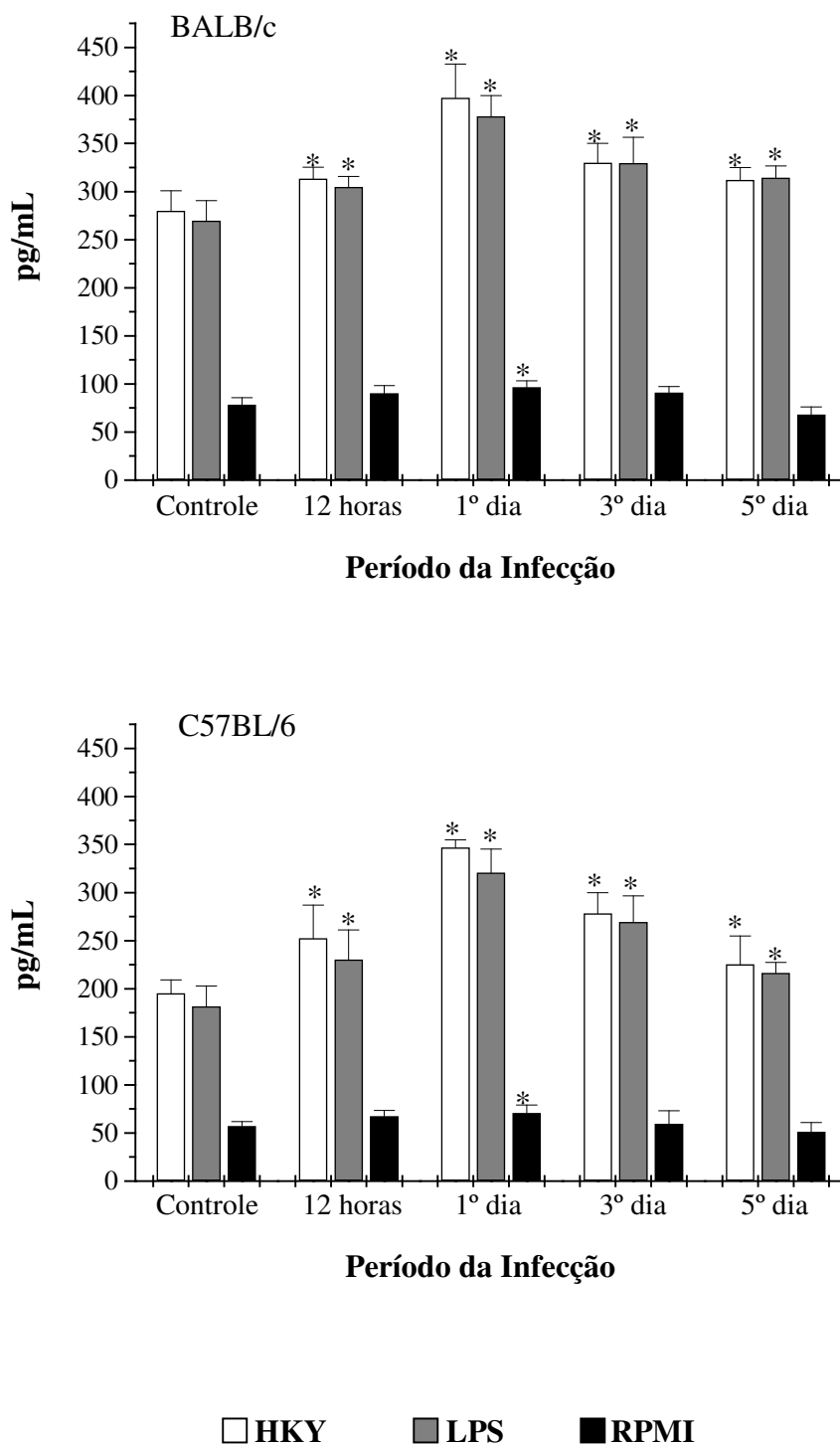
**Tabela 9** – Produção de IL-10 por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Concentração de IL-10 (pg/mL)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	279,93 ± 20,85 <sup>♦</sup>	313,54 ± 9,77 <sup>*♦</sup>	397,54 ± 35,12 <sup>*♦</sup>	330,05 ± 20,10 <sup>*♦</sup>	311,97 ± 13,08 <sup>*♦</sup>
	LPS	269,69 ± 21,10 <sup>♦</sup>	304,83 ± 8,79 <sup>*♦</sup>	378,16 ± 21,77 <sup>*♦</sup>	329,66 ± 26,86 <sup>*♦</sup>	314,26 ± 12,51 <sup>*♦</sup>
	RPMI	78,20 ± 7,61 <sup>♦</sup>	90,32 ± 6,43 <sup>♦</sup>	96,57 ± 6,53 <sup>*♦</sup>	91,04 ± 6,42 <sup>♦</sup>	68,16 ± 7,95 <sup>♦</sup>
<b>C57BL/6</b>	HKY	195,29 ± 13,79	252,62 ± 28,07 <sup>*</sup>	346,93 ± 8,03 <sup>*</sup>	278,32 ± 21,53 <sup>*</sup>	225,32 ± 29,58 <sup>*</sup>
	LPS	181,53 ± 21,44	230,21 ± 25,26 <sup>*</sup>	320,60 ± 24,61 <sup>*</sup>	269,54 ± 27,17 <sup>*</sup>	216,32 ± 11,18 <sup>*</sup>
	RPMI	57,30 ± 4,41	67,40 ± 4,83	70,91 ± 8,21 <sup>*</sup>	59,29 ± 13,89	51,40 ± 9,36

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

♦ p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/C com a linhagem C57BL/6



**Figura 11** – Produção de IL-10 por células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em duplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.11 Determinação de IL-12 em cultura de células dendríticas

A concentração de IL-12 foi determinada em sobrenadante de cultura (48 horas) de células dendríticas esplências obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS, e somente meio RPMI.

Células dendríticas de camundongos C57BL/6 controles estimuladas com HKY, LPS e sem estímulo, produziram quantidade significativamente maior de IL-12 que camundongos BALB/c, resultado observado durante todo o período da infecção (Tabela 10).

Analisando a produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos BALB/c, observou-se diminuição significativa na liberação da citocina em 12 horas e 1º dia pós-infecção, nas células estimuladas com HKY e LPS. Nas células sem estímulo não foi verificada produção de IL-12 nesse período. No 3º dia pós-infecção não foi observada alteração significativa na produção da citocina, seguido de aumento significativo no 5º dia pós-infecção, nas células estimuladas com HKY, LPS (Figura 12).

Em 12 horas após a infecção, não foi constatada alteração significativa nas concentrações de IL-12 nos camundongos C57BL/6. Verificou-se diminuição significativa no 1º dia pós-infecção, nas células dendríticas estimuladas com HKY, LPS e sem estímulo. As concentrações apresentaram aumento significativo no 3º e 5º dias pós-infecção, com maior elevação no último dia da infecção, nos macrófagos estimulados com HKY, LPS e sem estímulo (Figura 12).

De maneira geral, células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram uma diminuição na produção de IL-12 no início da infecção, mais predominante nos camundongos BALB/c, seguido de elevação no 5º dias pós-infecção, com valores mais acentuados para linhagem C57BL/6.



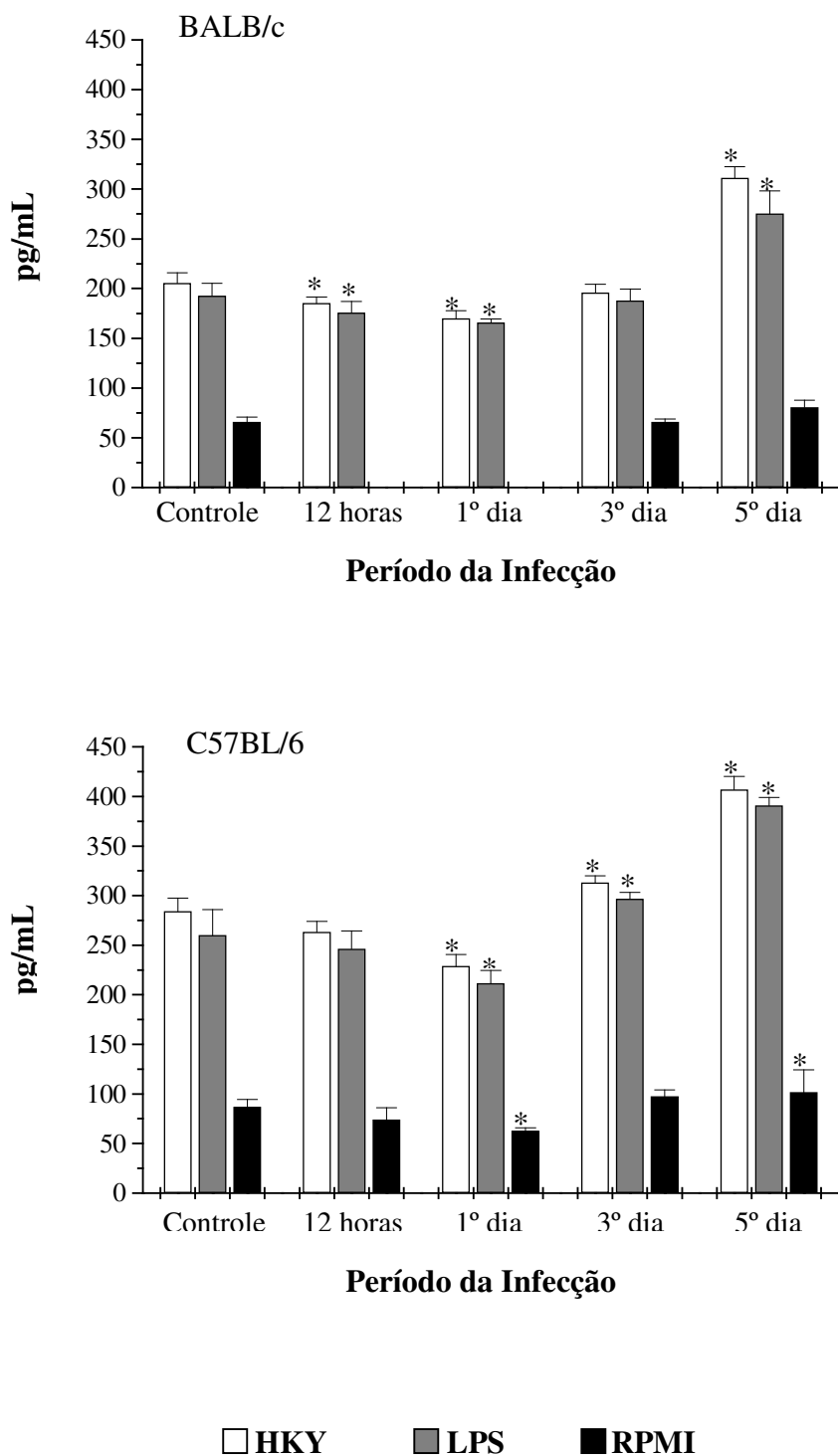
**Tabela 10** – Produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Concentração de IL-12 (pg/mL)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	205,57 ± 8,30♦	185,44 ± 6,20*♦	170,10 ± 7,85*♦	195,77 ± 8,46♦	311,25 ± 11,28*♦
	LPS	192,96 ± 10,14♦	175,80 ± 11,46*♦	165,77 ± 3,67*♦	187,93 ± 11,56♦	275,39 ± 22,89*♦
	RPMI	65,82 ± 3,47♦	0	0	65,96 ± 3,01♦	70,73 ± 6,98
<b>C57BL/6</b>	HKY	284,18 ± 10,77	263,39 ± 10,69	228,86 ± 11,74*	312,99 ± 6,99*	406,88 ± 13,27*
	LPS	259,95 ± 21,12	246,34 ± 17,88	211,49 ± 13,06*	296,91 ± 6,32*	390,930 ± 7,92*
	RPMI	86,97 ± 7,39	74,16 ± 9,68	62,81 ± 3,07*	97,33 ± 6,75	101,58 ± 22,57*

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

♦ p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/C com a linhagem C57BL/6



**Figura 12** – Produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em duplicata (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.12 Determinação de TNF- $\alpha$ em cultura de células dendríticas

A determinação da concentração de TNF- $\alpha$  foi realizada em sobrenadante de cultura (48 horas) de células dendríticas esplênicas obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS e somente meio RPMI.

