ADRIANA DE MORAES COSTA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Células Esplênicas Secretoras de Imunoglobulinas e Anticorpos Séricos em Camundongos Swiss Livres de Patógenos Específicos Inoculados com *Yersinia enterocolitica* O:3 ou Derivados

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo

Co-Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Beatriz Maria Machado de Medeiros

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Adriana de Moraes Costa e aprovada pela Comissão Julgadora.
93/Jul/95

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
Campinas-São Paulo
-1995-

UNICAMP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Costa, Adriana de Moraes
C823c Células esplênicas secretoras de imunoglobulinas e anticorpos séricos em camundongos Swiss livres de patógenos específicos inoculados com *Yersinia enterocolítica* O: 3 ou derivados / Adriana de Moraes Costa. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientadores : Paulo Maria Ferreira Araújo, Beatriz Maria Machado de Medeiros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Yersinia enterocolítica. 2. Células B. 3. Imunoglobulinas. 4. Rato como animal de laboratório. I. Araújo, Paulo Maria Ferreira. II. Medeiros, Beatriz Maria Machado de. III Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

UNIDADE BC
N.º CHAMADA :
T/UNICAMP
C823c
V. Ex.
TOMBO BC/ 26880
PROC. 667/96
C [ ] D [x]
PREÇO R$ 11,00
DATA 05/03/96
N.º CPD
CM00084804-0

LOCAL E DATA : Campinas, de novembro de 1995.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr Paulo Maria Ferreira de Araújo _____

Profª Drª Julia Keiko Sakurada _____

Profª Drª Deise Pasetto Falcão _____

SUPLENTE

Profª Drª Leonilda M. Barbosa dos Santos _____

APROVADA

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia - UNICAMP ; Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP e contou com o apoio financeiro das seguintes instituições :

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)

Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP (FAEP)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Araraquara (F.C.F. UNESP)

Fundação Para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP)

Aos meus pais, Dionisio e Maria Cecilia,
responsáveis pela minha formação
moral, intelectual e espiritual.

Ao meu marido, Paulo,
pelo carinho, apoio e
incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Poder Superior que me ilumina e guia-me, em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, pela orientação, amizade e incentivo constante.

À Profª Drª Beatriz Maria Machado de Medeiros, pela co-orientação amizade e apoio.

À Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta e Joselma Gomes Duque pela amizade, carinho e auxílio técnico.

Ao Joel Pereira e Luiz Fernando Gomes Balsas, pela amizade e disposição no auxílio em computação.

Aos funcionários da biblioteca da Faculade de Ciências Farmacêuticas -UNESP - Araraquara pela grande colaboração na pesquisa bibliográfica.

Ao Biotério Central da UNICAMP-CEMIB pelo pronto atendimento aos nossos pedidos de camundongos.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado durante a execução deste projeto.

À Profª Drª Deise Pasetto Falcão por ter cedido a amostra bacteriana em estudo e ter feito a análise prévia da tese.

Aos Professores Drs. Júlia K. Sakurada, Leonilda M. B. Santos e Humberto Araújo Rangel pela análise crítica e sugestões prévias.

Aos amigos da Pós Graduação e funcionários do Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo apoio e carinho.

Ao Prof. Dionisio Leite da Costa, meu pai, pela revisão gramatical do texto, pelo carinho e apoio constante.

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

ÍNDICE

INTRODUÇÃO 8
MATERIAL E MÉTODOS 19
1-Animais 19
2-Amostra Bacteriana de *Yersinia enterocolitica O:3.* Padronização do Inóculo 19
3- Preparações Antigênicas derivadas da *Yersínia entrerocolítica O:3* 20
3.1-Preparo de Extrato Bruto 20
3.2-Preparo de"Released Proteins"(RP) 20
3.3-Preparo de Lipopolissacáride 21
4-Infecção Experimental de Camundongos 21
5-Estimulação de Camundongos com os Antígenos Derivados Extrato Bruto, Released Proteins e Lippolissacárides 22
6-Dosagem de Proteína e de Açúcares 22
7.Enumeração das Células Secretoras de Imunoglobulinas no Baço dos Camundongos, através da Técnica de PFC-Reverso 22
8-Pesquisa de Anticorpos Séricos Reativos com *Yersinia enterocolitica O:3* pela Técnica de ELISA Indireta 25
9-Pesquisa de Níveis de Auto-Anticorpos 26
10-Planejamento Estatístico 26
Resultados 27
1-Avaliação da Produção de Imunoglobulinas na Infecção Experimental com *Yersinia enterocolitica* O:3 27
1.1-Quantificação das Células secretoras de Imunoglobulinas no baço de Camundongos Infectados e Sadios. 27
1.2-Produção de Anticorpos Específicos para a *Yersinia* nos soros *de* Camundongos Infectados 30
1.3-Pesquisa de Níveis Séricos de Auto-anticorpos 32
2-Avaliação da Produção de Imunoglobulinas em camundongos Estimulados com os Derivados Bacterianos (Extrato bruto,"Released Proteins" e Lipopolissacárides) 33
2.1-Quantificação das Células Secretoras de Imunoglobulinas no Baço de Camundongos Estimulados com os Derivados Bacterianos 33
2.2-Produção de Anticorpos Específicos para a *Yersinia* nos Soros de Camundongos Estimulados 42
2.3-Pesquisa de Níveis Séricos de Auto-Anticorpos 46
Discussão 47
Conclusões 56
Resumo 57
Referências Bibliográficas 59

LISTA DE ABREVIATURAS

BSS - Solução Salina Balanceada

DEAE-dextran Dietilaminoetil-dextran

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

EGTA - Ácido Etilenoglicol Tetracético

ELISA - Imunoensaio enzimático

Ig t - Imunoglobulinas totais (somatória de calsses e sub-classes)

Y. e. O:3 - *Yersinia enterocolitica* O:3

LPS - Lipopolissacárides

PBS - Solução Salina Tamponada

P. i. - Pós-inoculação.

PFC - Células Formadoras de Placas = Células secretoras de Imunoglobulinas

R.P. "Released Proteins"

SPF - Livre de Patógenos Específicos

INTRODUÇÃO

Atividade Imunológica na Relação Parasita Hospedeiro:

A funcionalidade do sistema imunológico decorre das interações químicas complementares entre os seus componentes (celulares e moleculares), e outras estruturas presentes no próprio organismo ou provenientes do meio externo.

A partir da entrada do microrganismo em um indivíduo temos entre outras ocorrências, invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro que resulta em perturbação provocando danos aos tecidos e conseqüente alteração de suas funções. A evolução de uma doença infecciosa em um indivíduo dependerá portanto dessa relação parasita-hospedeiro.

A atividade imunológica, decorrente de infecções bacterianas, pode ser investigada, através de determinações dos mecanismos celulares e humorais acionados a partir dessas interações. A bactéria expressa estruturas moleculares diferentes, normalmente de natureza macromolecular (proteínas, polissacarídeos, lipídios) quer na sua superfície quer nas suas secreções, representando uma variedade de possíveis fatores de virulência. Entretanto o dano aos tecidos e as seqüelas, decorrentes de infecções, podem ter a sua causa, vinculada mais pela resposta do hospedeiro ao microrganismo e seus produtos, do que pela agressão direta do próprio microrganismo. Assim, com caráter paradoxal, a imunidade, como muitos outros mecanismos homeostáticos, é necessária à sobrevida do hospedeiro, mas também apresenta um potencial para causar danos ao seu organismo.

A Fisiologia do Estado Imunitário: Auto Imunidade e Doença Auto -Imune

Norteando a Teoria de Seleção Clonal, admite-se que uma propriedade muito importante do sistema imunológico seja a sua habilidade em distinguir entre o "Próprio" e o "não Próprio". Os linfócitos são capazes de reconhecer e responder a muitos antígenos, porém normalmente, não respondem a estruturas antigênicas, presentes nos seus próprios constituintes -"a auto-tolerância". Já no início deste século, a observação de que anticorpos

reativos com constituintes autólogos, podiam aparecer sob certas condições, levou ERLICH a teorizar sobre a impossibilidade de o organismo, em condições normais, responder aos seus próprios constituintes, ao que denominou "horror autotoxicus", expressando assim a visão de que auto-imunidade seria sempre um processo patológico de conseqüências clínicas importantes.

Nas idéias complementares de BURNET, em 1957, na formulação da Teoria de Seleção Clonal, os clones linfocitários, com um potencial de reconhecimento para o "próprio", denominados "clones proibidos", são deletados durante a vida embrionária, o que implica na inexistência de clones auto-reativos nos repertórios celulares de indivíduos adultos. As doenças auto-imunes ocorreriam quando esta proibição fosse violada. Esta visão clonal, voltada para o exterior, tem sido a base de sustentação de que as atividades imunológicas são centradas nos antígenos. Tais idéias tiveram grande aceitação por várias décadas, e, de certa forma, ainda dominam o pensamento imunológico atual (VAZ, 1988; 1990).

Entretanto, JERNE, em 1974, com base nas informações acumuladas de vários pesquisadores sobre variações na estrutura de imunoglobulinas, especialmente nos resultados derivados dos trabalhos de OUDIN (1963), propôs novas idéias para a atividade imunológica, que se opunham à Seleção Clonal, o que é conhecido hoje como Teoria da Rede Idiotípica (VAZ 1983; VAZ & FARIA 1990). Considerando que os anticorpos seriam capazes de reagir uns com os outros, através dos determinantes idiotípicos, JERNE (1974) sugeriu que, através de reações idiotípo-anti-idiotípo, todos os anticorpos do organismo estariam unidos em uma rede muito complexa.

Muitos foram os avanços em direção a tais previsões (COUTINHO, 1989, COUTINHO & FORNI, 1985). São várias as demonstrações da existência de clones linfocitários auto-reativos em indivíduos sadios, do que se infere a possibilidade da sua influência, tanto na existência das conexões internas quanto na sua funcionalidade (COUTINHO et alii, 1984; COUTINHO, 1989;VAZ & FARIA, 1990). Ademais, COUTINHO et alii (1985) demonstraram que linfócitos T também expressam idiotipos e, quando idiotopos, presentes nos receptores de linfócitos T, reagem com paratopos nos receptores de linfócitos B ou vice-versa, seriam criadas condições para ativação destes

linfócitos (JANEWAY, 1986; TITE et alii, 1986), ampliando-se a rede de conexões. Esta conectividade interna seria, portanto, uma forma fisiológica de auto-reatividade, onde nem sempre, a reação de linfócitos e anticorpos com auto-componentes será destrutiva.

Esses dados, somados à demonstração da existência de anticorpos naturais em indivíduos normais, dirigidos contra estruturas moleculares autólogas, representam um desafio à crença nos fundamentos básicos da Seleção Clonal de BURNET (1957). Pode-se deduzir que muitos "clones proibidos", abrigando genes que codificam para auto-anticorpos, não são eliminados na vida embrionária. Alguns destes clones secretam continuamente auto-anticorpos, embora em pequenas quantidades e outros podem ser facilmente estimulados para sintetizá-los "in vivo" ou "in vitro".

Um aspecto central da abordagem de Jerne do sistema imunológico é que um distúrbio, desencadeado pelo antígeno, afeta muito mais linfócitos que aqueles capazes de interagir diretamente com o antígeno. Como um bom exemplo disso, uma expansão linfocitária panclonal, denominada "ativação policlonal", tem sido descrita em vários processos de estimulação antigênica, representando um fenômeno importante para o estudo da atividade geral do sistema imunológico.

Assim, as deficiencias ou alterações nos mecanismos responsáveis pela manutenção da auto-tolerância poderão resultar na manifestação de doenças auto-imunes com graus variados de severidade. Como a presença de linfócitos ou de anticorpos auto-reativos constitui um fenômeno normal, insuficiente portanto para induzir a expressão clínica de uma doença auto-imune, ao que parece, há necessidade da interação de outros fatores para que a doença se torne aparente (EHRENTEIN, 1991).

Pesquisas recentes indicam que diferentes genes podem aumentar a susceptibilidade para doenças auto-imunes. Fatores genéticos de risco já estabelecidos incluem genes, codificando moléculas de histocompatibilidade, proteínas do complemento, imunoglobulinas, proteínas transportadoras de peptídeos e genes, codificando hormônios sexuais. Cada fator pode independentemente aumentar a imunogenicidade de auto-estruturas, através do aumento da sua apresentação, e processamento por linfócitos B e macrófagos; ou intensificando a possibilidade de reconhecimento pelos linfócitos T e B auto-reativos. Fatores genéticos

também influenciam a atividade imunológica para agentes infecciosos que podem desencadear manifestações de doenças auto-imunes (CARSON, 1992).

