

## **INFLUÊNCIA DAS YOPS DE *Yersinia Pseudotuberculosis* NA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS LINFÓCITOS T CD8.**

Fabricio Rodrigues Ghiraldi, Beatriz Maria Machado de Medeiros, Luis Gustavo S. Monnazzi, Valéria A. A. Mallavolta. – Imunologia celular – Farmácia-Bioquímica – Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara.

O gênero *Yersinia* compreende três espécies patogênicas para humanos: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, sendo que as duas últimas causam gastroenterites e linfadenites. A patogenidade de *Yersinia* está fortemente ligada à presença do plasmídeo de 70-kb (pYV) que é encontrado nestas três espécies e codifica um sistema de secreção do tipo III e um conjunto de proteínas reguladas por temperatura ou pelo cálcio, as Yops. Pelo menos seis dessas proteínas, YopH, YopE, YopJ, YpkA, YopM e YopT, são consideradas efetoras e seriam ativas na célula do hospedeiro. O contato celular direto, em combinação com a maquinaria de secreção do tipo III, permite que a bactéria transloque as Yops de seu citoplasma diretamente para o citoplasma da célula do hospedeiro, modificando as funções da mesma (CORNELIS & WOLF-WATZ, 1997; CORNELIS et al., 1998). Estas proteínas relacionam-se, dentre outras coisas, com a inibição da fagocitose, indução de apoptose e interferência nas vias de sinalização das células do hospedeiro, propiciando à *Yersinia* sobreviver no interior do mesmo.

A defesa inata do hospedeiro controla, inicialmente, a infecção por *Yersinia*, porém uma resposta adaptativa se faz necessária para superá-la. Tanto os anticorpos específicos como as células T CD4 e CD8 e a produção de IFN- $\gamma$  têm um papel essencial no controle da infecção por *Yersinia*; no entanto, a importância da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8 (LT-CD8) não está bem esclarecida. Nosso grupo verificou que as Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis* exercem um efeito supressor sobre os macrófagos murinos, no que se refere à produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-12) e NO (MONNAZZI, et al, 2004). Ainda com o intuito de estudar mais a fundo as maneiras pelas quais esta bactéria influencia a resposta imune adaptativa do hospedeiro e, ao mesmo tempo, como este responde, avaliou-se, neste trabalho, a influência das Yops sobre a função citotóxica dos LT CD8.

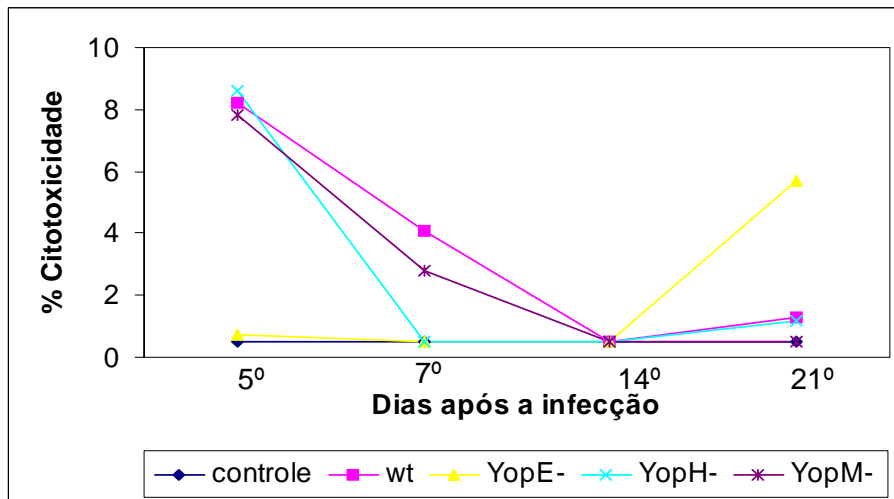
Para isto, os camundongos destinados à obtenção de células do exsudato peritoneal foram previamente inoculados com 3,0ml de Tioglicolato 3% pela via intraperitoneal a fim de estimular os macrófagos desta cavidade. Após 3 dias de estímulo, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal exposta. Foram inoculados nesta cavidade 5,0ml de PBS estéril gelado e, através de massagem do peritônio, as células foram desprendidas e coletadas. As células foram então lavadas de 2 a 3 vezes por centrifugação a 358 x g (Centrífuga Fanem Excelsa II 206MP) durante 5 minutos em PBS estéril e, em seguida, ressuspensas em 1ml de RPMI-1640 para contagem em câmara de Neubauer. Os macrófagos peritoneais de camundongos, obtidos como descrito, foram infectados com a amostra selvagem da bactéria. Para isso, a suspensão de macrófagos ajustada à  $5 \times 10^5$  células/mL foi distribuída em uma placa de microcultivo, no volume de 100 $\mu$ L por cavidade e, sobre estas células, foram adicionados 100 $\mu$ L de uma suspensão bacteriana, preparada com a amostra selvagem da *Y. pseudotuberculosis*, na concentração de  $5 \times 10^6$  bactérias/mL; fornecendo um MOI de 1:10. A placa foi centrifugada a 250 x g por 5 minutos e incubada durante 1 hora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Terminada esta incubação, as células foram lavadas duas vezes com RPMI-1640 a fim de se remover as bactérias não internalizadas e, em seguida, incubadas por igual período e nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO<sub>2</sub> com 100 $\mu$ L por cavidade de uma solução de Gentamicina 100 $\mu$ g/mL. Ao final deste período, os macrófagos devidamente infectados foram lavados com RPMI-1640 encontrando-se, agora, prontos para participar do ensaio de citotoxicidade.