Células dendríticas de camundongos C57BL/6 controles estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, produziram quantidade significativamente maior de TNF- $\alpha$  que camundongos BALB/c. O mesmo foi observado durante todo o período de infecção, exceto no 5º dia pós-infecção nas células sem estímulo, quando ambas as linhagens produziram quantidades significativamente iguais de TNF- $\alpha$  (Tabela 11).

Durante a infecção, macrófagos de camundongos BALB/c estimulados com HKY, LPS e sem estímulo, apresentaram diminuição significativa na produção de TNF- $\alpha$  em 12 horas e 1º dia pós-infecção. No 3º dia da infecção, não se verificou alteração significativa na concentração da citocina, seguido de aumento significativo no 5º dia (Figura 13).

Células dendríticas de camundongos C57BL/6 produziram níveis significativamente semelhantes aos das células controles em 12 horas pós-infecção, nas células estimuladas com HKY, LPS e sem estímulo. No 1º dia pós-infecção, a liberação da citocina sofreu diminuição significativa, tanto nas células estimuladas com HKY e LPS quanto nas sem estímulo. No 3º dia da infecção, um aumento significativo nas células dendríticas estimuladas com HKY e LPS foi observado, acentuado no 5º dia pós-infecção, incluindo a produção por células não estimuladas (Figura 13).

A determinação da produção de TNF- $\alpha$  por células dendríticas das duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, mostrou que ambos os camundongos apresentaram diminuição significativa no 1º dia pós-infecção. No 5º dia pós-infecção, uma elevação significativa foi determinada em ambas as linhagens, contudo com maior produção por camundongos C57BL/6.

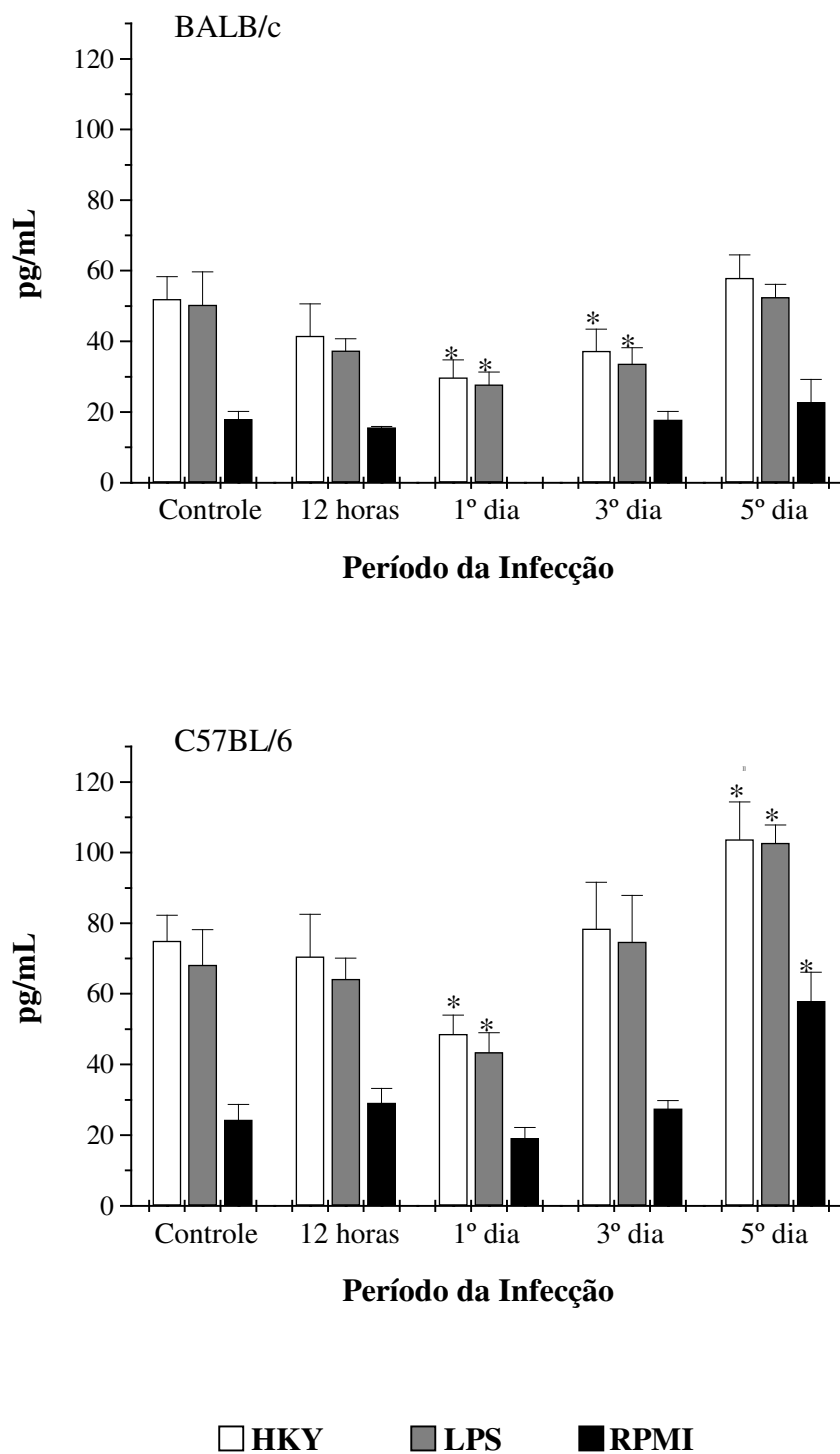
**Tabela 11** – Produção de TNF- $\alpha$  por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

		Concentração de TNF- $\alpha$ (pg/mL)				
		Controle	12horas	1ºdia	3ºdia	5ºdia
<b>BALB/C</b>	HKY	51,95 $\pm$ 6,40 $\blacklozenge$	41,60 $\pm$ 9,01 $\blacklozenge$	29,78 $\pm$ 5,00* $\blacklozenge$	37,29 $\pm$ 6,16* $\blacklozenge$	57,96 $\pm$ 6,52 $\blacklozenge$
	LPS	50,39 $\pm$ 9,32 $\blacklozenge$	37,34 $\pm$ 3,45 $\blacklozenge$	27,74 $\pm$ 3,54* $\blacklozenge$	33,70 $\pm$ 4,51* $\blacklozenge$	52,52 $\pm$ 3,62 $\blacklozenge$
	RPMI	18,04 $\pm$ 2,19 $\blacklozenge$	15,67 $\pm$ 0,28 $\blacklozenge$	0	17,85 $\pm$ 2,38 $\blacklozenge$	22,78 $\pm$ 6,49 $\blacklozenge$
<b>C57BL/6</b>	HKY	75,02 $\pm$ 7,24	70,51 $\pm$ 12,06	48,68 $\pm$ 5,29*	78,49 $\pm$ 13,06	103,70 $\pm$ 10,66*
	LPS	68,20 $\pm$ 9,97	64,24 $\pm$ 5,93	43,44 $\pm$ 5,57*	74,76 $\pm$ 13,13	102,70 $\pm$ 5,09*
	RPMI	24,37 $\pm$ 4,33	29,12 $\pm$ 4,10	19,12 $\pm$ 3,05	27,55 $\pm$ 2,23	57,96 $\pm$ 8,16*

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*; HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*; RPMI: sem estímulo

\* p < 0,05 – em relação ao grupo controle

$\blacklozenge$  p < 0,05 – comparação da linhagem BALB/C com a linhagem C57BL/6



**Figura 13** – Produção de TNF- $\alpha$  por células dendríticas de camundongos BALB/C e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e são apresentados como média  $\pm$  SD de observações em duplicata (\* p < 0,05).

#### 4.13 Determinação de IL-4 em cultura de células dendríticas

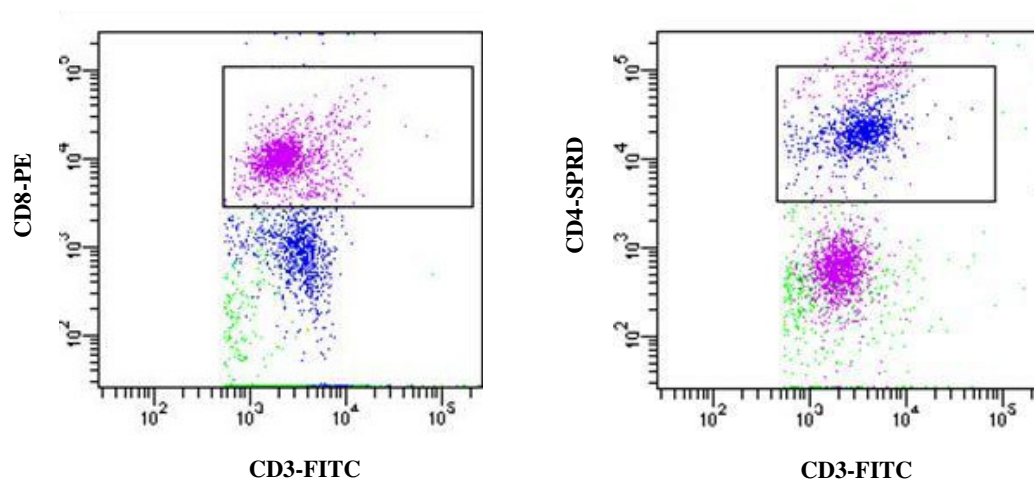
A dosagem de IL-4 foi realizada em sobrenadante de cultura (48 horas) de células dendríticas esplênicas obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *Y. pseudotuberculosis*, e não infectados (controles). A cultura celular foi realizada na presença de HKY, LPS e somente meio RPMI.

Não foi obtida produção detectável de IL-4 por células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles ou infectados.

#### 4.14 Imunofenotipagem de linfócitos

Após obtenção e processamento das células esplênicas dos camundongos imunizados com HKY, que posteriormente foram utilizadas no co-cultivo com macrófagos e células dendríticas, realizou-se a identificação da população de linfócitos T. As células obtidas foram marcadas com anticorpos anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE e anti-CD8-SPRD, e analisadas por citometria de fluxo.

Os testes identificaram em média presença de 70% de células T na população característica de linfócitos, com aproximadamente 38% de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e 50% linfócitos T CD8<sup>+</sup>, como ilustrado na Figura 14.



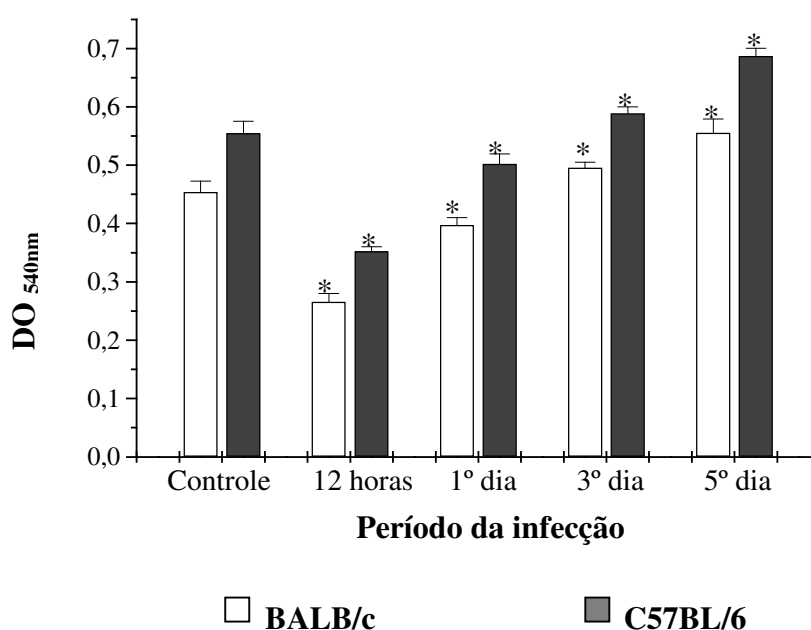
**Figura 14** – Análise através de citometria de fluxo da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, obtidos de camundongos imunizados com HKY.