Considerando-se que o sistema imune é continuamente exposto a uma variedade de antígenos microbianos, é inevitável que esses antígenos possam parecer-se com estruturas moleculares do hospedeiro. Existem por isso argumentos de que a auto-imunidade resultaria de um reconhecimento por mimetismo molecular (OLDSTONE, 1987). Ou ainda, de que "proteínas de choque térmico", presentes igualmente nas células bacterianas e células do hospedeiro, estariam intimamente envolvidas tanto na indução como na proteção dessas doenças (EDEN, 1993).

Recentemente, descobriu-se que um grupo de "super-antígenos" bacterianos, que interagem diretamente com a parte não variável do receptor de célula T, podiam ocasionar uma mudança maior no repertório de célula T, o que resultaria no aumento de susceptibilidade às doenças auto-imunes (FRIEDMAN et alii, 1991).

A ativação policlonal de células B tem sido um dos mecanismos propostos que levaria a um aumento de produção de imunoglobulinas auto-reativas, e, por conseguinte, estaria associada à indução de uma doença auto-imune (DZIARSKI, 1988; STELLRECHT &VELLA, 1992). Várias doenças, causadas por bactérias, vírus , protozoários e vermes, são modelos onde se tem demonstrado a ocorrência dessa ativação policlonal associada à produção de uma grande quantidade de anticorpos inespecíficos, isto é, que não reagem com antígenos do patógeno, mas que podem estar associados a interações auto-imunes.

Infecção e Doença -Associadas à *Yersinia enterocolitica* O:3

A infecção por *Yersinia enterocolitica* é uma dentre várias patologias humanas causadas por bactérias gram-negativas (*Salmonella, Shigella, Campylobacter* e *Chlamydia).*

Yersinia enterocolitica (*Y.e.*) é um importante patógeno humano em muitos países através do mundo, particularmente na Europa, Escandinávia, Canadá, Japão e Estados Unidos (BOTTONE, 1977).

As amostras de *Yersinia enterocolitica* patogênicas têm sido identificadas como sorotipos 0:8, 0:9, 0:3 e 0:5, 27. A distinção entre espécies relacionadas é definida, primeiro, pelo biotipo ou espécie, depois, pelo sorotipo e, finalmente, fagotipo (NICOLE et alii, 1976; MAIR, 1980). É um patógeno intracelular facultativo, o qual invade células epiteliais e sobrevive nos fagócitos , resultando na multiplicação e disseminação através do hospedeiro. A virulência é determinada por vários fatores, alguns dos quais são codificados por genes plasmidiais, e outros, por genes cromossômicos (GRIPENBERG-LERCHE et alii, 1994).

Amostras patogênicas de *Yersinia enterocolitica,* por exemplo, albergam um plasmídeo de aproximadamente 70Kb que está associado com a virulência (PORTNOY et alii, 1981). Este apresenta propriedades que são influenciadas pela temperatura de crescimento ou pela necessidade de cálcio, (GEMSKI et alii; 1980, PRIC et alii, 1983); promove auto-aglutinação e modificação do padrão de proteínas de membrana externa-OMPs (BOLIN et alii, 1985); induz resistência à atividade bactericida do soro (LACHICA et alii, 1984), assim como o aparecimento de uma estrutura fibrilar (KAPPERUD et alii, 1985).

O plasmídeo de virulência também codifica várias proteínas que são expressas na parte externa da *Yersinia* (Yops) e secretam, em grandes concentrações, outras proteínas denominadas "Released proteins" (RPs). Várias dessas Yops e RPs são sintetizadas apenas em um meio deficiente de cálcio e na fase exponencial de crescimento a 37°C. São, portanto, reguladas por estímulos extracelular de cálcio e de temperatura (HAKANSSON et alii, 1993). A ausência destas proteínas está sempre relacionada com a perda da patogenicidade. Algumas amostras de *Yersinia enterocolitica* sintetizam proteínas reguladoras do metabolismo do ferro, codificados por cromossomos, as quais estão presumivelmente envolvidas na captura necessária de ferro no curso da infecção (BOYCE et alii, 1977). *Yersinia enterocolitica,* a baixas temperaturas, secreta uma enterotoxina termoestável semelhante à ST de *Echerichia coli* (BOYCE et alii, 1977).

Segundo Larsen (1979), as infecções, causadas por *Yersinia enterocolitica,* podem ocorrer em três etapas. Na primeira, ocorrem sintomas abdominais inflamatórios, como enterite ou linfadenite mesentérica. Na segunda fase ou de complicações imunológicas, ocorrem sintomas inflamatórios agudos no tecido conjuntivo ou na pele. As lesões são estéreis

e representam processos inflamatórios reativos principalmente nas articulações, sendo menos freqüentes os sintomas na pele, como eritema nodoso, oculares, como uveites, e renais, como glomerulonefrites. Na terceira fase ou crônica, ocorrem doenças reumáticas inflamatórias, como artrite reativa ou espondilite anquilosante. A bactéria raramente é isolada, mas anticorpos reativos específicos estão presentes. Esta artrite tem sido definida como uma doença inflamatória estéril das articulações, após a infecção gastrointestinal ou urogenital (PROBST et alii, 1993), representando assim um modelo clínico importante para o estudo da patogênese de artrite inflamatória humana.

De acordo com estudos realizados na Escandinávia, 10 - 30% dos adultos com infecção confirmada, desenvolvem artrite (MAIR, 1986).

O estudo dos patógenos que causam artrite reativa tem indicado o envolvimento de vários mecanismos imunomodulatórios na patogênese de doenças inflamatórias. Tal imunomodulação pode ocorrer por exemplo como o resultado de sinal da transdução, alterando "moléculas artritogênicas" dentro da célula do hospedeiro pela modificação na fosforilação de proteínas celulares. A indução de ativação policlonal de linfócitos é um outro possível mecanismo imunomodulatório que estaria associado aos patógenos artritogênicos (LAHESMAA et alii, 1994).

O lipopolissacáride (LPS) de *Yersinia enterocolitica* tem sido encontrado no fluido sinovial e membrana sinovial de pacientes com artrite reativa, o que coincide com uma resposta vigorosa e persistente para LPS, além disso, LPS provoca um estímulo mitogênico para linfócitos B neste compartimento (LAHESMAA et alii, 1994). Trata-se de um componente estrutural e funcionalmente importante da parede celular em todas as bactérias gram-negativas (GALANOS et alii, 1979; HITCHCOCK et alii, 1986). Consiste de 3 sub-regiões, sendo que o lipídeo A e a parte central são muito semelhantes em todas as enterobactérias, enquanto a cadeia polissacarídica O, constituída de unidades oligossacarídicas repetitivas, varia amplamente (GALANOS et alii, 1979; HITCHCOCK et alii, 1986, SCOTT et alii, 1990; SHENEP et alii, 1987).

Outras proteínas, também produzidas pela *Yersinia enterocolitica,* têm sido assemelhadas a superantígenos, que funcionariam no desenvolvimento de sinovite

inflamatória, decorrente da estimulação de uma população de células T auto-reativas que reconheceria o antígeno sinovial (STUART, 1992).

Para se estudar a patogênese da artrite reativa, há, portanto, a necessidade da demonstração e caracterização de moléculas artritogênicas, resultantes da interação do microrganismo com o mecanismo de defesa do hospedeiro (GRIPEENBERG-LERCHE et alii, 1994).

Artrite experimental em ratos, após infecção por *Yersinia,* tem sido descrita desde 1986. Toivanen et alii inocularam 5 diferentes linhagens de ratos por via intravenosa com células viáveis de *Yersinia enterocolitica* 0:8 ou *Yersinia Pseudotuberculosis* III. Doze a dezoito dias após inoculação de *Yersinia entecolitica* 0:8, apareceram sintomas artríticos nas patas traseiras dos ratos SHR. Ratos das linhagens Lewis, Wistar, WKY e Zunckner não desenvolveram qualquer sinal de artrite, após injeção dessas bactérias. Esses autores também observaram que, em alguns dos animais, a artrite era séptica, pelo menos inicialmente.

Em 1987, HILL & YU observaram que ratos Lewis, inoculados por via intravenosa com 10^4 a 10^5 organismos de *Yersinia enterocolitica* O:8 (WA), desenvolviam artrite. A artrite era mais grave 3 semanas após a injeção, e abrandava em 6 semanas. Quando a bactéria era injetada em ratos das linhagens Buffalo, Fisher, DA e LDA, não se observava artrite. A artrite, observada nos ratos Lewis, era asséptica, semelhante à observada em humanos. A linhagem de ratos, suscetível à artrite, apresentava uma infecção mais grave e prolongada. Toivanen et alii (1986) não conseguiram explicar o fato de ratos Lewis serem resistentes à indução de artrite, enquanto que, nos experimentos de HILL & YU , essa foi a única linhagem suscetível. As diferenças potenciais incluem fatores do meio ambiente, do animal (genética) e bacteriológicos.

Mais recentemente, GAEDE et alii (1992) confirmaram que ratos Lewis desenvolvem artrite asséptica, aproximadamente 2 semanas após uma inoculação por via intravenosa de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:8; ratos da linhagens Fisher não desenvolveram artrite. Além disso, os autores compararam a resposta de anticorpos a antígenos de *Yersinia* associados `a virulência (Yops) de ratos Lewis experimentalmente infectados, com aquela de ratos Fisher, usando um teste ELISA e "immunoblotting". Os resutados do ELISA revelaram que os ratos

Lewis produziram uma resposta mais rápida e vigorosa de anticorpos específicos IgG, IgA e IgM do que os ratos Fisher, nos estágios iniciais de infecção.

MERILAHTI-PALO et alii (1992) concluíram que artrite, associada à *Yersinia* em ratos SHR, proporciona um modelo animal em potencial para o estudo da artrite reativa. As maiores semelhanças entre esse modelo animal e artrite reativa humana são as características histopatológicas e o carácter "auto-limitante" da doença na maioria dos animais. Igualmente como foi proposto na artrite reativa em humanos (TOIVANEN et alii, 1988), a pequena eliminação do agente infeccioso inicial está associada com a suscetibilidade à artrite no modelo em ratos.

Em trabalho posterior, GRIPENBERG-LERCHE & TOIVANEN (1993) observaram que, após a infecção intravenosa de ratos SHR com células viáveis de *Yersinia enterocolitica* 0:8, 50-69% deles desenvolveram artrite. Esses animais eram livres de anticorpos contra todos os patógenos de ratos que foram testados. Em contraste, somente 20-25% dos ratos SRH que tinham anticorpos séricos contra *Bacillus piliformis,* vírus Kilham de ratos e virus Toolan H-1, desenvolveram artrite. Os resultados indicam que a carga microbiana do hospedeiro tem um efeito profundo sobre a susceptibilidade à artrite experimental. Os autores fizeram observações semelhantes em ratos Lewis. Esse fenômeno explica a falha em induzir artrite associada à *Yersinia* nos ratos Lewis nos experimentos prévios de TOIVANEN et alii (1986) e também nas observações de outros autores sobre a variabilidade na suscetibilidade.

A suscetibilidade para ratos desenvolverem artrite está associada com uma resposta rápida e de alto título de anticorpos, assim como um número elevado de unidades formadoras de colônias - CFU do patógeno, presentes no baço, fígado e linfonodos. Ainda não está totalmente esclarecida a patogênese de *Yersinia* causadora de artrite em ratos. Vários são os programas de estudos neste questionamento, como aqueles que visam à elucidação sobre o papel dos complexos imunes (Ex. Antígenos catiônicos microbianos), componentes artritogênicos de *Yersinia enterocolitica* 0:8 e características imunológicas específicas e genéticas de ratos Lewis (HEESEMANN et alii, 1993) .

A infecção experimental de *Yersinia enterocolitica* em camundongos parece com a Yersiniose em humanos. Estes animais têm sido utilizados na tentativa de esclarecer-se a

patogênese das Yersinioses. Assim, o papel das placas de Peyer na entrada da *Yersinia* enteropatogênica já foi elucidado em camundongos e coelhos. Células M são provavelmente a primeira célula alvo de invasão desta bactéria. Entretanto ainda não está claro como, nos camundongos, o microrganismo se propaga das placas de Peyer para os linfonodos, baço, fígado e pulmão, onde formam abcessos e lesões semelhantes a granuloma. Imunohistologicamente o envolvimento de macrófagos e de células T pode ser demonstrado nas lesões induzidas pela *Yersinia* nos camundongos (HEESEMANN et alii, 1993).