No 5º, 7º, 14º e 21º dia após a infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* (amostras mutantes para Yop E, Yop H, Yop M e amostra selvagem) foram obtidas as células esplênicas, de três animais por dia, para se fazer um “pool”. Os LT-CD8 presentes neste “pool” foram purificados através de passagem em coluna de enriquecimento para LT-CD8 (R&D MCD8C-1000) e então cocultivados, em placa de 96 cavidades, com os macrófagos infectados. Um ensaio de citotoxicidade não radioativo (DUBE et al., 2004) foi realizado utilizando-se o kit CYTO-TOX 96 (Promega). Os macrófagos peritoneais de camundongos, obtidos e infectados como descrito acima, serviram como células apresentadoras de antígenos (CAA) que são as células-alvo da reação. As

CAAs foram incubadas durante 4 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> com 10<sup>6</sup> LT-CD8/mL provenientes dos animais infectados com as respectivas amostras bacterianas ou dos animais controles. Após esta incubação, a placa foi centrifugada a 250 x g, 4°C por 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa de 96 cavidades (50µL/cavidade). Foi adicionado aos sobrenadantes igual volume de substrato e a placa foi novamente incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao término deste período, a reação foi interrompida através da adição de 50µL por cavidade da solução de parada fornecida pelo kit. A citotoxicidade foi determinada espectrofotometricamente (490nm) através da análise da liberação de lactato desidrogenase (LDH) resultante da lise das CAAs pela ação dos LT-CD8. A lise específica foi calculada da seguinte forma: % de citotoxicidade = (A – B – C) / (D – C) x 100, onde A é o valor de lise obtido a partir da incubação das CAAs com os linfócitos dos animais infectados ou com os linfócitos dos animais controles (Lise Experimental), B constitui a lise espontânea dos LT-CD8, C corresponde à liberação espontânea de LDH pelos macrófagos e D à liberação máxima de LDH pelos macrófagos.

Pôde-se observar que as amostras wt, YopH<sup>-</sup> e YopM<sup>-</sup> apresentaram um perfil citotóxico bastante semelhante. Todas elas induziram uma pequena atividade citotóxica dos linfócitos T no 5º dia após a infecção, a qual foi diminuindo até tornar-se nula no 14º dia. No 21º dia após a infecção, os LT-CD8 dos animais infectados com as amostras wt e YopH<sup>-</sup> apresentaram pouca atividade citotóxica, enquanto que as células obtidas dos animais infectados com a amostra mutante para a secreção da YopM<sup>-</sup>, neste mesmo dia, continuaram não apresentando citotoxicidade. Os animais infectados com a amostra YopE<sup>-</sup> diferiram dos demais uma vez que, logo no 5º dia pós infecção, apresentaram uma atividade citotóxica extremamente baixa, praticamente nula. Apenas no 21º dia após a infecção observou-se o aparecimento desta atividade, a qual foi relativamente alta quando comparada com as atividades apresentadas pelos LT-CD8 dos animais infectados com as outras amostras bacterianas neste mesmo dia (Figura 1).

Concluimos que a YopE é importante na indução da citotoxicidade dos LT-CD8 uma vez que, durante a infecção com a amostra bacteriana que não secreta esta proteína, a atividade citotóxica ocorreu mais tardiamente.



**Figura 1** - Valores de citotoxicidade, em %, apresentados pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> obtidos de animais infectados com amostra selvagem e as mutantes de *Y. pseudotuberculosis*, nos diferentes dias após a infecção.

### Referências Bibliográficas:

- CORNELIS, G.R.; WOLF-WATZ, H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukariotic cells. **Mol. Microbiol.**, v.23, p.861-867, 1997.
- CORNELIS, G.R.; BOLAND, A.; BOYD, A.P.; GEUIJEN, C.; IRIARTE, M.; NEYT, C.; SORY, M.P.; STAINIER, I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p.1315-1352, 1998.

DUBE P.H.; HANDLEY S.A.; LEWIS J.; MILLER V.L. Protective role of interleukin-6 during *Yersinia enterocolitica* infection is mediated through the modulation of inflammatory cytokines. **Infect. Immun.** v.72, p.3561-3570, 2004.

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

**Bolsa:** FAPESP