#### 4.15 Co-cultivo de macrófagos e linfócitos

Macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. pseudotuberculosis* e controles (não infectados) foram co-cultivados com linfócitos T obtidos de camundongos imunizados com HKY, utilizando células de camundongos de mesma linhagem para o cultivo. A elevação ou redução na produção de formazana, produto de degradação do sal tetrazólico (MTT), sugere que os macrófagos dos animais infectados aumentaram ou diminuíram, respectivamente, a capacidade de estimular as células T dos animais imunizados, em relação aos controles.

Os resultados demonstraram similaridade em ambas as linhagens, com diminuição na produção de formazana em 12 horas e 1º dia de infecção, sendo que camundongos BALB/c apresentaram maior queda. Nos 3º e 5º dias da infecção ocorreu aumento na produção de formazana (figura 15).

Os dados sugerem que ocorreu uma diminuição da imunoestimulação dos linfócitos T pelos macrófagos de animais infectados no início da infecção. Após o 3º dia da infecção, é provável que os macrófagos infectados tenham adquirido a capacidade de ativar as células T, ocorrendo proliferação celular e aumento na degradação do sal tetrazólico.



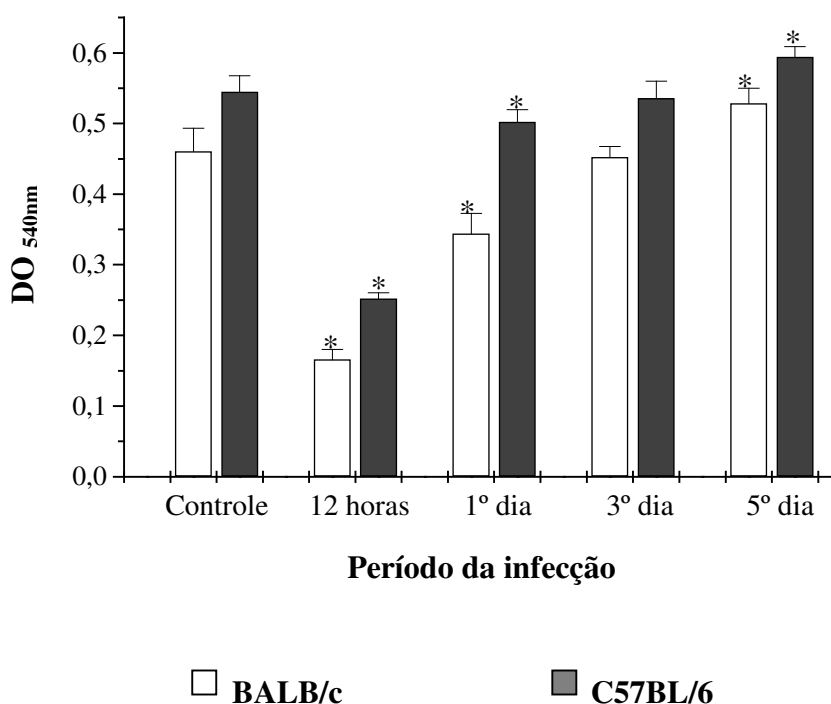
**Figura 15** – Influência da infecção por *Y. pseudotuberculosis* sobre a capacidade de macrófagos estimularem a proliferação de células T. A Proliferação celular foi mensurada através da metodologia do MTT. Resultados representam a DO em 540nm obtida a partir da produção de formazana, e são representadas como média  $\pm$  SD. As dosagens foram realizadas em quadruplicata. \* $p < 0,05$  vs controle.

#### 4.16 Co-cultivo de células dendríticas e linfócitos

Células dendríticas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Y. pseudotuberculosis* e controles (não infectados) foram co-cultivados com linfócitos T obtidos de camundongos imunizados com HKY, utilizando células de camundongos de mesma linhagem para o cultivo. A capacidade das células dendríticas imunoestimularem as células T dos animais imunizados foi analisada.

Observou-se diminuição na produção de formazana em 12 horas e 1º dia pós-infecção em ambas linhagens de camundongos, sendo que camundongos BALB/c apresentaram maior queda. Os resultados sugerem a ocorrência de redução na proliferação de células T no início da infecção, indicando diminuição da imunoestimulação dos linfócitos T pelas células dendríticas.

No 5º dia da infecção, ocorreu aumento na produção de formazana nos camundongos BALB/c e C57BL/6, sugerindo que as células dendríticas dos animais infectados tenham adquirido a capacidade de ativar as células T (figura 16).



**Figura 16** – Influência da infecção por *Y. pseudotuberculosis* sobre a capacidade de células dendríticas estimularem a proliferação de células T. A Proliferação celular foi mensurada através da metodologia do MTT. Resultados representam a DO em 540nm obtida a partir da produção de formazana, e são representadas como média  $\pm$  SD. As dosagens foram realizadas em quadruplicata. \* $p < 0,05$  vs controle



## 5. DISCUSSÃO

Diferentes linhagens de camundongos desenvolvem respostas distintas à *Yersinia* (BOHN e AUTENRIETH, 1996).

Durante infecção por *Y. pseudotuberculosis*, nós verificamos que linhagens de camundongos *Yersinia*-resistentes e *Yersinia*-suscetíveis apresentaram diferenças no padrão de ativação de macrófagos e células dendríticas, podendo essas diferenças ter influência na evolução da infecção.

Uma importante via efetora do sistema imune é a produção de NO por macrófagos, catalisada pela enzima iNOS. A via alternativa do metabolismo de L-arginina utiliza a enzima arginase para converter o aminoácido em ornitina e uréia (MUNDER et al., 1999). Em nosso estudo, macrófagos de camundongos C57BL/6 não infectados produziram quantidade significativamente maior de NO que macrófagos de camundongos BALB/c controles. Em oposição, análise da enzima arginase mostrou maior atividade em macrófagos de camundongos BALB/c não infectados, quando comparada à atividade determinada nos macrófagos de camundongos C57BL/6 controles. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos indicando que macrófagos de camundongos de linhagens Th1 (C57BL/6, B10D2) são mais facilmente ativados para produção de NO, e macrófagos de linhagens Th2 (BALB/c, DBA/2) utilizam preferencialmente a via da arginase para o metabolismo de L-arginina (MILLS et al., 2000).

Citocinas Th1 e Th2 podem influenciar o metabolismo de L-arginina também em células dendríticas, sendo que citocinas Th1 induzem iNOS e Th2 estimulam a atividade da arginase (MUNDER et al., 1999). A análise da produção de NO e atividade da arginase em células dendríticas de camundongos não infectados mostrou que as células da linhagem C57BL/6 produziram maior quantidade de NO que as células de camundongos BALB/c, e estas, por sua vez, apresentaram maior atividade da arginase, comparada à atividade encontrada nas células dos camundongos C57BL/6.

Pujol e Bliska (1995) observaram diminuição na produção de NO por macrófagos infectados *in vitro* com *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*. Estudos demonstram que a infecção por *Y. enterocolitica* também altera a produção de NO em macrófagos (TUMITAN et al., 2007). A determinação dessa produção em camundongos *Yersinia*-resistentes e *Yersinia*-suscetíveis mostrou que macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados utilizam principalmente a via iNOS para metabolismo de L-arginina, enquanto macrófagos de camundongos BALB/c infectados utilizam preferencialmente a via catalisada por arginase (TUMITAN et al., 2007).

Nós verificamos que, em 12 horas e 1º dia pós-infecção, macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados apresentaram redução na produção de NO quando comparada à produção nos camundongos controles, confirmando que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* pode influenciar a produção de NO. Nesse período foram observados menores níveis de NO na linhagem BALB/c do que na linhagem C57BL/6. A atividade da arginase, por sua vez, apresentou elevação no início da infecção, com maiores níveis nos macrófagos de camundongos BALB/c. Esses dados indicam que a infecção não alterou a via preferencial de metabolização de L-arginina nas respectivas linhagens.

A análise da produção de NO e atividade da arginase em células dendríticas mostrou que as células de camundongos BALB/c apresentaram maior aumento na atividade da arginase que as células de camundongos C57BL/6, e ausência na produção de NO, em 12 horas e 1º dia pós-infecção. Nas células dendríticas de camundongos C57BL/6 também não verificamos produção detectável de NO no 1º dia pós-infecção. Os resultados sugerem que células dendríticas de linhagens de camundongos Th1 e Th2 também diferem na via de metabolização de L-arginina após infecção por *Y. pseudotuberculosis*, sendo que as células de camundongos BALB/c utilizam preferencialmente a via da arginase e possivelmente as células de camundongos C57BL/6 fazem a via da iNOS. A ausência da produção de NO nessa linhagem no 1º dia pós-infecção pode ser resultante do baixo número de células utilizadas no teste.

No 5º dia pós-infecção, ocorreu aumento na produção de NO por macrófagos e células dendríticas de ambas as linhagens estudadas, com as maiores elevações mantendo-se na linhagem C57BL/6, observações que sugerem a importância da ação do NO na fase de resolução da infecção. A importância da produção de NO, mediada por iNOS, na defesa contra bactérias, já foi reportada em outras infecções, como no caso de *Listeria monocytogenes* (SERBINA et al., 2003). Sub-populações de células dendríticas produtoras de TNF e iNOS foram identificadas no baço de camundongos infectados com *L. monocytogenes*, sendo que a deficiência destas células foi associada com aumento da replicação bacteriana, evidenciando o papel de células dendríticas na defesa imune inata contra bactérias (SERBINA et al., 2003).

Diferentes padrões de ativação de macrófagos apresentam perfis distintos de secreção de citocinas. Em geral, as células denominadas M1 apresentam elevada produção de IL-12 e baixa de IL-10, e são eficientes produtoras de citocinas pró-inflamatórias (IL-1  $\beta$ , TNF, IL-6). Macrófagos denominados M2 exibem um perfil de baixa produção de IL-12 e elevada produção de IL-10, com pequena produção de citocinas pró-inflamatórias (MANTOVANI et al., 2004). Observamos em nosso estudo que, comparando a produção de citocinas por camundongos não infectados de ambas as linhagens analisadas, macrófagos de camundongos C57BL/6 produziram

níveis mais elevados de IL-12 e TNF- $\alpha$ , enquanto macrófagos de camundongos BALB/c apresentaram maiores concentrações de IL-10 e TGF- $\beta$ . De modo semelhante, observamos que células dendríticas de camundongos C57BL/6 controles produziram maiores quantidades de IL-12 e TNF- $\alpha$ , e células dendríticas de camundongos BALB/c liberaram maiores níveis de IL-10, sugerindo que diferentes linhagens de camundongos exibem perfis distintos de ativação também em células dendríticas.

Durante infecção por *Y. pseudotuberculosis*, macrófagos de camundongos C57BL/6 produziram quantidades maiores de IL-12 e TNF- $\alpha$ , comparados aos macrófagos de camundongos BALB/c, que, por sua vez, exibiram maior produção de IL-10 e TGF- $\beta$ . A determinação da produção de citocinas por células dendríticas de camundongos infectados mostrou que as células de camundongos C57BL/6 e BALB/c apresentaram comportamentos similares aos macrófagos, com camundongos C57BL/6 exibindo os maiores níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$ , e camundongos BALB/c apresentando as mais elevadas concentrações de IL-10. Estes resultados indicam que a infecção não alterou o padrão de ativação de macrófagos e células dendríticas de ambos os camundongos.

Em 12 horas e 1º dia pós-infecção, observamos aumento na produção de IL-10 por macrófagos e células dendríticas de ambas as linhagens de camundongos, C57BL/6 e BALB/c mais predominante nos camundongos BALB/c. IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, que incluem a inibição da função de macrófagos e células dendríticas, supressão da secreção de citocinas pró-inflamatórias (O'GARRA e VIEIRA, 2007) e produção de NO (TER STEEGE et al., 2000). Estudos demonstram que o LcrV, antígeno secretado pela *Yersinia*, tem a capacidade de modular as respostas imunes. Sing et al. (2002), verificaram que o LcrV induz a produção de IL-10 em infecção com *Y. enterocolitica*, e que a ausência dessa citocina está relacionada com a resistência à infecção. Bröms et al. (2007), demonstraram que a diminuição da secreção de LcrV atenua a virulência de *Y. pseudotuberculosis*.