Carter et alii, em 1973, trabalhando com *Yersinia enterocolitica* do sorotipo O:8 (WA), isolada de um caso de septicemia humana, verificaram que a mesma era bastante patogênica para camundongos, quando inoculada por via oral, ou por via intravenosa. CARTER e COLLINS, em 1974, utilizando essa mesma cepa por via intravenosa, reproduziram, pela primeira vez em camundongos uma infecção semelhante àquela observada no homem, onde se desenvolve uma infecção sistêmica piogênica, envolvendo principalmente baço, fígado e pulmão. Infecção por via intragástrica resultou inicialmente em abcessos, nas placas de Peyer do íleo. Durante uma fase secundária, a bactéria foi disseminada das placas de Peyer, causando uma infecção sistêmica, semelhante à observada pela administração intravenosa. Um modelo de infecção similar pôde ser estabelecido para sorotipos de *Yersinia enterocolitica* não virulenta para camundongos através de um pré-tratamento do camundongo com desferrioxamine (TOYOS et alii, 1990, ROBINS-BROWNE, 1985).

Camundongos com certo MHC e/ou padrão especial de genes TCR podem eliminar a bactéria mais eficientemente. Os resultados implicam uma analogia entre o HLA-B27 humano e os genes da região D dos haplótipos d, q e v. Assim, a natureza dos fatores genéticos, envolvidos na artrite por *Yersinia* em camundongos, se assemelha aos fatores genéticos de susceptibilidade nas artropatias humanas associadas ao B-27. Apenas indivíduos com certa combinação de genes em adição ao B-27 seriam susceptiveis à doença, explicando o porquê de muitas pessoas com B-27 nunca desenvolverem espondiloartropatias (NICKERSON et alii, 1990) .

Ricciardi et alii, em 1978, demonstraram que camundongos "Porton White" são susceptiveis à *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:8 (WA) e também às amostras de sorotipos 0:3 e 0:9, as quais infectam, mas não matam o camundongo.

Trabalho, realizado por Falcão et alii, em 1984, mostrou que camundongos Swiss convencionais são sensíveis à infecção experimental com *Yersinia enterocolitica* do sorotipos 0:8 e 0:3, quando inoculados por via intragástrica. Animais inoculados por via intravenosa, apresentaram infecções generalizadas.

Os trabalhos, realizados utilizando camundongos, como modelo experimental de infecção pela *Yersinia*, relatavam até então que, embora os animais se tornassem infectados pela bactéria, não apresentavam sinais clínicos de artrite O primeiro relato de que *Yersinia enterocolitica* 0:3 é experimentalmente artritogênica para camundongos é de 1990, quando TOYOS et alii demostraram que artrite podia ser induzida em camundongos pré-tratados com desferrioxamine e inoculados por via oral, a mais frequente nas infecções em humanos. O padrão de doenças nas articulações era semelhante àquele da artrite humana associada com este patógeno (TOYOS et alii, 1992).

É possível que as manifestações auto-imunes de alguns pacientes com Yersiniose sejam uma conseqüência do aparecimento de auto-anticorpos, em decorrência da ativação policlonal induzida pela *Yersinia.*

A ativação policlonal de linfócitos B, associada à infecção pela *Yersinia enterocolitica* 0:3, foi pela primeira vez demonstrada em estudos realizados nos nossos laboratórios, a partir de um modelo experimental desenvolvido em camundongos Swiss convencionais (MEDEIROS, 1994). Nesses estudos, foram determinados o número de células secretoras de imunoglobulinas pela técnica de PFC-Reverso e os níveis séricos de anticorpos anti-*Yersinia,* através da técnica de ELISA. Os resultados demonstraram altos níveis de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas, assim como de anticorpos séricos em relação aos grupos controle (não infectados). Não observaram entretanto sinais evidentes de doença auto-imune associada com artrite.

Nesses experimentos realizados com camundongos Swiss provenientes de criadouros convencionais, portadores normalmente de uma ampla flora bacteriana e diferentes parasitos,

foi observada uma grande variabilidade nas determinações entre os indivíduos, destacando-se inclusive níveis gerais de ativação aumentados nos grupos controles. Esta observação foi acrescida de um episódio decorrente da contaminação das matrizes de camundongos pela bactéria *Samonella sp.,* no qual os resultdos de um grupo de experimentação foi comprometido em virtude de alterações no padrão de infecção pela *Yersinia.*

Com o intuito de verificar se outras infecções paralelas poderiam estar influenciando aqueles resultados, e qual o papel dos derivados bacterianos no processo de ativação policlonal, o presente trabalho foi programado utilizando-se camundongos Swiss criados sob barreiras para patógenos específicos (animais de origem SPF), obedecendo as seguintes etapas:

1 - Infectar camundongos com a *Yersinia enterocolitica* O:3, ou estimular com os derivados bacterianos - Extrato Bruto, "Released Proteins" (Rps), e Lipopolissacárides.

2 - Quantificar o número de células eslpênicas secretoras de imunoglobulinas de animais infectados pela *Yersinia enterocolitica* O:3; de animais inoculados pelos derivados bacterianos, e de animais controles (animais não infectados e não inoculados).

3 - Determinar nos soros, provenientes desses mesmos animais o nível de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA específicos para a *Yersinia,* e pesquisar auto-anticorpos com reatividade para diferentes estruturas moleculares autólogas.

MATERIAL E MÉTODOS

1 -Animais

Foram utilizados camundongos Swiss , fêmeas com 6 a 8 semanas de idade obtidos a partir de colônias S. P. F. ("Specific pathogen free"), provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP). Após retirada das condições S.P.F., os animais eram alojados no biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP-ARARAQUARA em gaiolas coletivas de até 25 animais cada, conforme a distribuição de grupos controle ou manipulados.

Os animais eram tratados com água ração e maravalha estéreis e mantidos nestas condicões em salas separadas em biotério convencional durante todo o período do experimento, cerca de 5 semanas, preservando dentro do possível as condições SPF de origem.

2 - Amostra Bacteriana de *Yersinia enterocolitica O:3*

Padronização do Inóculo

Foi utilizada amostra de *Yersinia enterocolitica* O:3 (FCF-59), biótipo 4, fagotipo VIII, isolada de fezes diarréicas humanas. Essa amostra é portadora do plasmídio de virulência. Antes de serem utilizadas, as bactérias foram reativadas através da passagem em camundongo. Para isso, passou-se o crescimento do estoque para um caldo simples, após 48 horas a 25°C, plaqueou-se 0,1 ml do caldo para uma placa contendo Blood Base Ágar (BAB). Com o crescimento, foi preparada uma suspensão contendo cerca de 10^8 células/ml padronizadas pela escala 3 de Mac Farland e leitura da densidade óptica a 550 nm. Foram inoculados dois camundongos, por via intra-venosa com 0,5 ml da suspensão bacteriana. Após 24 horas, esses animais foram sacrificados, o baço foi retirado, triturado e ressuspendido em

1mL de salina estéril. O produto foi semeado em BAB , incubado a 25°C por 48 horas. A partir desse crescimento preparou-se o inóculo.

O crescimento bacteriano foi suspenso em 1,5 ml de salina estéril. Desta suspensão foram retiradas alíquotas e colocadas em um tubo estéril até a obtencão de uma turvação semelhante ao tubo 3 da escala de Mac Farland, cuja densidade óptica deve corresponder a 0,36 em comprimento de onda de 550 nm. A partir dessa suspensão foi feita uma diluição para se obter uma concentração aproximada de 10^9 células/ml.

3- Preparações Antigênicas Derivadas da *Yersinia enterocolitica* O:3

3.1 - Preparo de Extrato Bruto

O Extrato Bruto foi preparado segundo MEDEIROS et alii, 1991 , através da desintegração das células viáveis de *Yersinia enterocolitica* O:3 por sonicação (4 picos de 1 minuto) e centrifugação a 5.000 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto, após aferições da sua concentração proteica pelo método de Biureto e dosagem de açúcares, segundo DUBÓIS (1956).

3.2 - Preparo de "Released Proteins" (RP) (HEESEMAN et alii, 1990)

A bactéria foi semeada em 4 placas de BHI (Brain Hearth Infusion Medium) e incubada a 25°C "over night". O crescimento foi retirado com salina estéril (1 ml/placa) e foi feita uma diluição 1/20 em "Brain Infusion Broth". Seguiu-se incubação com agitação a 37°C, 120 r.p.m. por 90 minutos. Foi adicionado EGTA 10mM e a incubação prolongou-se por mais 90 minutos, centrifugou-se e separou-se o sobrenadante. As proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas com sulfato de amônio (40g para 100 ml), em banho de gelo, com agitação, e deixadas em repouso, "over night" a 4°C. Seguiu-se centrifugação a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. O precipitado foi diluído em 2 ml de PBS e dializado em PBS, a 4°C.

A seguir, sua concentração proteica foi avaliada através de dosagem pelo método de Lowry e de açúcares segundo DUBOIS .

3.3 - Preparo de Lipopolissacarídeo , LPS , seg.GOLDBERG (1983)

Após centrifugação a 4°C a 2500 R.P.M., durante 20 minutos as células de *Yersinia enterocolitica* foram lavadas 3 vezes com tampão Tris 85mM pH 8,0. As mesmas foram ressuspendidas no mesmo tampão numa concentração de 10^8 células/ml; $CaCl_2$ (concentração final de 50mM) foi adicionado e a suspensão foi incubada durante 10 minutos. As células foram novamente centrifugadas a 4°C, 2500 rpm, durante 20 minutos. Ressuspendidas em tampão Tris e pré incubadas à 28°C durante 10 minutos em banho-maria. Subseqüentemente EDTA (concentração final de 85 mM) foi adicionado e a mistura foi incubada por 5 minutos a 28°C e $CaCl_2$ (100 mM) foi adicionado. O LPS obtido foi precipitado com acetona (70%) durante 24 horas a 4°C. O LPS precipitado foi ressuspendido em água destilada e dializado a 4°C por 24 horas e a seguir liofilizado.

4 - Infecção Experimental de Camundongos

Lotes com 25 camundongos Swiss, fêmeas com 2 meses de idade, foram inoculados por via intra-venosa, com uma suspensão de *Yersinia enterocolitica,* contendo cerca de 10^9 células/ml;segundo MEDEIROS et alii, 1991 O mesmo número de animais foi mantido como controle. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados, sangrados por punção cardíaca, e seus baços retirados, para obtenção das células esplênicas no 3°, 7°, 14°, 21° e 28° dias, após infecção.

O controle do número de bactérias viáveis inoculadas foi realizado, diluindo-se a preparação inicial em solução salina estéril de maneira a obter-se suspensões bacterianas contendo (10^1 a 10^7). Uma alíquota de 0,1ml das duas últimas diluições foi semeada em meio ágar base sangue (BAB),seguido de incubação a 25°C por 48 horas, determinando-se a seguir o número de colônias desenvolvidas.

5 - Estimulação de Camundongos com os Derivados Bacterianos Extrato Bruto, RP e LPS

Lotes de 25 camundongos foram inoculados com os seguintes antígenos, extraídos da *Yersinia enterocolitica* 0:3, RP, LPS e Extrato Bruto nas concentrações de 200, 200 e 100 ug /animal respectivamente. Após diferentes dias, células esplênicas foram analisadas quanto à secreção dos vários isotipos de imunoglobulinas, independentemente da especificidade, através da técnica do PFC - Reverso.

6 - Dosagem de Proteínas e Açúcares

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de LOWRY (1951) ou pelo reativo de Biureto, segundo a técnica de WEICHSELBAUM modificada por DITTEBRANDT (1948). A curva padrão foi feita com concentrações conhecidas de soro albumina bovina (BSA).

A dosagem de açúcares foi realizada pelo método do Fenol-Sulfúrico, a partir das informações de DUBOIS (1956).

7- Enumeração das Células Secretoras de Imunoglobulinas no Baço dos Camundongos, Através da Técnica do PFC-Proteína A

O número de células secretoras de imunoglobulinas no baço dos animais foi determinado segundo o método de PFC-Proteína A, descrito por *BERNABÉ* et alii, 1981, que utiliza hemácias sensibilizadas com proteína A de *Staphylococcus aureus* e permite a

enumeração de células secretoras de imunoglobulinas, independentemente da especificidade antigênica dos anticorpos secretados.

a) Obtenção de Complemento de Cobaio

Soro de cobaio foi utilizado como fonte de complemento .Foi realizada uma titulação do complemento com determinação de CH_{50} (LIMA & SILVA,1970). O complemento foi utilizado na técnica de PFC-Proteína A diluído em solução salina balanceada (BSS), pH 7,2, contendo 0,1% de glicose.

b) Sensibilização de Hemácias de Carneiro com Proteína A .

Hemácias de carneiro, recentemente obtida e conservada em solução de Alsever, foram lavadas 3 vezes em salina 0,15M. Os leucócitos foram retiradas por aspiração.

Para 1 ml de solução de $CrCl_3.6H_2O$ 0,05M foram adicionadas 100 ul de uma solução contendo 0,5 mg/ml de Proteína-A (PHARMACIA) em salina e 100 ul de papa de hemácias. Essa mistura foi incubada em banho maria a 30°C, durante uma hora, com agitação. A seguir, as hemácias sensibilizadas foram lavadas 2 vezes com salina e ressuspensas em 100 ul de meio BSS, pH 7,2. Foram utilizadas, diluídas a 1/3 em meio BSS, contendo 0,1% de glicose.

c) Obtenção das Células Esplênicas e Controle da Viabilidade

Os camundongos do grupo controle, infectados e estimulados com diferentes antígenos, foram sacrificados com auxílio de clorofórmio. O baço foi retirado e transportado para uma placa de Petri pequena, contendo 5 ml de meio BSS, pH 7,2, a 4°C. A seguir, o baço foi desmanchado cuidadosamente para liberação das células. A suspensão de células obtida foi homogeneizada várias vezes, utilizando-se uma seringa de 10 ml com agulha 25 x 8, e, após a

sedimentação dos grumos, o sobrenadente foi transferido para tubos cônicos de polipropileno graduados, centrifugado a 2500 rpm. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio BSS, pH 7,2. Esse processo foi repetido 3 vezes. No final, as células foram recuperadas em um volume de 10 ml de meio BSS pH 7,2 contendo glicose e mantidas em banho de gelo até o momento do uso. O número de células foi ajustado para este experimento de acordo com o tamanho do baço padronizando-se diluições adequadas das células. O número de linfócitos viavéis no baço de cada camundongo foi avaliado, através da técnica de exclusão com azul Trypan 0,2% (MISHELL & SHIGI,1980).

d) Preparação do Ágar

O ágar (Bacto-Ágar, DIFCO) foi utilizado numa concentração a 0,5% em BSS pH 7,2. Após a completa dissolução do ágar, este foi adicionado de DEAE-Dextran (PHARMACIA) a 50mg/ml em BSS, numa proporção de 1,5 ml DEAE-Dextran/100 ml ágar. O ágar foi mantido em banho maria (BM) a 46°, até o momento de uso.

e) Soros de Coelho Anti-imunoglobulinas de Camundongo.

Os soros utilizados foram soro de coelho anti-imunoglobulinas totais de camundongo (a-Igs totais) e os seguintes anti-isotipos obtidos comercialmente da SEROTEC LT (Oxford-Inglaterra) soro anti-IgM, soro anti-IgA, soro anti-IgG1, soro anti-IgG2a, soro anti-IgG2b, soro anti-IgG3. Todos os anti-soros foram utilizados diluídos a 1/20 em meio BSS contendo 0,1% de glicose.

f) Realização da Técnica de PFC-Reverso

Em tubos de hemólise mantidos em banho de gelo foram adicionados: 100 ul da suspensão de células esplênicas; 20 ul de anti-soro, 20 ul de complemento. Os reagentes foram homogeneizados em "mixer", estabilizados em banho maria a 46°C, e, a seguir, foram

adicionados 250 ul de ágar contendo DEAE-Dextran. Estes reagentes foram vertidos em placa de Petri de 9 cm de diâmentro e espalhados num círculo de aproximadamente 7 cm de diâmetro. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 5 horas numa estufa com umidificação. Após este período, foi realizada uma contagem das placas de hemólise formadas.

8 - Pesquisa de Anticorpos Séricos Reativos com Yersinia enterocolitica O:3 pela Técnica de ELISA Indireta

Nos soros dos camundongos controle, infectados e inoculados com derivados de *Yersinia enterocolitica,* foi determinado o nível de anticorpos específicos,através da técnica de ELISA segundo MEDEIROS et alii,1991 .

Microplacas de 96 "wells" foram sensibilizadas com 100 ul de extrato bruto de *Yersinia enterocolitica* 0:3, numa concentração de 1,25 ug/ml em tampão carbonato - bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 e incubada a 4° durante 18 horas. Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T). Os soros em estudo foram diluídos em PBS/T contendo 1% de soro albumina bovina (PBS/T/BSA) e adicionados aos orifícios da placa (100 ul), sendo incubada a 37°C durante 1 hora. A seguir a placa foi lavada novamente com PBS/T/BSA e foram adicionados 100 ul de um conjugado com peroxidase anti-IgG de camundongo ou um conjugado anti-IgM ou anti-IgA, diluídos adequadamente em PBS/T/BSA. Seguiu-se a incubação a 37°C durante 1 hora e então foi feita nova lavagem das placas com PBS/T. Foram realizados controles do antígeno e conjugado.

Para o desenvolvimento da reação imunoenzimática foram adicionados 100 ul de solução de substrato (1 mg/ml orto-fenilenodiamina em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0, contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio) e feita uma incubação da placa durante 15 minutos à temperatura ambiente.

A reação foi bloqueada com 100 ul de HCl 3N. A leitura das placas foi feita através da medida da absorbância em comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro UNISKAM-II (FLOW).

9 - Pesquisa de Níveis de Auto-Anticorpos

Os soros dos animais infectados com células de *Yersinia enterocolitica* 0:3, estimulados com seus derivados: LPS, extrato bruto e RP e dos animais controle foram testados quanto à presença de auto-anticorpos através da técnica ELISA segundo ARAÚJO et alii, 1987, utilizando-se placas de poliestireno foram sensibilizadas com os seguintes auto-antígenos: miosina, mielina, actina, colágeno, laminina, cardiolipina e tiroglobulina em concentrações de 10μg/ml. Os soros em estudo foram diluídos a 1/50 e o conjugado utilizado foi um anti-Ig total.

10 - Planejamento Estatístico

Para análise das variáveis de estudo, foram tomados 5 animais infectados e 5 como controle. Os resultados obtidos foram descritos, empregando-se estatística descritiva ou teste T de Student, onde os graus de significância das diferenças entre as médias foram determinadas estabelecendo-se o nível de significância de $p \leq 0,05$; utilizando-se o programa OXSTAT II (Microsoft Corporation, 1985) para avaliação dos dados.

RESULTADOS

1- Avaliação da Produção de Imunoglobulinas na Infecção Experimental com *Yersinia enterocolitica* 0:3

1.1- Quantificação das Células Secretoras de Imunoglobulinas no Baço de Camundongos Infectados e Sadios

Foi determinado o número de PFC representando a totalidade das células secretoras (Igs totais) e dos isotipos IgM, IgA, IgG1, IgG2a , IgG2b, IgG3 , conforme demonstrado na figura 1 onde se encontra o perfil do número de PFC/baço expresso em escala logarítmica.

Nesta figura, podemos observar uma elevação significativa do número de PFC-Igs totais durante toda a cinética de infecção quando comparada ao controle. O pico da infecção ocorreu entre o 7°e 14° dia pós-inoculação , quando o número de células secretoras de Igs totais estava cerca de 11 vezes aumentado em relação ao controle. O pico de secreção de IgM foi no 3° dia pós-infecção., quando o número de células secretoras estava aproximadamente 9 vezes aumentado em relação aos controles. O número de células secretoras de IgM foi decrescendo durante a cinética, embora tenha permanecido elevado em relação ao controle.

O pico de secreção do isotipo IgA ocorreu no 14° dia o qual nesta ocasião estava 10 vezes aumentado ,coincidindo com o número máximo das células secretoras das seguintes sub-classes de IgG: IgG1 e IgG2a. IgG1 estava 16 vezes aumentado e IgG2a 25 vezes.

As demais sub-classes IgG2b e IgG3 apresentaram maior elevação no 7° dia pós inoculação , onde estavam 12 e 16 vezes respectivamente mais elevados do que o controle.

O maior aumento ocorreu portanto no número de células secretoras de IgG2a, IgG1 e IgG3.

Na tabela 1, encontram-se os valores das médias aritméticas e desvio padrão do número de PFC obtidos em diferentes dias pós-infecção.

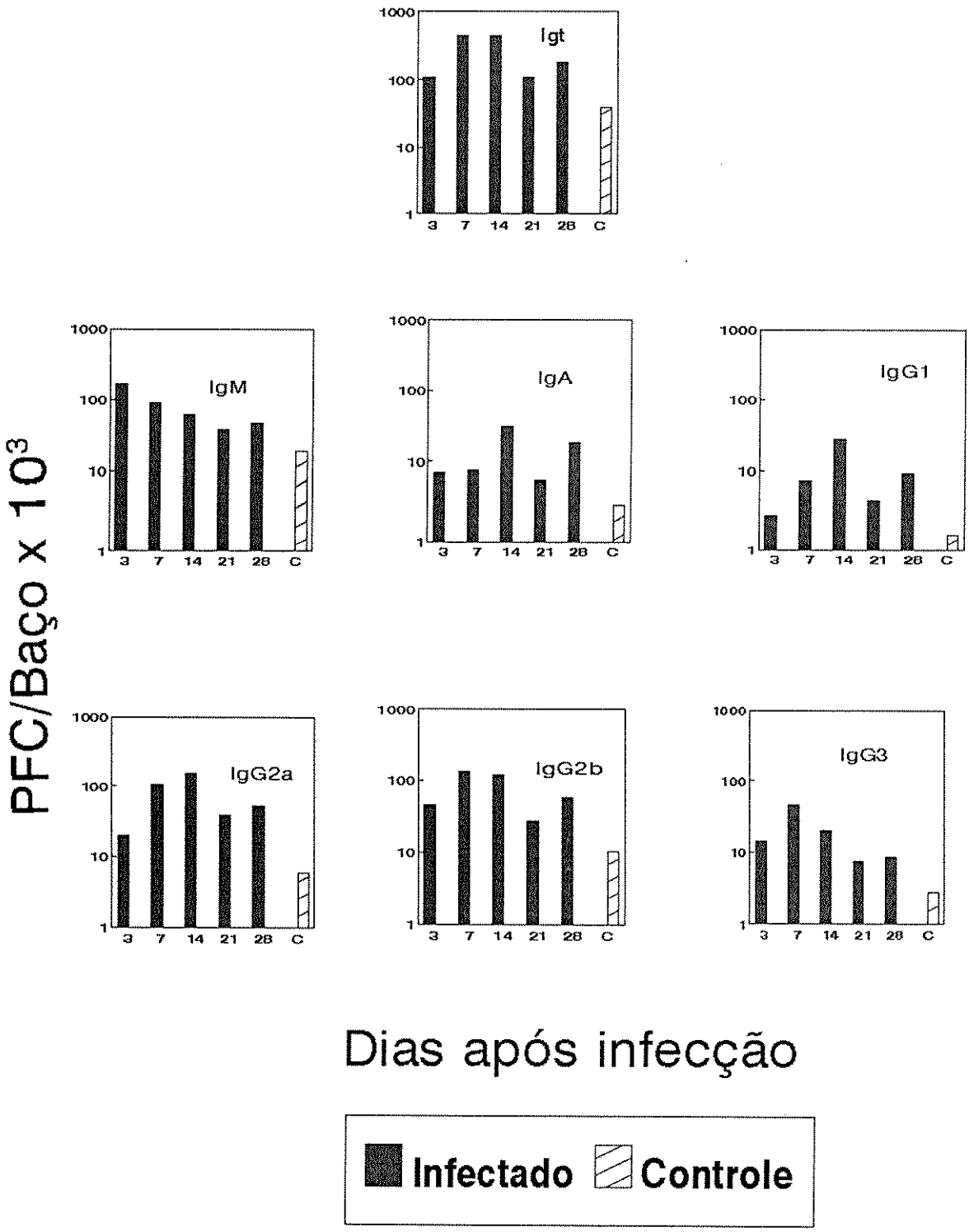

Figura 1- Número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas(PFC-Reverso) determinada em camundongos Swiss após diferentes dias de infecção pela Yersinia enterocolitica O:3. As colunas cheias representam a média (n=5 animais) das determinações de imunoglobulinas totais e isotipos. A coluna C= média dos vários grupos controles.