O aumento da produção de IL-10, no início da infecção, foi acompanhado de diminuição da produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  em macrófagos e células dendríticas de camundongos C57BL/6 e BALB/c. A investigação dos efeitos do LcrV e YopB sobre a função de macrófagos infectados *in vitro* com *Y. pestis*, mostrou diminuição na produção de TNF- $\alpha$ , KC e IL-12, evidenciando a função desses fatores na virulência da bactéria (SHARMA et al., 2004). Do mesmo modo, *Y. enterocolitica* suprime a produção de TNF- $\alpha$ , KC e IL-12 em células dendríticas. A infecção de camundongos com a bactéria curada do plasmídeo de virulência resultou na produção de ambas as citocinas (ERFURTH et al., 2004).

Em 12 horas e 1º dia pós-infecção, detectamos produção de TGF- $\beta$  por macrófagos de ambas as linhagens, com níveis mais elevados nos camundongos BALB/c. TGF- $\beta$  é uma citocina imunorregulatória que inibe a ativação de macrófagos e limita a produção de intermediários reativos do nitrogênio e oxigênio (BOGDAN et al., 1993; TSUNAWAKI et al., 1998). A elevação da produção de TGF- $\beta$  foi acompanhada de diminuição na produção de NO, indicando possível ação inibidora dessa citocina.

No 3º e 5º dias pós-infecção, houve uma redução na produção de TGF- $\beta$  por macrófagos de camundongos BALB/c, e ausência de produção em macrófagos de camundongos C57BL/6, coincidindo com a elevação nos níveis de NO, em ambas as linhagens de camundongos. Há uma correlação inversa entre a produção de NO e TGF- $\beta$ , assim as respostas M1 e M2 ocorrem em parte devido à regulação autócrina dos macrófagos (MILLS et al., 2000).

No curso da infecção, observamos diminuição na produção de IL-10 e aumento nas concentrações de IL-12 e TNF- $\alpha$ , tanto em macrófagos como em células dendríticas, nos camundongos C57BL/6 e BALB/c. IL-12 e TNF- $\alpha$  são mediadores de resposta imune inflamatória em mamíferos. IL-12 induz produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , aumenta a citotoxicidade de células NK e estimula a proliferação de linfócitos T (DEL VECCHIO et al., 2007). TNF- $\alpha$  age estimulando a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos. Ambas as citocinas são essenciais para resolução da infecção por *Yersinia* (AUTENRIETH et al., 1994; BOHN e AUTENRIETH, 1996).

A determinação da produção de IL-4 por células dendríticas mostrou ausência da secreção desta citocina nos camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e durante todo o período da infecção. IL-4 é um importante fator de diferenciação para células Th2 (MURPHY e REINER, 2002). Esperavamos determinar produção de IL-4 nos camundongos BALB/c, a ausência na secreção da citocina pode ser resultante do reduzido número de células utilizadas no experimento. Um paradoxo surge, IL-4 é requerida para geração de células Th<sub>2</sub>, tipo celular que é seu maior produtor (AMSEN et al., 2004). A existência de sinais independentes de IL-4 é sugerida por estudos que observaram ocorrência de respostas Th2 após infecções parasitárias em camundongos deficientes de STAT6, um fator requerido para sinalização do receptor de IL-4 (FINKELMAN et al., 2000; JANKOVIC et al., 2000).

Células T desenvolvem papel importante na defesa do sistema imune contra *Yersinia*. Um dos mecanismos utilizados por estas bactérias para subverter a resposta imune do hospedeiro é inibir a apresentação de seus antígenos, e assim impedir a estimulação e proliferação de células T (KRAMER e WIEDIG, 2005). No início da infecção por *Y. pseudotuberculosis*, nós observamos diminuição na capacidade de imunoestimulação de macrófagos e células dendríticas, com menor

proliferação de células T em camundongos BALB/c. Estes resultados indicam que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* influencia a capacidade de apresentar antígenos, e sugere que células apresentadoras de antígenos de camundongos BALB/c são mais suscetíveis à infecção.

No 3º dia pós-infecção, macrófagos adquiriram a capacidade de estimular as células T, ocorrendo maior proliferação de linfócitos T de camundongos C57BL/6. O mesmo foi observado com células dendríticas no 5º dia pós-infecção, quando verificamos maior estimulação de células T comparada aos controles não infectados, com maior proliferação em camundongos C57BL/6. O aumento na estimulação de linfócitos T por macrófagos e células dendríticas coincide com a elevação na produção de IL-12, sugerindo a ação desta citocina na proliferação de células T.

Schoppet, et al. (2000), em estudo *in vitro* com *Y. enterocolitica* observaram que a redução na capacidade imunoestimulatória das células dendríticas pode resultar da diminuição da expressão de moléculas de superfície, como os produtos do MHC de classe II, que são fundamentais para apresentação de antígenos e interação entre células dendríticas e linfócitos T.

Adkins, et al. (2008), sugeriram que a perturbação na função de apresentação de antígenos de células dendríticas infectadas com *Y. enterocolitica*, pode estar relacionada com deficiência no processamento de antígenos.

Estudos demonstram que YopP/YopJ interfere com a via de sinalização NF- $\kappa$ B e várias MAP Kinases (MAPK), resultando em inibição da produção de citocinas e indução da apoptose em macrófagos (ORTH et al., 1999; RUCKDESCHEL et al., 2001; DENECKER et al., 2001). A incubação de células dendríticas infectadas com *Y. enterocolitica* com diferentes inibidores de MAPK, provocou a diminuição da capacidade destas células estimularem a proliferação de células T. A análise da expressão de moléculas de MHC de classe II e moléculas CD80 na superfície das células dendríticas após o tratamento com os inibidores de MAPK, mostrou que a inibição de MAPK não alterou a expressão destas moléculas. A determinação da capacidade destas células dendríticas capturarem antígenos indicou deficiência no seu mecanismo de endocitose. Os dados sugerem que a infecção por *Y. enterocolitica* diminui a capacidade de apresentação de antígenos de células dendríticas por inibir MAPK (AUTENRIETH et al., 2007).

A análise da expressão de moléculas do MHC de classe II na superfície de células dendríticas de camundongos infectados mostrou pequena diminuição no 1º dia pós-infecção, nas células da linhagem BALB/c e C57BL/6. A discreta redução obtida sugere que a infecção pode influenciar a expressão de moléculas de superfície em células dendríticas, contudo outros mecanismos podem contribuir para a diminuição da sua capacidade imunoestimulatória, como a inibição da via das MAPK.

A determinação das sub-populações de células dendríticas presentes no baço dos camundongos infectados e controles mostrou que, camundongos C57BL/6 e BALB/c não infectados apresentaram discreta diferença na composição da população de células dendríticas esplênicas, com camundongos C57BL/6 apresentando pequeno aumento na sub-população CD11b<sup>+</sup>, resultado reproduzido em todo o período da infecção. Dudziak et al. (2007), demonstraram que células dendríticas CD11b<sup>+</sup> são especializadas no processamento de antígenos exógenos para apresentação em associação com moléculas de MHC de classe II, processo que realizam com grande eficiência. Sendo as bactérias do gênero *Yersinia* predominantemente extracelulares, a presença desta sub-população pode contribuir para resolução da infecção.

De maneira geral, nós encontramos que, durante a infecção por *Y. pseudotuberculosis*, macrófagos e células dendríticas de camundongos BALB/c produziram níveis mais elevados de IL-10, utilizaram preferencialmente a via da arginase para metabolismo de L-arginina e apresentaram maior redução na capacidade de estimular células T, além do aumento na produção de TGF- $\beta$  por macrófagos. Em oposição, macrófagos e células dendríticas de camundongos C57BL/6 produziram as maiores quantidades de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO, e estimularam a proliferação de linfócitos T de maneira mais eficaz.

Estes resultados sugerem que a deficiência da ativação de macrófagos e células dendríticas em camundongos BALB/c pode contribuir para a suscetibilidade desta linhagem à infecção por *Yersinia*.

Outros estudos são necessários para melhor compreensão do envolvimento de macrófagos e células dendríticas na suscetibilidade e resistência à *Y. pseudotuberculosis*, a fim de se explorar a possibilidade de tornar a resposta imune mais eficaz.

## 6. CONCLUSÕES

- A infecção por *Yersinia pseudotuberculosis* diminui discretamente a expressão de moléculas do MHC de classe II na superfície de células dendríticas de camundongos C57BL/6 e BALB/c, e não altera a composição das subpopulações de células dendríticas presentes no baço.

- A infecção por *Yersinia pseudotuberculosis* provoca diminuição na produção de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos e células dendríticas, e estimula a produção de IL-10 por estas células. A infecção também aumenta a secreção de TGF- $\beta$  por macrófagos.

- Camundongos BALB/c infectados apresentaram maior diminuição na produção de NO e atividade da arginase mais elevada que camundongos C57BL/6.

- Camundongos C57BL/6 infectados produzem níveis mais elevados de IL-12 e TNF- $\alpha$  do que os camundongos BALB/c.

- Camundongo BALB/c infectados produzem níveis mais elevados de IL-10 e TGF- $\beta$  do que os camundongos C57BL/6.

- A infecção provoca uma maior diminuição na capacidade de apresentação de antígenos de macrófagos e células dendríticas dos camundongos suscetíveis (BALB/c) do que dos camundongos resistentes (C57BL/6), no início da infecção.

- A infecção não alterou o padrão M1 para macrófagos de camundongos C57BL/6 e M2 para macrófagos de camundongos BALB/c. Do mesmo modo, não foi observado alteração na ativação de células dendríticas das linhagens de camundongos durante a infecção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, M.; GALLOWAY, A.; CUNNINGHAM, J. L. Haemochromatosis presenting with a double *Yersinia* infection. **J Infect**, v.13, p.143-145, 1986.

ACKERMAN, A. L.; KYRITSIS, C.; TAMPE, R.; CRESSWELL, P. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. **Nat Immunol**, v.6, p.107-113, 2005.

ADAMS, S.; O'NEILL, D.W.; BHARDWAJ, N. Recent advances in dendritic cell biology. **J Clin Immunol**, v.25, p.87-98, 2005.

ADKINS, I.; KÖBERLE, M.; AUTENRIETH, S. E.; BOHN, E.; BORGMANN, S.; AUTENRIETH, I. B. *Y. Enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. **Microbes Infect**, v.6, p.1-9, 2008.

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

ADLER, H.; BELAND, J. L.; DEL-PAN, N. C.; KOBZIK, L.; BREWER, J. P.; MARTIN, T. R.; RIMM, I J. Suppression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced pneumonia in mice by inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2). **J Exp Med**, v.185, p.1533-1540, 1997.

AMSEN, D.; BLANDER, J. M.; LEE, G. R.; TANIGAKI, K.; HONJO, T.; FLAVELLI, R. A. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. **Cell**, v.117, p. 515-526, 2004.

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

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

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

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

AUTENRIETH, S. E.; SOLDANOVA, I.; ROSEMANN, R.; GUNST, D.; ZAHIR, N.; KRACHT, M.; RUCKDESCHEL, K.; WAGNER, H.; BORGMANN, S.; AUTENRIETH, I. B. *Yersinia enterocolitica* YopP inhibits MAP Kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells. **Cell Microbiol**, v.9, p.425-437, 2007.



BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v.18, p.767-811, 2000.

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

BLISKA, J. B.; BLACK, D. S. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. **Infect Immun**, v.63, p.681-685, 1995.

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

BOGDAN, C.; NATHAN, C. Modulation of immune macrophages function by transforming growth factor beta, interleukin-4 and interleukin-10. **Ann Acad Sci**, v.685, p.713-739, 1993.

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

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

BRÖMS, J.E.; FRANCIS, M. S.; FORSBERG, A. Diminished LcrV secretion attenuates *Yersinia pseudotuberculosis* virulence. **J Bacteriol**, v.189, p.8417-8429, 2007.

BRONTE, V.; SERAFINI, P.; MAZZONI, A.; SEGAL, D. M.; ZANOVELLO, P. L. Arginase metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. **Trends Immunol**, v.24, p. 301-305, 2003.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature Rev Immunol**, v.5, p.641-654, 2005.