Tabela 1-Número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (PFC-Reverso), determinado em camundongos Swiss após diferentes dias de infecção com *Yersinia enterocolitica O:3*

	Média e desvio padrão do número de PFC/Baçox10^3					
	Dias Após Infecção					
	3°	7°	14°	21°	28°	Controle
IgTotal	110 ± 22,9	449,2 ± 198,6	445,0 ± 149,5	110,0 ± 76,5	180,0 ± 140,3	39,8 ± 6,7
IgM	164 ± 80,4	88,8 ± 48,3	60,3 ± 26,6	36,8 ± 28,8	45,5 ± 31,0	18,8 ± 11,7
IgA	7,1 ± 3,0	7,8 ± 2,5	30,9 ± 12,9	5,80 ± 2 ,6	18,4 ± 1 2,4	3,0 ± 1,2
IgG1	2,9 ± 0,8	7,5 ± 2,5	26,9 ± 20,6	4,48 ± 4,3	9,3 ± 3,9	1,7 ± 1,6
IgG2a	19,4 ± 15,7	106,6 ± 90,0	150,2 ± 57,8	38,0 ± 23,9	52,3 ± 15,4	5,9 ± 2,4
IgG2b	45,5 ± 14,4	128,8 ± 75,6	116,0 ± 56,0	26,6 ± 18,9	57,0 ± 42,1	10,3 ± 3,0
IgG3	13,9 ± 10,3	45,7 ± 9,8	20,1 ± 8,6	7,48 ± 9,8	8,6 ± 2,8	2,8 ± 2,9

1.2- Produção de Anticorpos Específicos para a *Yersinia* nos Soros de Camundongos Infectados:

O nível de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*Yersinia* foi detectado por ELISA técnica indireta , utilizando como antígeno Extrato Bruto obtido por sonicação de células viáveis de *Yersinia* após aferição da concentração proteíca (8,5 mg/ml) e açúcares (0,6 mg/ml); apresentando uma relação proteína/polissacáride de 14:1.

A respostas quanto à produção de imunoglobulinas específicas estão apresentados na figura 2. Os valores de absorbância correspondem à média obtida com os soros de cinco animais de cada grupo diluídos a 1/320 para determinação de IgG e 1/40 nas determinações de IgM e IgA.

Como podemos visualizar na figura 2 ,os soros dos animais infectados apresentam níveis maiores de anticorpos IgG anti- *Yersinia* a partir do 3° dia p.i. em relação ao controle. A resposta foi aumentando progressivamente até o 28° dia pós-infecção. O nível de anticorpos IgM apresentou elevado na fase inicial da infecção atingindo pico máximo no 14° dia, decrescendo a seguir.

Anticorpos IgA anti-*Yersinia* não foram detectados em níveis significativos durante todo o período de infecção.

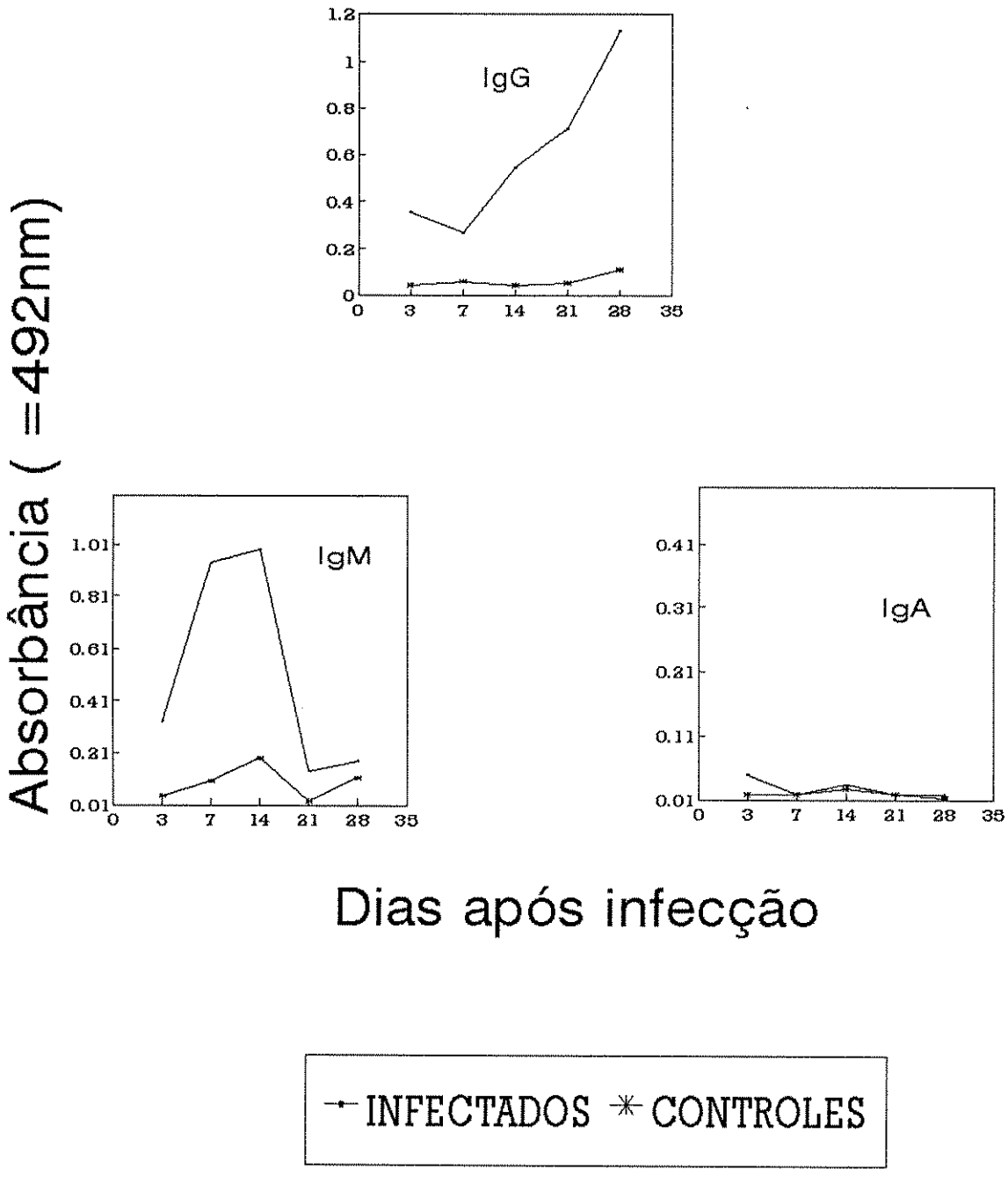

Figura 2- Detecção de níveis de anticorpos (IgG, IgM e IgA) anti-*Yersinia*, pela técnica de ELISA, nos soros dos camundongos Swiss após diferentes dias de infecção pela *Yersinia enterocolitica* O:3. As leituras representam a média de cinco animais.

1.3- Pesquisa dos Níveis de Auto-Anticorpos nos Soros de Camundongos Infectados com *Yersinia enterocolitica* O:3.

A reatividade de auto-anticorpos frente a um painel de estruturas autólogas foi analisada pela técnica de ELISA, nos diferentes dias de infecção, obtendo-se leituras ópticas pouco expressivas, mas com significância estatística.

Foi estabelecido que os valores de significância para $p \leq 0,05$ seriam considerados positivos (+), e valores para $p > 0,05$ seriam negativos (–).

Como demonstrado na tabela 2 os soros provenientes dos diferentes dias de infecção com O:3 foram reativos apenas com a miosina

Tabela 2 Detecção de níveis de auto-anticorpos frente a um painel de estruturas autólogas, pela técnica de ELISA, nos soros de camundongos infectados pela *Yersinia enterocolitica* O:3.

	Auto-antígenos						
	Miosina	Mielina	Actina	Colágeno	Laminina	Tiroglobulina	Cardiolipina
Reatividade	+	–	–	–	–	–	–

A reatividade positiva (+) representa a significância de densidades ópticas ($p \leq 0,05$ e N=5) nos diferentes dias de infecção

2- Avaliação da Produção de Imunoglobulinas em Camundongos Estimulados com os Derivados Bacterianos

2.1- Quantificação das Células Esplênicas Secretoras de Imunoglobulinas em Camundongos Swiss Estimulados com os Derivados Bacterianos:

2.1.1 Extrato Bruto

Na figura 3 temos os resultados obtidos após estimulação dos camundongos com extrato bruto, onde podemos observar um aumento do número de PFC-Igs totais durante toda a cinética de estimulação sendo que o número máximo ocorreu no 7° dia pós inoculação quando estava 139 vezes aumentado em relação ao controle.

O pico de secreção do isotipo IgM foi no 3° dia pós inoculação (aumento de 20 vezes) e permaneceu elevado até o 7° dia , após este período o número de PFC-IgM igualou-se ao controle.

O nível de secreção de IgA atingiu maior elevação no 21° dia pós inoculação (15 vezes) coincidindo com o pico do isotipo IgG1 (26 vezes). Os demais isotipos subclasse de IgG apresentaram máxima elevação no 7° dia pós inoculação onde IgG2a, IgG2b e IgG3 estavam 69, 78, e 77 vezes aumentado respectivamente quando comparado ao controle.

O maior aumento do número de células secretoras ocorreu com as seguintes sub-classes de IgG : IgG2a, IgG2b e IgG3.

A tabela 3 apresenta os valores das médias aritméticas e desvio padrão do número de PFC obtidos após estimulação com Extrato Bruto.

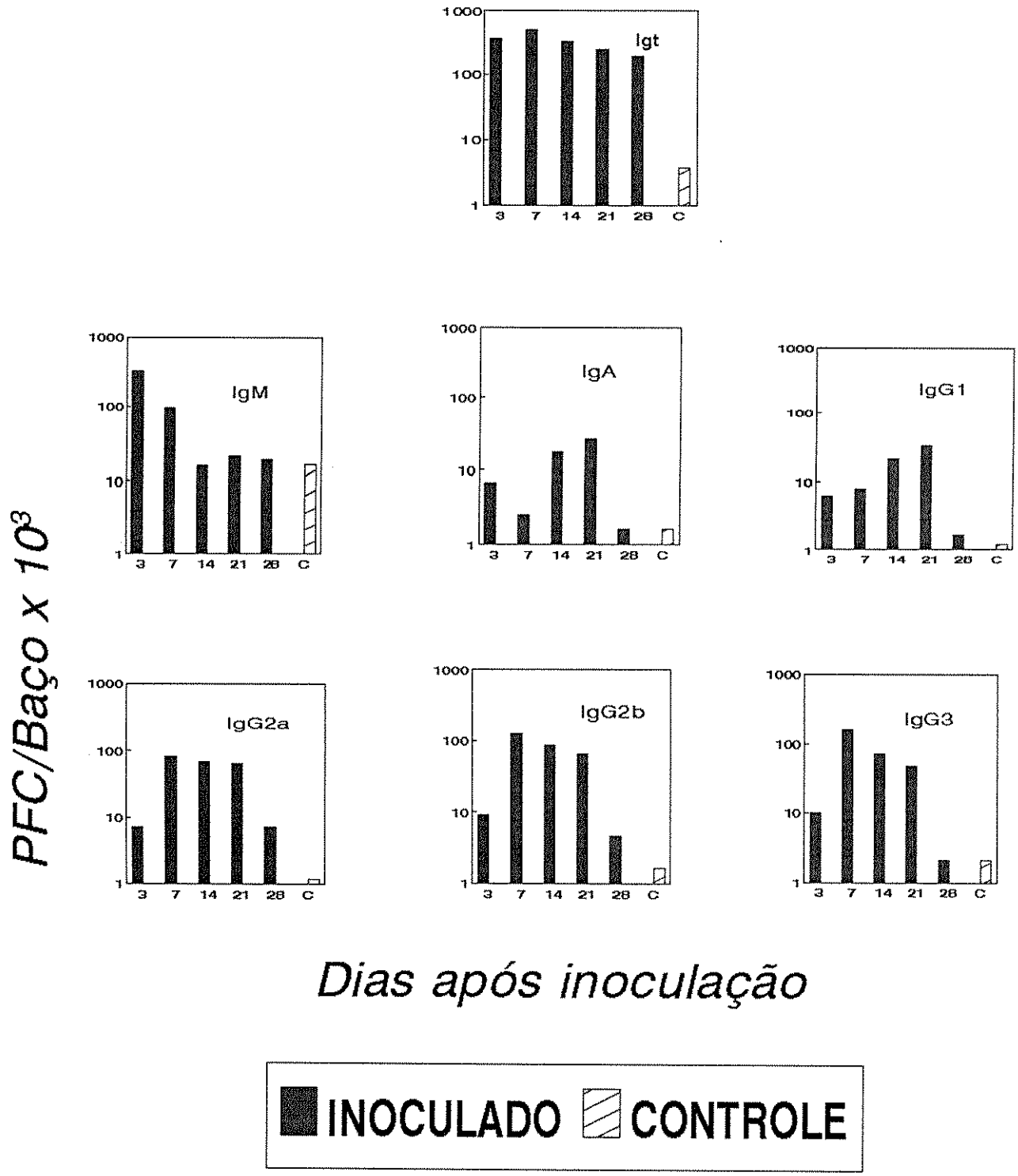

Figura 3 Número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (PFC-Reverso) ,determinada em camundongos Swiss após diferentes dias de inoculação com Extrato bruto de Yersinia enterocolitica O:3. As colunas cheias representam a média (n=5 animais) das determinações de Ig totais e isotipos. C = média dos vários grupos controles.

Tabela 3- Número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (PFC-Reverso), determinada em camundongos Swiss após diferentes dias de inoculação com Extrato Bruto de *Yersinia enterocolitica* O:3

	Média e desvio padrão do número de PFC/Baçox10^3					
	Dias Após Infecção					
	3°	7°	14°	21°	28°	Controle
IgTotal	370 ± 56,7	514 ± 148,1	331 ± 207,1	250 ± 33,3	189 ± 72,4	3,7 ± 1,48
IgM	319 ± 155	96,1 ± 67,1	15,4 ± 5,9	19,9 ± 9,5	18 ± 4,9	15,9 ± 5,15
IgA	7 ± 4,6	2,7 ± 1,5	16,5 ± 9,4	25,3 ± 14,7	1,7 ± 0,3	1,69 ± 0,02
IgG1	6,5 ± 3,6	8 ± 4,1	20,3 ± 11,0	31,2 ± 23,6	1,7 ± 0,6	1,2 ± 0,7
IgG2a	7,2 ± 6,7	8 3,3 ± 60,7	69,1 ± 36,0	63,3 ± 39,5	7,23 ± 4,09	1,2 ± 0,37
IgG2b	9,3 ± 5,13	128 ± 59,3	88,7 ± 56,0	66,7 ± 23,0	4,7 ±1,9	1,65 ± 1,0
IgG3	10,1 ± 10,3	162,0 ± 57,0	72,5 ± 48,6	48,3 ± 32,1	2,2 ± 0,03	2,1 ± 1,9

2.1.2 "Released Proteins"

Na figura 4, encontra-se representado o perfil de estimulação dos animais estimulados com "Released Proteins", obtido em meio de cultura em condições adequadas de cálcio e temperatura cuja concentração proteíca e de açúcar foi 2,4 mg/ml e 0,4 mg/ml com relação proteína/polissacáride de 6:1. Nesta figura observamos que o pico de secreção de Igs totais (239 vezes) foi no 3° dia o qual permaneceu elevado porém em níveis menores até o 28° dia pós inoculação. Também no 3° dia temos um aumento acentuado de IgM (58 vezes) o qual decresce a seguir permanecendo igual ao controle já a partir do 7° dia p.i.. Com os demais isotipos (IgA e sub-classes de IgG) observaram-se níveis máximos de secreção no 21° dia, sendo que o isotipo que apresentou maior aumento foi IgG3 aproximadamente 31 vezes em relação ao controle.

A tabela 4 apresenta os valores das médias aritméticas e desvio padrão do número de PFC obtidos após estimulação com "RP".

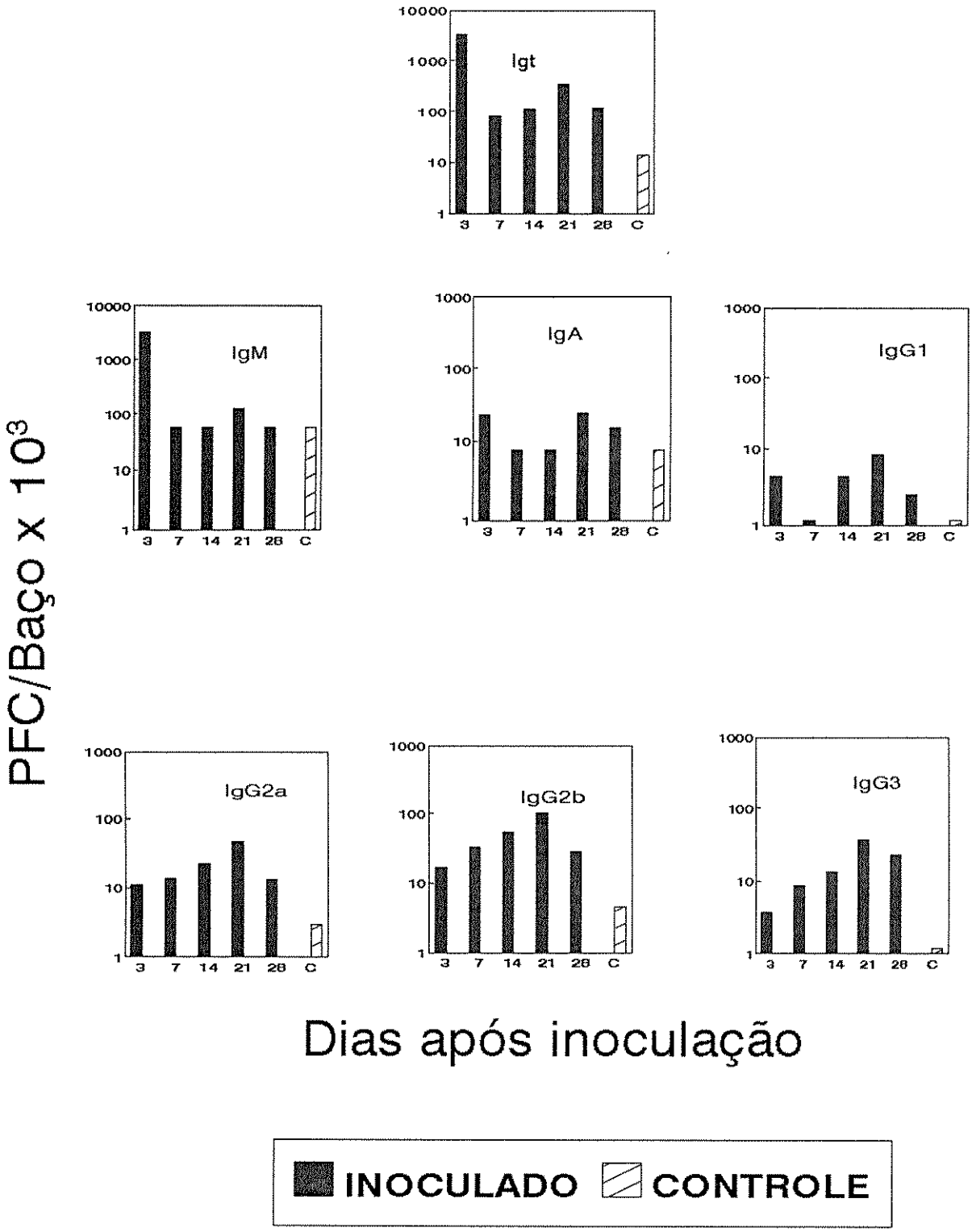

Figura 4 Número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (PFC-Reverso) , determinada em camundongos Swiss após diferentes dias de inoculação com "Released Proteins" de Yersinia enterocolitica O:3. As colunas cheias representam a média (n=5 animais) das determinações de Ig totais e isotipos. C= média dos vários grupos controles .

Tabela 4- Número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (PFC-Reverso), determinada em camundongos Swiss após diferentes dias de inoculação com " Released Proteins"de *Yersinia enterocolitica* O:3

	Média e desvio padrão do número de PFC/Baçox10^3					
	Dias Após Infecção					
	3°	7°	14°	21°	28°	Controle
IgTotal	3330 ± 242	80,8 ± 15,6	110 ± 1,96	345 ± 33,3	117 ± 7,37	13,96 ± 13,3
IgM	3264 ± 952	57 ± 3,4	57 ± 2,56	124 ± 19,5	57 ± 4,9	56,2 ± 11
IgA	22,7 ± 12,1	7,5 ± 0,4	7,5 ± 1,10	24,6 ± 0,9	15,4 ± 2,5	7,4 ± 6,3
IgG1	4,3 ± 2,8	1,2 ± 0,2	4,3 ± 1,0	8,2 ± 1,6	2,5 ± 0,3	1,2 ± 0,27
IgG2a	11,2 ± 9,6	13,9 ± 0,3	22,7 ± 5,0	48,0 ± 14,6	13,4 ± 7,9	3 ± 2,4
IgG2b	17 ± 10,2	33,2 ± 1,17	53,9 ± 5,7	102,4 ± 14	28,2 ± 6,3	4,6 ± 3,1
IgG3	3,7 ± 1,3	8,6 ± 2,4	13,5 ± 2,8	22,8 ± 5,1	22,8 ± 1,03	1,2 ± 0,4

2.1.3 LPS

E por fim, os animais inoculados com LPS demonstrado na figura 5 tiveram o número de PFC-Igs totais elevado já a partir do 3° dia (222 vezes) onde se apresenta com maior elevação. Este dia coincide com o pico de secreção de IgM (82 vezes). O pico de secreção para IgA, foi no 21° dia p. i. onde estava 4 vezes aumentado em relação ao controle.

As sub-classes de IgG apresentaram os seguintes picos de secreção: IgG1 no 3° dia com aumento de 4 vezes , IgG2a e IgG2b no 7° dia ,com aumento de 13 e 29 vezes respectivamente e IgG3 no 14° dia .

O maior aumento do número de células secretoras foi de Igs totais e IgM na fase inicial 3° dia após inoculação.

A tabela 5 apresenta os valores das médias aritméticas e desvio padrão do número de PFC obtidos após estimulação com LPS.

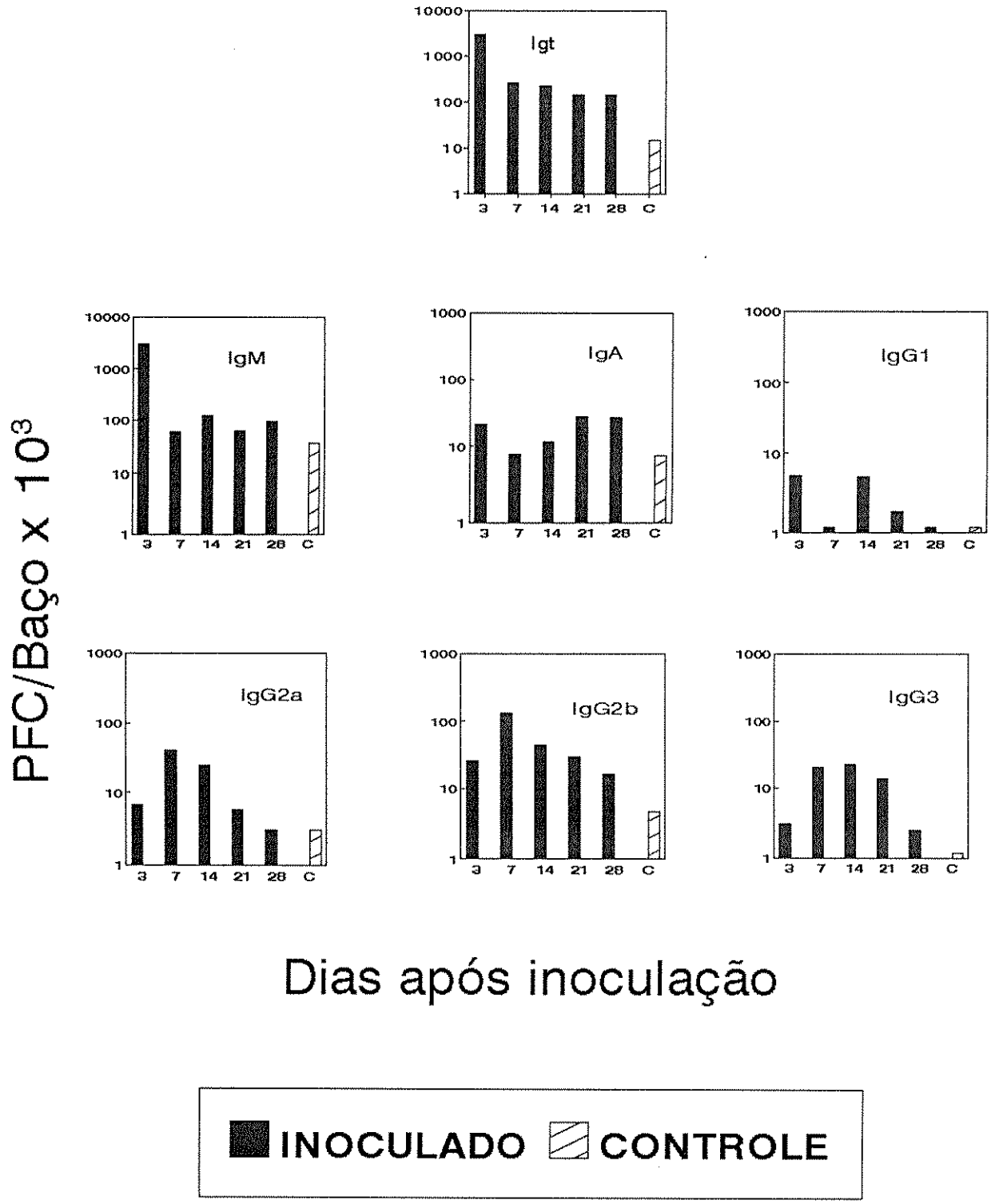

Figura 5 Número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (PFC-Reverso) , determinada em camundongos Swiss após diferentes dias de inoculação com LPS de Yersinia enterocolitica O:3. As colunas cheias representam a média (n=5 animais) das determinações de Ig totais e isotipos. C= média dos vários grupos controles.