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

CARNIEL, E. The plague. **C R BIOL**, v.325, p.851-853, 2002.

CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. Animal models for human disease. **Am J Pathol**, v.81, p.703-705, 1975.

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

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

- CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLLEL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **J Immunol Methods**, v.174, p.231-235, 1994.
- DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat Rev Cancer**, v.6, p.24-37, 2006.
- DEL VECCHIO, M.; BAJETTA, E.; CANOVA, S.; LOTZE, M. T.; WESA, A.; PARMIANI, G.; ANICHINI, A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. **Clin Cancer Res**, v. 13, p.467-485, 2007.
- DENECKER, G.; DECLERCQ, W.; GEUIJEN, C. A.; BOLAND, A.; BENABDILLAH, R.; VAN, G. M. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. **J Biol Chem**, v.276, p.19706-19714, 2001.
- DENECKER, G.; TOTEMEYER, S.; MOTA, L. J.; TROISFONTAINES, P.; LAMBERMONT, I.; YOUTA, C.; STAINIER, I.; ACKERMANN, M.; CORNELIS, G. R. Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. **Infect Immun**, v.70, p.3510-3520, 2002.
- DUDZIAK, D.; KAMPHORST, A. O.; HEIDKAMP, G. F.; BUCHHOLZ, V. R. TRUMPFHELLER, C.; YAMAZAKI, S.; CHEONG, C.; LIU, K.; LEE, H. W.; PARK, C. G.; STEINMAN R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**, v.315, p.107-111, 2007.
- EBNER, S.; EHAMMER, Z.; HOLZMANN, S.; SCHWINGSHACKL, P.; FORSTNER, M.; STOITZNER, P.; HUEMER, G. M.; FRITSCH, P.; ROMANI, N. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. **Int Immunol**, v.16, p.877-887, 2004.
- ERFURTH, S. E.; GROBNER, S.; KRAMER, U.; GUNST, D. S. J.; SOLDANOVA, I.; SCHALLER, M.; AUTENRIETH, I. B.; BORGMANN, S. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. **Infect Immun**, v.72, p.7045-7054, 2004.
- FINKELMAN, F. D.; MORRIS, S. C.; OREKHOVA, T.; MORI, M.; DONALDSON, D.; REINER, S. L.; REILLY, N. L.; SCHOPF, L.; URBAN, J. F. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. **J Immunol**, v.164, p.2303-2310, 2000.
- GATTI, E.; VELLECA, M. A.; BIEDERMANN, B. C.; MA, W.; UNTERNAEHRER, J.; EBERSOLD, M. W. ; MEDZHITOV, R.; POBER, J. S.; MELLMAN, I. Large-scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized CD34<sub>+</sub> progenitors. **J Immunol**, v.164, p.600-607, 2000.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Rev Immunol**, v.3, p.23-35, 2003.
- GRANUCCI, F.; FOTI, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cell biology. **Adv Immunol**, v.88, p.193-233, 2005.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v.126, p.131-138, 1982.

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

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

GUERMONPREZ, P.; SAVEANU, L.; KLEIJMEER, M.; DAVOUST, J.; VAN ENDERT, P.; AMIGORENA, S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**, v.425, p.397-402, 2003.

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

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

HAWIGER, D.; INABA, K.; DORSETT, Y.; GUO, M.; MAHNKE, K.; RIVERA, M.; RAVETCH, J. V.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **J Exp Med**, v.194, p.769-779, 2001.

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

HEESEMANN, J.; SING, A.; TRÜLSCH, K. *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. **Curr Opin Immunol**, v.9, p.55-61, 2006.

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

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

JAKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; NOBEN-TRAUTH, N.; CASPAR, P.; PAUL, W. E.; SHER, A. Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ Lymphocytes with a Th2 cytokine profile. **J Immunol**, v.164, p.3047-3055, 2000.

JARROSSAY, D.; NAPOLITANI, G.; COLONNA, M.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. **Eur J Immunol**, v.31, p.3388-3398, 2001.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comp Biochem Physiol**, v.114, p.107-132, 1996.

JUNG, S.; UNUTMAZ, D.; WONG, P.; SANO, G.; DE LOS SANTOS, K.; SPARWASSER, T.; WU S.; VUTHOORI S.; KO, K.; ZAVALA, F.; PAMER, E. G.; LITTMAN, D. R.; LANG, R. A. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. **Immunity**, v.17, p.211-220, 2002.

KADOWAKI, N.; HO, S.; ANTONENKO, S.; WAAL MALEFYT, R. DE.; KASTELEIN, A.; BAZAN, F.; LIU, Y. J. Subsets of human dendritic cell precursors express different Tolllike receptors and respond to different microbial antigens. **J Exp Med**, v.194, p.863-869, 2001.

KANYO, Z. F.; SCOLNICK, L. R.; ASH, D. E.; CHRISTIANSON, D. W. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. **Nature**, v.383, p.554-557, 1996.

KERSCHEN, E. J.; COHEN, D. A.; KAPLAN, A. M.; STRALEY, S. C. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. **Infect Immun**, v.72, p.4589-4602, 2004.

KODELJA, V.; MULLER, C.; TENORIO, S.; SCHEBESCH, C.; ORFANOS, C. E.; GOERDT, S. Differences in angiogenic potential of classically vs. alternatively activated macrophages. **Immunobiology**, v.197, p.478-493, 1997.

KRAMER, U.; WIEDIG, C. A. *Y. enterocolitica* translocated Yops impair stimulation of T-cells by antigen presenting cells. **Immunol Lett**, v.100, p.130-138, 2005.

KROHNCKE, K.-D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. **Biol Chem**, v.376, p.327-343, 1995.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses: lineages, plasticity and kinetics. **Curr Opin Immunol**, v.13, p.291-298, 2001.

LIAN, C. J.; HWANG, W. S.; PAI, C. H. Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in *Yersinia enterocolitica*. **Infect Immun**, v.55, p.1176-1183, 1987.

LIU, K.; LYODA, T.; SATERNUS, M.; KIMURA, Y.; INABA, K.; STEINMAN, R. M. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. **J Exp Med**, v.196, p.1091-1097, 2002.

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

MALDONADO-LOPEZ, R.; MALISZEWSKI, C.; URBAIN, J.; MOSER, M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. **J Immunol**, v.167, p.4345-4350, 2001.

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

MAILLIARD, R. B.; WANKOWICZ-KALINSKA, A.; CAI, Q.; WESA, A.; HILKENS, C. M.; KAPSENBERG, M. L.; KIRKWOOD, J. M.; STORKUS, W. J.; KALINSKI, P. Type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. **Cancer Res.**, v.64, p.5934-5937, 2004.

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

MECSAS, J.; BILIS, I.; FALKOW, S. Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. **Infect Immun**, v.69, p.2779-2787, 2001.

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

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

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

MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nat Immunol**, v.1, p.199-205, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, p.55, 1983.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat Rev Immunol**, v.2, p.933-944, 2002.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **J Immunol**, v.160, p.5347-5354, 1998.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORAN, J. M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J Immunol**, v.163, p.3771-3777, 1999.

NAKTIN, J.; BEAVIS, K.G. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. **Clin Lab Med**, v.19, p.523-536, 1999.

NATHAN, C. F.; HIBBS Jr., J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr Opin Immunol**, v.3, p.65-70, 1991.

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

NIESS, J. H.; REINECKER, H. C. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. **Cell Microbiol**, v.8, p.558-564, 2006.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Th1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature**, v.7, p.425-428, 2007.

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

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

PULENDRAN, B. Variagation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. **J Immunol**, v.173, p.2457-2465, 2005.

QI, H.; DENNING, T. L.; SOONG, L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. **Infect Immun**, v.71, p.3337-3342, 2003.

ORTH, K.; PALMER, L. E.; BAO, Z. Q.; STEWART, S.; RUDOLPH, A. E.; BLISKA, J. B. Inhibition of the mitogen-activated protein Kinase Kinase superfamily by a *Yersinia* effector. **Science**, v.285, p.1920-1923, 1999.

RAUH, M. L.; HO, V.; PEREIRA, C.; SHAM, A.; SLY, L. M.; LAM, V.; HUXHAM, L.; MINCHINTON, A. I.; MUI, A.; KRYSTAL, G. SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages. **Immunity**, v.23, p.361-374, 2005.

REIS E SOUSA, C.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr Opin Immunol**, v.11, p.392-399, 1999.

ROBINS-BROWNE, R. M.; TZIPORI, S.; GONIS, G.; HAYES, J.; WITHERS, M.; PRPIC, J. K. The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. **J Med Microbiol**, v.19, p.297-308, 1985.

ROSQVIST, R.; BOLIN, I.; WOLF-WATZ, H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. **Infect Immun**, v.56, p.2139-2143, 1988.

ROSSI, M.; YOUNG, J. W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. **J Immunol**, v.175, p.1373-1381, 2005.

RUCKDESCHEL, K.; RICHTER, K.; MANNEL, O.; HEESEMANN, J. Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages. **Infect Immun**, v.69, p.7652-7662, 2001.

SCANDELLA, E.; MEN, Y.; GILLESSEN, S.; FORSTER, R.; GROETTRUP, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v.100, p.1354-1361, 2002.

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

SERBINA, N. V.; SALAZAR-MATHER, T. P.; BIRON, C. A.; KUZIEL, W. A.; PAMER, E. G. TNF- $\alpha$ -iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v.19, p.59-70, 2003.

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

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Rev Immunol**, v.2, p.151-161, 2002.

SIMONET, M.; RICHARD, S.; BERCHE, P. Electron microscopic evidence for *in vivo* extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. **Infect Immun**, v.58, p.841-845, 1990.

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

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

SONG, E.; OUYANG, N.; HORBELT, M.; ANTUS, B.; WANG, M.; EXTON, M. S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. **Cell Immunol**, v.204, p.19-28, 2000.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v.21, p.685-711, 2003.

SZABOLCS, P.; AVIGAN, D.; GEZELTER, S.; CIOCON, D. H.; MOORE, M. A. S.; STEINMAN, R. M.; YOUNG, J. W. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-CFU intermediate. **Blood**, v.87, p.4520-4530, 1996.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v.23, p.901-944, 2005.

TER STEEGE, J.C.; VAN DE VEN, W.C.; FORGET, P.P.; BUURMAN, W.A. Regulation of lipopolysaccharide-induced NO synthase expression in the major organs in a mouse model. The roles of endogenous interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10. **Eur Cytokine Netw**, v.11, p.39-46, 2000.

TRINCHIERI, G.; Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu Rev Immunol**, v.13, p.251-276, 1995.

TRÜLZSCH, K.; SPORLEDER, T.; RUCKDESCHEL, K.; HOFFMANN, R.; HEESEMANN, J.; RUSSMANN, H. *Yersinia* outer protein p inhibits cd8 t cell priming in the mouse infection model. **J Immunol**, v.174, p.4244-4251, 2005.

TSUNAWAKI, S.; SPORA, M.; DING, A.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor beta. **Nature**, v.334, p.260-262, 1998.

TUMITAN, A.R.P.; MONNAZZI, L.G.S.; GHIRALDI, F.R.; CILLI, E.M.; MEDEIROS, B.M.M. Pattern of macrophage activation in *Yersinia*-resistant and *Yersinia*-susceptible strains of mice. **Microbiol Immunol**, v.51, p.1021-1028, 2007.

TZIPORI, S.; ROBINS-BROWNE, R.; PRPIC, J. K. Studies on the role of virulence determinants of *Yersinia enterocolitica* in gnotobiotic piglets. *Contrib, Microbiol Immunol*, v.9, p.233-238, 1987.

VOGEL, U.; AUTENRIETH, I. B.; BERNER, R.; HEESEMANN, J. Role of plasmid encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* in humoral immunity against secondary *Y. enterocolitica* infection in mice. **Microb Pathog**, v.15, p.23-36, 1993.

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



## CAPÍTULO II

**Susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* infection is linked to the pattern of macrophage activation.**

Aline Tansini<sup>a</sup>

Beatriz Maria Machado de Medeiros<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UNESP – São Paulo State University, School of Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences, Araraquara, SP Brazil.

**Corresponding author:**

Beatriz Maria Machado de Medeiros

UNESP – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas –  
Departamento de Ciências Biológicas

Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

Telephone: 055 (16) 3301-6949; FAX: 055 (16) 3301-6940

E-mail: medeiros@fcar.unesp.br

**Short title:** Macrophage activation in *Yersinia* infection

**Abstract**

Th1 cells play a crucial role in the clearance of *Yersinia pseudotuberculosis* infection. By producing cytokines and presenting antigens to T cells, activated macrophages can orientate the adaptive immune response. The pathway used by macrophages to metabolize arginine has been employed as an important parameter to discriminate their activation state. In this study, the pattern of macrophage activation in *Y. pseudotuberculosis*-infected BALB/c (*Yersinia*-susceptible) and C57BL/6 (*Yersinia*-resistant) mice and their immunostimulatory capacity were analyzed. In the early phase of infection, macrophages obtained from C57BL/6 mice produced higher levels of NO, lower levels of urea, and larger amounts of IL-12 and TNF- $\alpha$  than macrophages from BALB/c mice. On the other hand, macrophages derived from BALB/c mice produced higher levels of IL-10 and TGF- $\beta$  than C57BL/6 mice. The *Y. pseudotuberculosis* infection leads to a fall in the immunostimulatory capacity of BALB/c mouse macrophages, with T-cell proliferation significantly reduced at 12h after infection. These results suggest that the pattern of macrophage activation is associated with susceptibility and resistance to *Y. pseudotuberculosis* infection in BALB/c and C57BL/6 mice.

**Keywords:** *Yersinia pseudotuberculosis*; macrophages; nitric oxide; arginase; cytokines; T-cell activation.

## Introduction

*Y. pseudotuberculosis* is an enteropathogen that causes gastrointestinal disorders, usually self-limiting enteritis and mesenteric lymphadenitis (1). In the mouse oral infection model, enteropathogenic yersiniae produce systemic disease, the bacteria replicating in the small intestine, invading the Peyer's patches and disseminating to the liver and spleen (2,3).

Several virulence factors have been identified that promote resistance to mouse serum, coordinate gene expression, and enable the acquisition of iron by the bacterium (4). *Yersinia* contains an extrachromosomal 70Kb plasmid, essential for pathogenicity, which encodes the type III protein secretion system (TTSS), the Yop effector proteins and nonfimbrial adhesin Yad A (5,6). The type III secretion system is used to inject effector proteins from the bacterial cytoplasm into the cytosol of a host cell. Once inside the cell, the Yop effectors interfere with signaling pathways involved in the regulation of the actin cytoskeleton, phagocytosis, apoptosis and the inflammatory response, thus favoring survival of the bacteria (6).

The early control of infection with *Yersinia* is mediated by mechanisms of innate immunity, involving macrophages, NK cells and neutrophils (7,8,9). Thereafter, these defense mechanisms are constrained by an adaptive immune response, and the resolution of the infection is mediated by CD4<sup>+</sup> Th1 cells that produce cytokines such as IFN- $\gamma$  and IL-2 (8,9). An effective way for *Yersinia* to subvert this immune response would be to inhibit the presentation of its antigens by antigen presenting cells (APCs) and thus impair T-cell stimulation (10).

By producing diverse molecules and presenting antigens to T cell, macrophages are able to orientate the adaptive immune response, leading to the expansion and differentiation of specific lymphocytes (11). Microbial antigens, tumor products, effector T cells and their secretory products influence the heterogeneity and the state of activation of macrophage populations (12,13).

Classical macrophage activation is characterized by: high interleukin-12 (IL-12) production, activating a type I response, and high production of toxic intermediates, such as

nitric oxide (NO) and reactive oxygen intermediates (ROI) (14). Many have referred to cells activated in this way as M1 (15). Macrophages exposed to immune complexes, IL-4, IL-13 and IL-10, undergo an alternative form of activation, characterized by an IL-10<sup>high</sup> and IL-12<sup>low</sup> phenotype, and promote a type II response (14,16). These alternatively activated macrophages are called M2 (15).

L-arginine metabolism in macrophages has been used as an important parameter to discriminate between classically and alternatively activated macrophages (12). A major effector pathway of inflammatory macrophages is mediated by NO, synthesized from arginine by inducible NO synthase (iNOS) (13,17). The alternative metabolic pathway for arginine is catalyzed by arginase, which converts arginine to ornithine and urea (13). It has been shown that macrophages from Th1 strains of mice (C57BL/6, B10D2) preferentially use the iNOS pathway and macrophages from Th2 strains of mice (BALB/c, DBA/2) preferentially use the arginase pathway (15).

It is possible that susceptibility or resistance to *Y. pseudotuberculosis* infection correlates with the activation state of macrophages. We have recently demonstrated that the predominant macrophage population (M1 or M2) at the early period of infection seems to be important in determining *Y. enterocolitica* susceptibility or resistance in mice (18). However, there are few studies involving the responses of M1 and M2 macrophages in *Y. pseudotuberculosis* infection. Thus, this study was designed to reveal the pattern of macrophage activation in *Y. pseudotuberculosis* infection of BALB/c (*Yersinia*-susceptible) and C57BL/6 (*Yersinia*-resistant) mice and the immunostimulatory capacity of these cells.

## Material and methods

### *Bacterial strain*

*Yersinia pseudotuberculosis* YpIIIpIB1, bearing the virulence plasmid, was generously provided by Dr. Hans Wolf-Watz (Umeå University, Sweden).

### *Animals*

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

### *Experimental infection of mice*

Groups of 16 mice were infected by gavage with 0.25 mL of a bacterial suspension containing  $10^7$  CFU/mL. Groups of 16 uninfected mice were used as controls. Four mice from each group were sacrificed at intervals of 12h, 1d, 3d and 5d day after infection, with carbon dioxide.

### *Peritoneal macrophage culture*

Macrophages were collected from the peritoneal cavities of infected and control mice in 5.0 mL of sterile PBS, pH 7.4. The cells were washed twice by centrifugation at  $200 \times g$  for 5 min at 4°C and 100  $\mu$ L were plated in microplates at  $2.5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 (Gibco), supplemented with HEPES (12.5 mM), sodium bicarbonate (2 g/L), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL),  $5 \times 10^{-2}$  M 2-mercaptoethanol (Sigma) and 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab). Adherent and nonadherent cells were separated by plate

inversion after 1 h incubation at 37°C, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity. Macrophages were then cultured in supplemented RPMI 1640 in the presence of either 10 µg/mL of lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O111 B4, Sigma) or 10 µg /mL of heat-killed *Yersinia* antigen (HKY) or without antigenic stimulation. Supernatants were removed after 48 h and tested for NO and cytokine (IL-10, IL-12, TNF-α, TGF-β) production. Arginase activity was measured in macrophage lysates.

#### *Nitric oxide production*

NO production by macrophages was determined by measuring nitrite, employing the method of Green et al. (19). Briefly, 50 µL of cell supernatant was removed from each well and incubated with an equal volume of Griess reagent (1% w/v sulfanilamide, 0.1% w/v naphthylethylene diamine dihydrochloride, 3.0% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) at room temperature for 10 min. Absorbance at 550 nm was determined with an ELISA microplate reader (Model 550, BioRad). Nitrite concentration was calculated from an analytical curve for NaNO<sub>2</sub>.

#### *Determination of arginase activity*

Arginase activity was measured in cell lysates (20). Briefly, cells were lysed with 100 µL of 0.1% Triton X-100. After 30 min. on a shaker, 100 µL of 25mM Tris-HCl was added to 100 µL of this lysate, 10 µL of 10 mM MnCl<sub>2</sub> was added, and the enzyme was activated by heating for 10 min at 56°C. Arginine hydrolysis was conducted by incubating the lysate with 100 µL of 0.05 M L-arginine at 37°C for 60 min. The reaction was stopped with 900 µL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%)/ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%)/ H<sub>2</sub>O (1/3/7). The urea concentration was measured at 540nm after addition of 40 µL of α-isonitrosopropiophenone (dissolved in 100% ethanol) followed by heating at 95°C for 30 min. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1µmol of urea per min.

### *IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$ determination*

Cytokines in cell culture supernatants were measured with commercially available kits from BD Biosciences (IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ).

### *Immunization of mice*

BALB/c and C57BL/6 mice were immunized with an intraperitoneal injection of 10  $\mu$ g of HKY mixed with 1mg of aluminium hydroxide in 0.15 M NaCl. Fourteen days later, the mice received a reinforcement dose of 10  $\mu$ g of the antigen in saline solution. Lymphocytes were collected 7 days later, and cocultured with macrophages from mice infected with *Y. pseudotuberculosis* or uninfected.

### *T-cell enrichment*

Lymphocytes were obtained from the spleens of immunized mice using the Pan T-Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec), according to manufacturer's instructions. The cell enrichment process was accompanied by flow cytometry, using anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE and anti-CD8-SPRD (BD-PharMingen). The final cell suspension contained approximately 80% CD3, 50% CD4 and 35% CD8.

### *T-cell antigen-specific activation*

T-cell enriched fractions were seeded in 96-well plates, at a density of  $5 \times 10^5$  cells per well, and cocultured with macrophages ( $2 \times 10^4$  cells/well) from mice infected with *Y. pseudotuberculosis* or uninfected, in the presence of *Yersinia* antigen (HKY), in supplemented RPMI 1640, at 37°C, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity. After 4 days, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) was added to the cultures (5 mg/mL; 10  $\mu$ L per well), which were incubated for an additional 4h. After dissolving the formazan crystals by incubating with isopropanol, the plates were read at 540nm.

### *Statistical analysis*

Results are representative of two independent experiments and are presented as mean  $\pm$  S.D. of triplicate observations. Data were analyzed statistically by Student's *t*-test, using the Origin statistical program, version 5.0.

## **Results**

### **Nitric oxide production by macrophages from C57BL/6 and BALB/c mice**

Macrophages from C57BL/6 control mice produced significantly more NO than macrophages from BALB/c controls (Fig. 1). *Y. pseudotuberculosis* infection led to a decrease in the production of NO by macrophages from BALB/c mice, 12h post-infection, when these cells were stimulated with LPS or HKY. On the 1<sup>st</sup> day post-infection, there was a significant decrease in the production of NO, in both strains of mice, BALB/c macrophages producing around 1.5-fold less NO than those from C57BL/6 mice.

From the 3<sup>rd</sup> day post-infection, an increase in NO production was seen; however, the increase became significant only on the 5<sup>th</sup> day post-infection, in both C57BL/6 and BALB/c mouse cells. The amount of NO produced by macrophages from infected C57BL/6 mice on the 5<sup>th</sup> day post-infection was greater than that for BALB/c mice (about 1.2-fold higher in the cells stimulated with LPS or HKY, and 1.5-fold in macrophages incubated with RPMI medium alone).

### **Arginase activity**

Macrophages from BALB/c control mice exhibited higher arginase activity than macrophages from C57BL/6 controls (Fig. 2). There was no significant difference in arginase activity between macrophages from C57BL/6 and BALB/c mice, 12h after infection.



*Y. pseudotuberculosis* infection led to a significant increase in the arginase activity on the 1<sup>st</sup> day post-infection, macrophages from BALB/c mice showing higher levels than those from C57BL/6 mice (around 1.3-fold higher in the cells stimulated with LPS or HKY).

The arginase activity of the macrophages collected from BALB/c mice on the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> day post-infection stayed high, although at lower levels than on the 1<sup>st</sup> day post-infection. On the other hand, in macrophages from C57BL/6 mice, a significant decrease was observed in the arginase activity on the 5<sup>th</sup> day post-infection, in the cells stimulated with LPS or HKY, the levels being 2.5-fold lower than those obtained in BALB/c mice in the same period.

### **Cytokine production**

Fig. 3 represents the levels of IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  in culture supernatants of macrophages from uninfected or *Y. pseudotuberculosis*-infected mice.

Macrophages from C57BL/6 control mice produced higher levels of IL-12 and TNF- $\alpha$  than macrophages from BALB/c mice. There was no detectable production of TGF- $\beta$  by macrophages from uninfected C57BL/6 mice. Macrophages from BALB/c control mice produced larger amounts of IL-10, and appreciable levels of TGF- $\beta$ .