Tabela 5 - Número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (PFC-Reverso), determinada em camundongos Swiss após diferentes dias de inoculação com Lipopolissácaride de *Yersinia enterocolitica* O:3

	Média e desvio padrão do número de PFC/Baçox10^3					
	Dias Após Infecção					
	3°	7°	14°	21°	28°	Controle
IgTotal	3100 ± 11,7	260 ± 155	229 ± 9,2	141 ± 2,6	140 ± 0,5	13,9 ± 13,3
IgM	3039 ± 62,8	60,8 ± 25,6	122 ± 39,2	63,5 ± 11,5	96 ± 18,3	36,8 ± 27,7
IgA	21,5 ± 5,5	7,5 ± 2,9	11,7 ± 2,72	27,8 ± 7,3	26,7 ± 1,5	7,46 ± 6,39
Ig1	5 ± 0,64	1,2 ± 0	4,8 ± 2,9	1,9 ± 0,7	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,3
IgG2a	6,75 ± 1,4	39,5 ± 17,6	24,2 ± 4,7	5,6 ± 0,4	3 ± 0,6	3 ± 2,4
IgG2b	25,6 ± 4,3	135 ± 69,1	44,2 ± 7,6	29,2 ± 7,06	16,4 ± 7,0	4,6 ± 3,1
IgG3	3 ± 0,5	20,1 ± 12,02	22 ± 8,4	13,4 ± 4,1	2,5 ± 0,21	1,2 ± 0,42

2.2- Produção de Anticorpos Específicos para a *Yersinia* nos Soros de Camundongos Estimulados com os Derivados Bacterianos:

O nível de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*Yersinia* foi detectado por ELISA semelhantemente ao ítem 1.2, agora nos soros estimulados com extrato bruto, "Released Proteins" e LPS (Figuras 6, 7 e 8 respectivamente)

Como podemos observar nas figuras 6, 7 e 8, o perfil da cinética de produção de anticorpos específicos foi semelhante para os três grupos de animais estimulados com diferentes antígenos, onde observamos um aumento progressivo do nível de anticorpo IgG a partir do 3° dia atingindo um nível máximo no 21° dia com decréscimo posterior..

O nível de anticorpos IgM específicos foi no máximo no 7° dia pós inoculação decrescendo progressivamente a seguir.

Títulos de IgA não foram detectados em níveis significativo em nenhum grupo de animais.

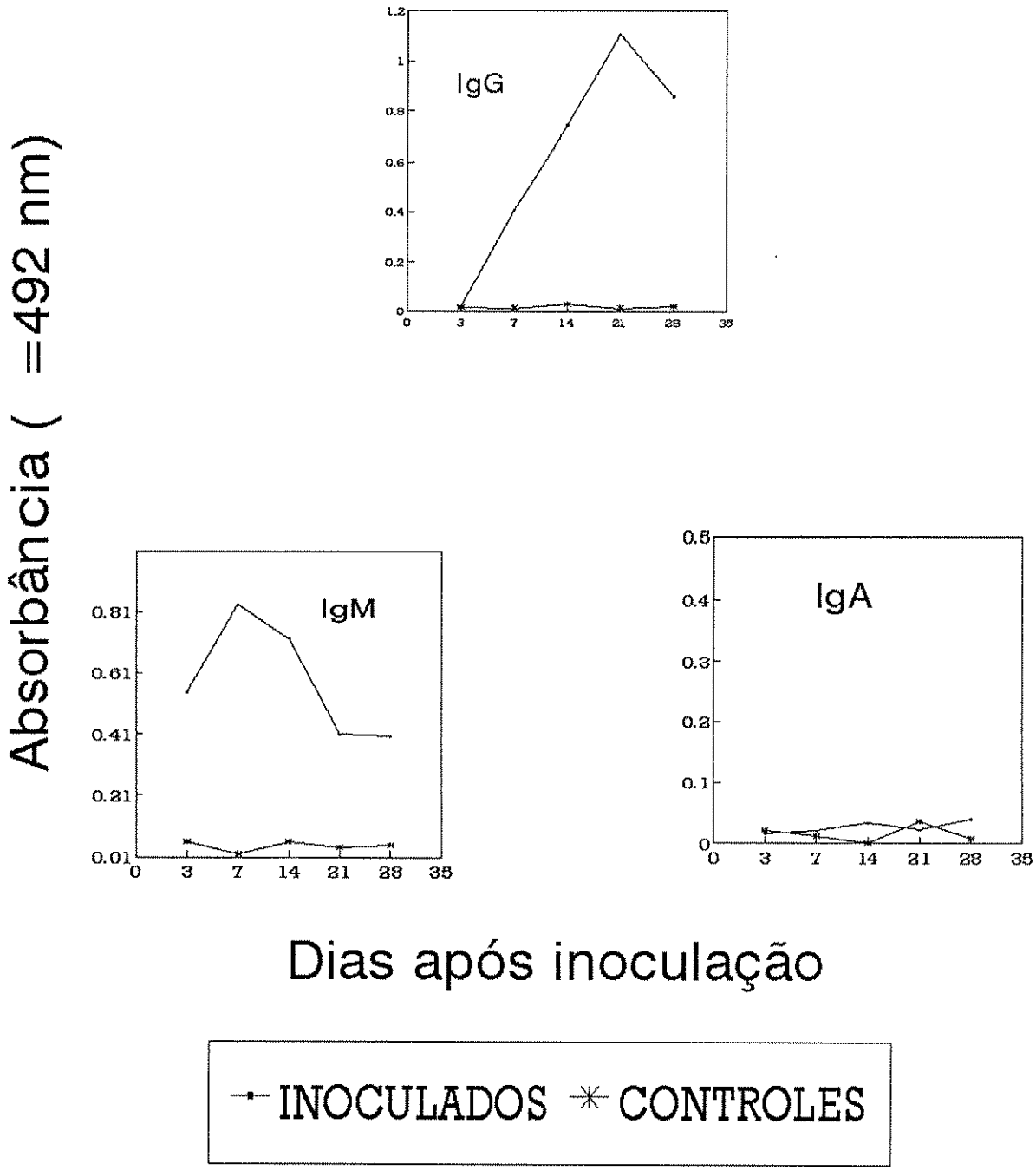

Figura 6 Detecção de níveis de anticorpos (IgG, IgM,IgA) anti-Yersinia, pela técnica de ELISA, nos soros dos camundongos normais e após diferentes dias da inoculação com Extrato bruto de *Yersinia enterocolitica* O:3. As leituras representam a média de cinco animais.

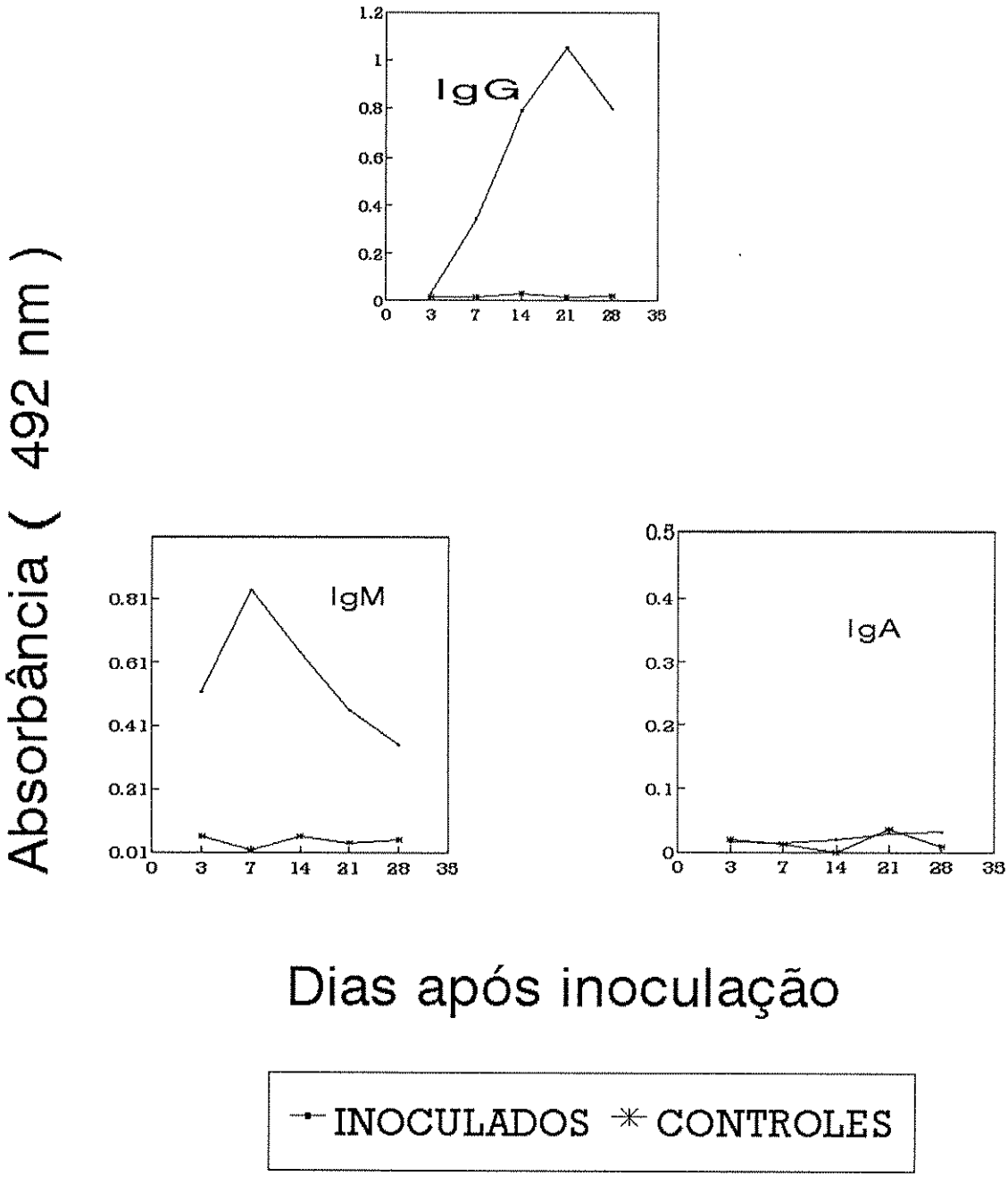

Figura 7 Detecção de níveis de anticorpos (IgG,IgM e IgA) anti-Yersinia, pela técnica de ELISA, nos soros dos camundongos Swiss após diferentes dias da inoculação com "Released Proteins" de *Yersinia enterocolitica* O:3. As leituras representam a média de cinco animais.