In the early period of *Y. pseudotuberculosis* infection, there was an increase in the IL-10 and TGF- $\beta$  production, followed by a decrease in the IL-12 and TNF- $\alpha$  production, in both strains of mice. At 12h and 1 day post-infection, macrophages from BALB/c mice produced significantly higher amounts of IL-10 (around 1.9-fold higher at 12h and 1.8-fold at 1 day post-infection) and TGF- $\beta$  (about 5-fold higher when stimulated with HKY and 8-fold higher when incubated with LPS, 12h post-infection) than macrophages from C57BL/6 mice. A small amount of TGF- $\beta$  was produced by macrophages from C57BL/6 mice at 12h and 1 day post-infection. The levels of IL-12 and TNF- $\alpha$  produced by macrophages from BALB/c were lower than those by C57BL/6 mouse cells: BALB/c cells produced levels of IL-12 around 7-fold lower than

C57BL/6 in the early period of infection, and levels of TNF- $\alpha$  3.2-fold lower at 12h post-infection.

On the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> days post-infection an increase in IL-12 and TNF- $\alpha$  levels was observed, followed by a decrease in IL-10 production, in both strains of mice. At these times, macrophages from C57BL/6 mice produced significantly higher levels of IL-12 (about 3.6-fold on the 3<sup>rd</sup> day and 2-fold on the 5<sup>th</sup> day post-infection, in the cells stimulated with LPS or HKY) and TNF- $\alpha$  (approximately 3-fold higher in the macrophages stimulated with HKY) than macrophages from BALB/c mice, and lower levels of IL-10. There was no TGF- $\beta$  production by C57BL/6 cells on the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> day post-infection, while a non-significant amount was produced by BALB/c mouse cells on the 5<sup>th</sup> day post-infection.

### **T-cell antigen-specific activation**

The capacity of macrophages from uninfected or infected mice to present the antigen HKY to naïve T lymphocytes was investigated by using the MTT assay to measure cell proliferation. This method is based on reduction of the tetrazolium salt by living cells to produce a blue formazan.

The results show higher proliferation of T cells obtained from C57BL/6 control mice than of T cells from BALB/c control mice (Fig.4). A decrease in formazan production was noted after 12h and 1 day post-infection, with lower proliferation of T cells obtained from BALB/c mice, indicating a decrease in the immunostimulatory capacity of the BALB/c macrophages. On the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> days post-infection there was an increase in the formazan concentration, with greater production by cells from C57BL/6 mice.

## Discussion

Our results showed that *Yersinia*-resistant and *Yersinia*-susceptible strains of mice have different patterns of macrophage activation, during *Y. pseudotuberculosis* infection.

The NO levels produced by macrophages from C57BL/6 control mice were significantly higher than those produced by macrophages from BALB/c mice. Conversely, the arginase activity of cells from C57BL/6 control mice was significantly lower than that observed for the BALB/c mice. Similarly, macrophages from C57BL/6 infected mice, stimulated with HKY or LPS or unstimulated, produced higher levels of NO and lower arginase activity than equivalent macrophages from BALB/c mice. These results corroborate reports showing that macrophages from Th1 strains of mice are more easily activated for NO production, and macrophages from Th2 strains of mice use the arginase pathway of arginine metabolism (21,22)

At 12h and 1 day after infection, macrophages from C57BL/6 and BALB/c infected mice showed decrease in the NO production when compared with macrophages from control mice. These results suggest that *Y. pseudotuberculosis* infection can interfere with NO production, as described by Pujol and Bliska (23) in experiments where macrophages were infected *in vitro* with *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis*.

Macrophages activated in different patterns display distinct profiles of cytokine secretion. In general, M1 cells have an IL-12<sup>high</sup>, IL-10<sup>low</sup> phenotype, and are efficient producers of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6). M2 macrophages share an IL-12<sup>low</sup>, IL-10<sup>high</sup> phenotype, with low production of proinflammatory cytokines (14). Consistent with these previously published data, our study showed that macrophages from C57BL/6 control mice produced higher levels of IL-12 and TNF- $\alpha$  than macrophages from BALB/c mice. On the other hand, macrophages from BALB/c control mice produced higher amounts of IL-10, and considerable levels of TGF- $\beta$ .

During *Y. pseudotuberculosis* infection, macrophages from C57BL/6 mice produced significantly higher amounts of IL-12 and TNF- $\alpha$ , while macrophages from BALB/c mice produced significant higher amounts of IL-10 and TGF- $\beta$ . These observations suggest that the infection does not change the characteristic pattern of activation of macrophages in these mice.

At 12h and 1 day after infection, there was an increase in the production of IL-10 by macrophages of both strains of mice. Interleukin-10 is a cytokine with broad anti-inflammatory properties that results from its ability to inhibit functions of both macrophages and dendritic cells, including secretion of their proinflammatory cytokines (24) and NO production (25). Sing et al. (2002) reported that low calcium response V (LcrV) or antigen V, a secreted antihost protein with strong immunomodulatory effects that is associated *Yersinia* virulence, inhibits zymosan-induced production of TNF- $\alpha$  by inducing IL-10 (26). The increase of IL-10 production, in the early period of infection, was consistent with the observed decrease of proinflammatory cytokines and NO production in the same period.

In this study, we verified that infection with *Yersinia pseudotuberculosis* exerts a suppressor role on TNF- $\alpha$  and IL-12 production by macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice, corroborating *in vitro* studies that reported the function of LcrV and YopB in the inhibition of the production of TNF- $\alpha$  and IL-12 in murine peritoneal macrophages (27) and revealing one survival mechanism used by this bacterium.

In the early period of infection, significant production of TGF- $\beta$  was seen, with higher levels for BALB/c mice. TGF- $\beta$  is an immunoregulatory cytokine that inhibits the activation of macrophages (28). Possibly the most important deactivating effect of TGF- $\beta$  on macrophages is its ability to limit the production of cytotoxic reactive oxygen and nitrogen intermediates (29). This is coherent with the decrease in NO production seen 12h and 1 day after infection, mainly in macrophages from BALB/c mice.

On the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> days post-infection, there was a decrease in the production of TGF- $\beta$  by macrophages of BALB/c mice, and absence of TGF- $\beta$  production by macrophages of C57BL/6

mice. In the same period, a concomitant increase of NO levels was observed in both strains of mice.

In the course of infection, a decrease of IL-10 production and increase of TNF- $\alpha$  and IL-12 concentrations were observed in macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 are two major mediators of inflammatory responses in mammals (30). IL-12 is a heterodimer cytokine that induces IFN- $\gamma$  production, activates TNF- $\alpha$  and increases NK-cell cytotoxicity, as well as T-cell proliferation (31). The high TNF- $\alpha$  and IL-12 production and lower IL-10 levels that occurred on the 5<sup>th</sup> day post-infection, in macrophages from C57BL/6 mice, were coherent with the increase of NO and decrease of arginase activity.

The T cells play a crucial role in the defense of the immune system against *Yersinia*; an effective way for yersiniae to subvert the host immune response is to inhibit the presentation of their antigens and thus impair T-cell stimulation (10). In the early *Y. pseudotuberculosis* infection, we observed a decrease in the immunostimulatory capacity of macrophages, with lower T-cell proliferation in BALB/c mice. On the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> days post-infection, macrophages acquired the capacity to stimulate T-cells, higher T-cell proliferation occurring in C57BL/6 mice. These results corroborated the published reports, and show that macrophages from BALB/c mice are more susceptible to *Yersinia* infection.

Macrophages from *Yersinia*-resistant and *Yersinia*-susceptible strains not only differ in their ability to be activated in the classical sense, but also respond differently to the same stimuli. It may well be that the susceptibility of BALB/c mice to *Yersinia* is a consequence not only of the weak and delayed T lymphocyte response (30), but also of the deficient activation of macrophages observed early in the infection.

Our results suggest that the deficient activation of macrophages in BALB/c mice (weak levels of NO, high levels of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 and a reduced immunostimulatory capacity) may contribute to the susceptibility of this strain of mice to *Yersinia pseudotuberculosis*.

## Acknowledgments

We thank Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta for technical support. The work reported here was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP/Brazil (grant number 06/06964-8), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP/Brazil (PADC 2006/13-I) and by a fellowship provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES/Brazil (Aline Tansini).

## References

1. Penelope DB, Molly AB, Joan M, Ralph RI. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *J Exp Med* 2006;203:1591-601.
2. Oellerich MF, Jacobi CA, Freund S, et al. *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* 2007;75:3802-11.
3. Viboud GL, Bliska JB. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2005;59:69-89.
4. Carniel E. Plasmids and pathogenic islands of *Yersinia*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002;264:89-108.
5. Navarro L, Alto NM, Dixon JE. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr Opin Microbiol* 2005;8:21-27.

6. Heesemann J, Sing A, Trülsch K. *Yersinia's* stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:55-61.
7. Hanski C, Naumann M, Grutzkau A, Pluschke G, Friedrich B, Hahn H, et al. Humoral and cellular defense against intestinal murine infection with *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1991;59:1106–13.
8. Autenrieth IB, Hantschmann P, Heymer B, Heesemann J. Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiology* 1993;187:1–16.
9. Autenrieth IB, Vogel U, Preger S, Heymer B, Heesemann J. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and Tcell- deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect Immun* 1993;61:2585–95.
10. Kramer U, Wiedig CA. *Y. enterocolitica* translocated Yops impair stimulation of T-cells by antigen presenting cells. *Immunol Lett* 2005;100:130-138.
11. Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 2006;211:487-501.
12. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998;160:5347-54

13. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Rev Immunol* 2005;5:641-54.
14. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophages activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677-86.
15. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000;164:6166-73.
16. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Rev Immunol* 2003;3:23-35.
17. Kröncke, KD, Fehsel, K, Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376:327-43.
18. Tumitan ARP, Monnazzi LGS, Ghiraldi FR, Cilli EM, Medeiros BMM. Pattern of macrophage activation in *Yersinia*-resistant and *Yersinia*-susceptible strains of mice. *Microbiol Immunol* 2007; 51:1021-1028.
19. Green LCD, Wagner DDA, Glogowski J, Skepper PL, Wishnok J, Tannebaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Ann Biochem* 1982;126:131-38.
20. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modollel M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994;174:231-35.



21. Liew, FY, 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. *Eur J Immunol* 1991;21:3009-14.
22. Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 1994;180: 783-93.
23. Pujol C, Bliska JB. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol* 2005;117:216-26.
24. O'Garra A, Vieira P. Th1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature* 2007;7:425-28.
25. Ter Steege JC, Van de Ven WC, Forget PP, Buurman WA. Regulation of lipopolysaccharide-induced NO synthase expression in the major organs in a mouse model. The roles of endogenous interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:39-46.
26. Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM, Heesemann J. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 2002; 168:1315-1321.
27. Sharma RK, Sodhi A, Batra HV, Tuteja U. Effect of rLcrV and rYopB from *Yersinia pestis* on murine peritoneal macrophages *in vitro*. *Immunol Lett* 2004;93:179-87.

28. Tsunawaki S, Spora M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor beta. *Nature* 1998;334:260-62.
  
29. Bogdan C, Nathan C. Modulation of immune macrophages function by transforming growth factor beta, interleukin-4 and interleukin-10. *Ann Acad Sci* 1993;685:713-39.
  
30. Ma X. TNF- $\alpha$  and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. *Microbes Infect* 2001;3:121-9.
  
31. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze M T, Wesa A, Parmiani G, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007;13:4677-85.
  
32. Autenrieth IB, Beer M, Bohn E, Kaufmann SH, Heesemann J. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infect Immun* 1994;62:2590-99.

### Legends to Figures

**Fig. 1** Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) production by murine peritoneal macrophages collected from BALB/c (A) and C57BL/6 (B) mice during *Y. pseudotuberculosis* infection. Cells ( $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were cultured with HKY, LPS or RPMI-1640 medium, and the supernatants were collected after 48h of culture. Nitrite was assayed with Griess reagent. Control refers to average values obtained from uninfected mice throughout the experiment. Results are representative of two independent experiments and are presented as mean  $\pm$  S.D. of triplicate observations. \* $p < 0.05$  vs control and  $\blacklozenge p < 0.05$  vs C57BL/6.

**Fig. 2** Arginase activity in murine peritoneal macrophages collected from BALB/c (A) and C57BL/6 (B) mice during *Y. pseudotuberculosis* infection. Cells ( $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were cultured with HKY, LPS or RPMI-1640 medium for 48h and then macrophages were lysed and arginase activity determined. Control refers to average values obtained from uninfected mice throughout the experiment. Results are representative of two independent experiments and are presented as mean  $\pm$  S.D. of triplicate observations. \* $p < 0.05$  vs control and  $\blacklozenge p < 0.05$  vs C57BL/6.

**Fig. 3** Cytokine production by murine peritoneal macrophages collected from BALB/c and C57BL/6 mice during *Y. pseudotuberculosis* infection. Cells ( $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were cultured with HKY, LPS or RPMI-1640 medium, the supernatants were collected after 48 h of culture and the concentrations of IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  assayed by ELISA. Control refers to average values obtained from uninfected mice throughout the experiment. Results are representative of two independent experiments and are presented as mean  $\pm$  S.D. of triplicate observations. \* $p < 0.05$  vs control and  $\blacklozenge p < 0.05$  vs C57BL/6.

**Fig. 4** Influence of *Y. pseudotuberculosis* infection on the capacity of macrophages to stimulate T-cell proliferation. Murine peritoneal macrophages obtained from BALB/c and C57BL/6 infected mice were cocultured with T cells from immunized mice of the same strain, for 4 days in the presence of HKY. T-cell proliferation was measured by the MTT assay. Results are expressed as the OD at 540 nm, representing the production of formazan, and are presented as mean  $\pm$  S.D. of quadruplicate observations. \* $p < 0.05$  vs control.

FIGURA 1

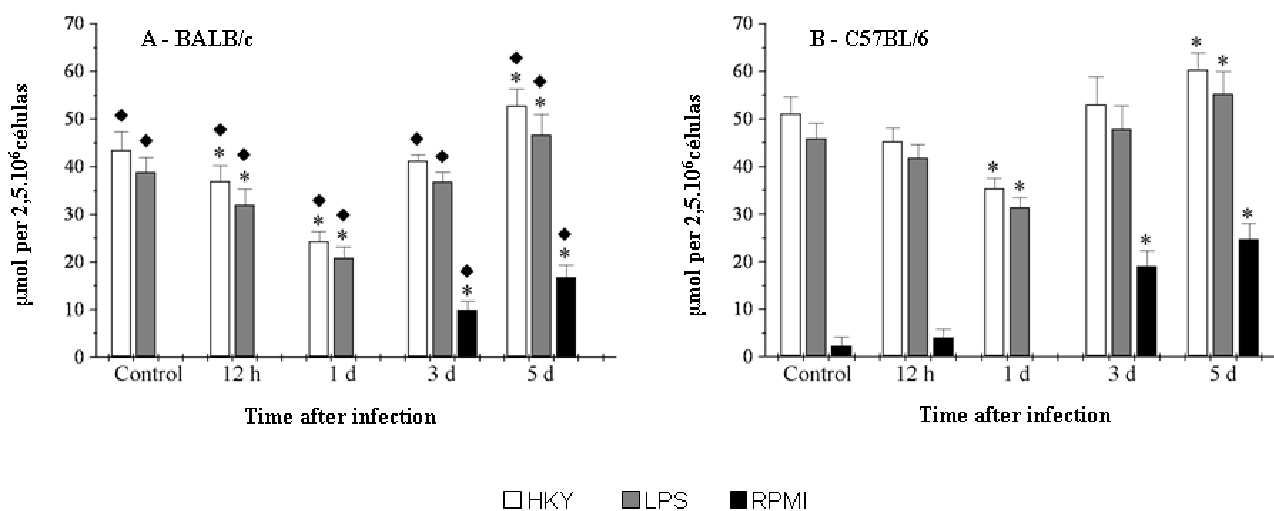


FIGURA 2

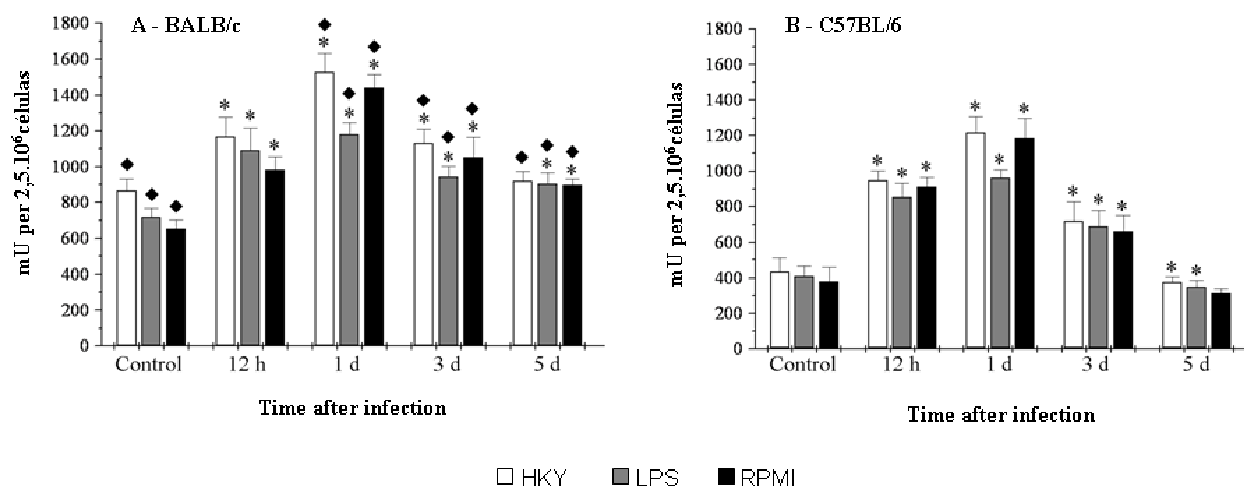


FIGURA 3

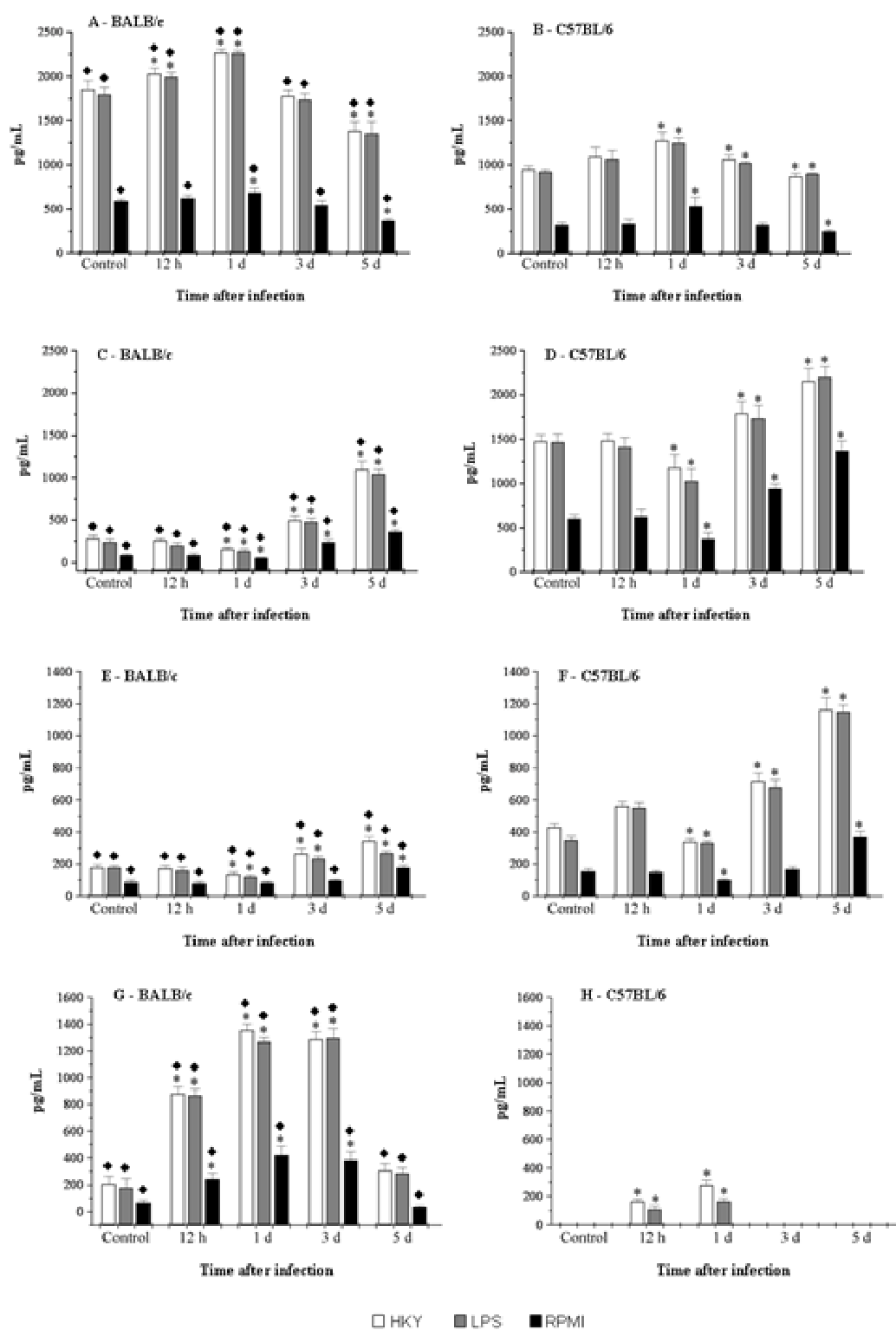
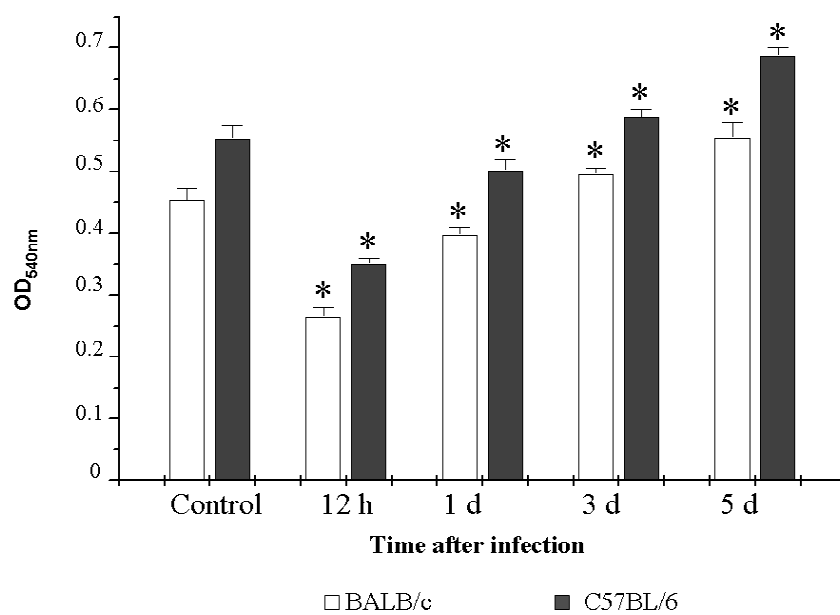


FIGURA 4



[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Beatriz Medeiros

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Scandinavian Journal of Immunology*.

Manuscript ID: SJI-08-156

Title: Susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* infection is linked to the pattern of macrophage activation

Authors: Medeiros, Beatriz  
Tansini, Aline

Date Submitted: 18-Jun-2008

 Print  Return to Dashboard

Manuscript Central™ v4.10 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2007. All Rights Reserved.  
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.  
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 23/2006 – Animais em Pesquisa

Interessado: ALINE TANSINI

Orientador: Profa. Dra. BEATRIZ MARIA MACHADO DE MEDEIROS

Título do Projeto: Influência da infecção por *Yersinia pseudotuberculosis*  
sobre o comportamento das células dendríticas

**Parecer nº 35/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa "Influência da infecção por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre o comportamento das células dendríticas", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 30 de outubro de 2006.



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA VIRGINIA COSTA SCARPA  
Coordenadora do CEP

# 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](#)