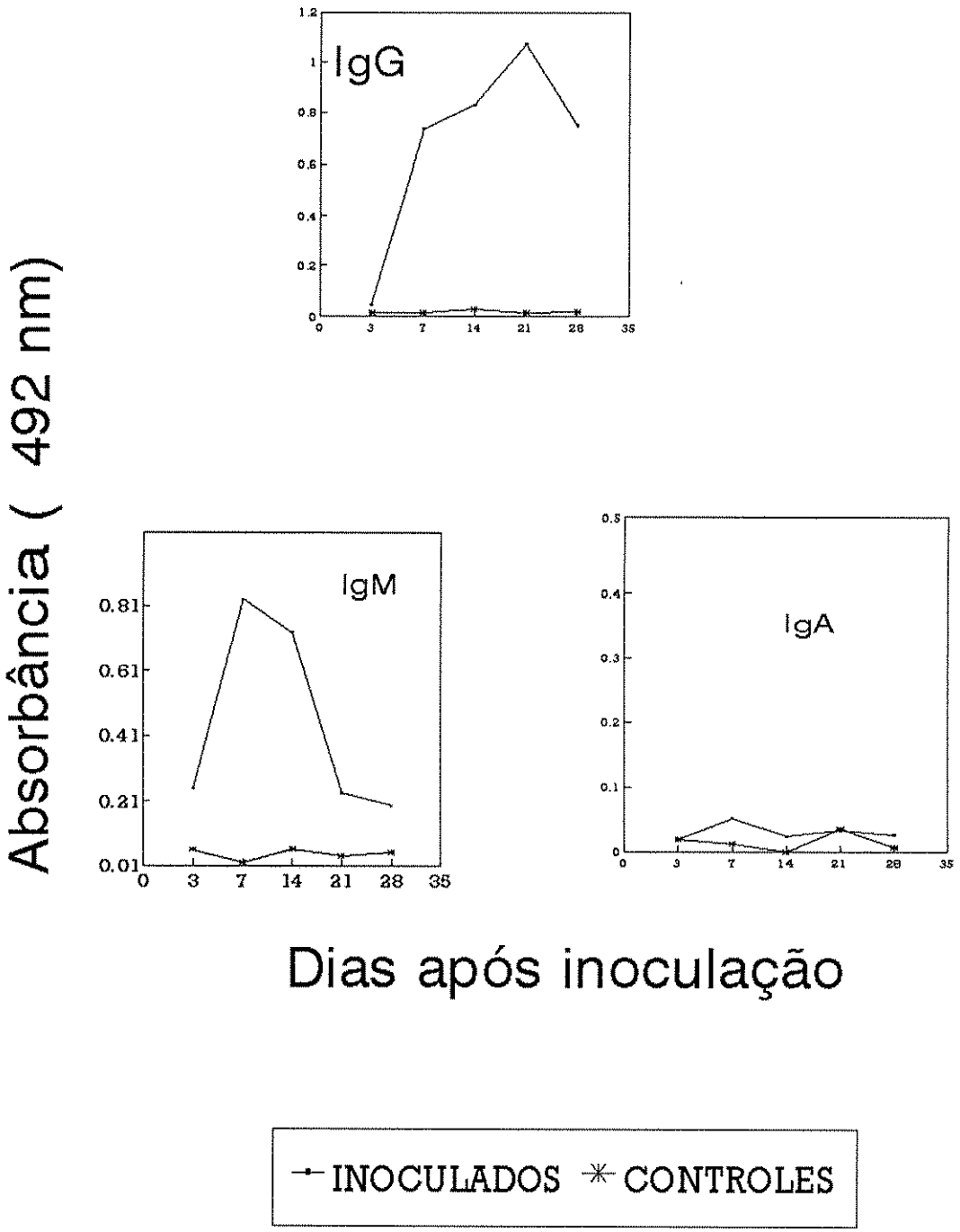

Figura 8 Detecção de níveis de anticorpos (IgG, IgM e IgA)anti-Yersinia, pela técnica de ELISA, nos soros dos camundongos normais e após diferentes dias da inoculação com LPS de *Yersinia enterocolitica O:3. As leituras representam a média de cinco animais.*

2.3- Pesquisa dos Níveis de Auto-Anticorpos em Soros de Camundongos Estimulados com Derivados de *Yersinia enterocolitica* O:3

A reatividade de auto-anticorpos frente a um painel de estruturas autólogas foi analisada pela técnica de ELISA, nos diferentes dias de estimulação, obtendo-se leituras ópticas pouco expressivas, mas com significância estatística.

Foi estabelecido que os valores de significância para $p \leq 0,05$ seriam considerados positivos (+) e valores para $p > 0,05$ seriam considerados negativos (–).

Na tabela 6.está demontrada a reatividade dos soros provenientes dos diferentes dias de estimulação com Releases proteins ou Lipopolissacárides; assim os soros dos animais inoculados com RP apresentaram reatividade significativa frente aos seguintes antígenos autólogos: mielina, tiroglobulina e cardiolipina e os inoculados com LPS apresentaram reatividade significativa para mielina, actina e laminina.

Tabela 6 - Detecção de níveis de auto-anticorpos frente a um painel de estruturas autólogas, pela técnica de ELISA nos soros dos camundongos estimulados com RP e LPS de *Yersinia enterocolitica* O:3

	Auto-antígenos						
	Miosina	Mielina	Actina	Colágeno	Laminina	Tiroglobulina	Cardiolipina
Reatividade							
RP	–	+	–	–	–	+	+
LPS	–	+	+	–	+	–	–

A reatividade positiva (+) representa a significância de densidades ópticas ($p \leq 0,05$e N=5) nos diferentes dias de estimulação.

DISCUSSÃO

O fenômeno de ativação policlonal linfócitária, no qual grande parte dos repertórios de linfócitos estimulados, assim como os seus produtos, não estão especificamente relacionados com estruturas antigênicas definidas, já foi verificado em diferentes modelos experimentais como nas infecções por protozoários, helmintos e bactérias (MILLET et alii, 1987, LOPES et alii, 1990.

Diferentes resultados demonstraram que a ativação policlonal de linfócitos pode ser induzida por endotoxinas de bactérias e super-antígenos o que poderia contribuir para o desenvolvimento de auto-imunidade. Infecções bacterianas podem levar à estimulação de vários repertórios linfocitários, entre os quais estariam clones auto-reativos que normalmente não se manifestariam significativamente, ou seriam anérgicos perante uma estimulação com estruturas moleculares autólogas (ABBAS et alii, 1994).

Assim, além das patologias associadas com as infecções primárias pela *Yersinia enterocolitica,* tal processo infeccioso pode, sob certas condições ainda não totalmente esclarecidas, levar ao desenvolvimento de diferentes formas de doenças auto-imunes como a artrite reativa (ReA) (LAHESMAA, 1994). A principal questão até o momento, ainda se prende ao desconhecimento sobre a patogênese da artrite reativa, se esta resultaria da persistência da infecção pelo microrganismo ou estaria vinculada à expansão da autoimunidade. Existem algumas evidências de que o fenômeno autoimune possa estar associado com uma resposta imune cruzada dirigida contra epítopos comuns ao patógeno e o hospedeiro (LAHESMAA et alii, 1993).

Entretanto, a ativação policlonal de linfócitos B deve representar um dos mecanismos importantes a justificar a manifestação auto-imune, pois a estimulação exarcebada de um grande número de células secretoras de imunoglobulinas, em geral de natureza inespecífica, pode incluir clones reativos com os constituintes autólogos (LAHESMAA et alii, 1994).

A ocorrência da ativação policlonal de linfócitos B na infecção murina por *Yersinia enterocolitica O:3* foi anteriormente demonstrada em nossos laboratórios (MEDEIROS, 1994), através da enumeração de células secretoras de imunoglobulinas, independentemente

da especificidade antigênica, através da técnica de PFC-Reverso , nas suspensões celulares de baços de camundongos infectados experimentalmente. Esses experimentos foram realizados em camundongos Swiss originados de criadouro convencional, isto é, sem barreiras para controle de patógenos específicos.Com base nesses resultados pudemos observar um aumento no número total de células secretoras a partir do 3° dia pós-infecção, quando apresentou-se 19 vezes elevada em relação ao grupo controle. O pico de secreção de IgM ocorreu no 3° dia pós infecção (11 vezes aumentado). No 7° dia pós-infecção também ocorreu o pico de secreção de IgA que nesta ocasião estava 7 vezes aumentado, IgG1 (11 vezes), IgG2a (22 vezes), IgG2b (28 vezes) e IgG3 (30 vezes). O maior aumento ocorreu portanto no número de células secretoras de IgG2b e IgG3, conforme podemos observar na figura 9 em anexo.(MEDEIROS, 1994)

Embora tenha ficado evidente a significativa amplificação do repertório de linfócitos B secretores de imunoglobulinas nos animais infectados em relação aos animais normais, caracterizando uma ativação policlonal, algumas questões permaneceram em aberto para melhor entendimento daqueles resultados, como as altas variações quantitativas observadas entre os indivíduos de um mesmo grupo, e os altos índices de ativação nos grupos de animais normais. A possibilidade da influência somatória de outros componentes estimuladores, presentes na carga parasitária do animal convencional, poderiam, entre outros fatores, explicar a inexistência da manifestação do quadro de artrite.

Com vistas à contribuição neste esclarecimento e consequente continuidade dos nossos estudos, lotes de camundongos Swiss, agora de origem SPF, foram infectados pela *Yersinia enterocolitica* O:3 e a seguir analisados quanto ao número de células esplênicas secretoras de imunoglobulinas em diferentes dias após a infecção.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram um aumento das células secretoras de anticorpos em todas as determinações realizadas (PFC-Igs totais e PFC-isotipos) com as suspensões celulares dos baços de animais infectados a partir do 3° dia de infecção, quando comparado às determinações feitas nos animais controle. Foi observada uma variação numérica para cada isotipo (Figura 1). A ativação máxima, medida com o soro anti-Igs totais,

que corresponde à somatória dos PFC para todos os isotipos, foi observada entre o 7° e 14° dia. A determinação com os isotipos resultou nas seguintes variações com relação ao pico de ativação: IgM no 3° dia; IgG2b e IgG3 no 7° dia; IgG1, IGg2a e IgA no 14° dia.

Pode-se verificar que a ativação não é restrita a determinados isotipos uma vez que todos estavam aumentados, havendo uma predominância para as células secretoras de IgG1, IgG2a e IgG3 .

À semelhança dos resultados obtidos com os animais Swiss convencionais (aumento do número total de PFC em quase 20 vezes), os experimentos atuais também demonstraram uma ativação policlonal de linfócitos B nos animais infectados.

Ao compararmos esta ativação entre camundongos Swiss convencionais e de origem SPF, pode ser verificada uma redução quantitativa do número total de PFC em cerca de 12 vezes. Esta redução poderá ser explicada pela diferença na carga microbiana que apresenta esses dois modelos animais, uma vez que nos camundongos convencionais, utilizados como controles, a flora microbiana foi por si só responsável por uma estimulação "natural"de linfócitos B.

Os resultados de GRIPENBERG-LERCHE & TOIVANEN (1993), na infecção experimental em ratos, ressaltam a importância da carga microbiana nos animais convencionais na susceptibilidade ao desenvolvimento de artrite, argumento que corroborou na condução do presente trabalho em animais de origem SPF. Nossos resultados não permitiram, entretanto, afirmar que a flora microbiana de camundongos Swiss tornava o animal mais ou menos suscetível ao desenvolvimento de seqüela auto-imune.

A cepa de *Yersinia* utilizada neste trabalho coincide com aquela utilizada por MEDEIROS (1994), que embora seja virulenta e portadora de plasmídeo, não manifestou propriedades perceptíveis de artritogenicidade. Não se pode descartar que as condições experimentais não tenham sido favoráveis.

Até o presente momento apenas o grupo de TOYOS et alii (1990) demonstrou que *Yersinia enterocolitica* O:3 é experimentalmente artritogênica para camundongos (Swiss, C3H/HeJ e BALB/c). Nesses animais a artrite foi induzida por via oral após um pré-tratamento com desferrioxamine. Esses autores também verificaram que os camundongos

heterozigotos eram mais susceptíveis à indução de artrite por via intra-venosa do que as linhagens isogênicas. Um fato interessante é que em todos os episódios de inflamação aguda estudados, bactérias viáveis foram isoladas da região artrítica (TOYOS et alii., 1992).

O mecanismo pelo qual a infecção causada por este microrganismo leva ao desenvolvimento de artrite não está bem definido, embora seja conhecido que mais de 85% dos individuos afetados apresentam o fenótipo de HL-A - B27 (LAITNEN et alii., 1977; LEIRISALO et alii., 1982).

Infecções causadas pela *Yersinia enterocolitica* O:3 estão freqüentemente associadas à produção de altos títulos de anticorpos. Para a quantificação de anticorpos no teste ELISA, tem sido utilizado como antígeno a bactéria inteira, LPS e RP (GRANFORS et alii, 1989, MAKI-IKOLA et alii, 1994).

Os resultados, obtidos neste trabalho através do teste de ELISA após infecção com 10^9 bactérias/ml, demonstraram uma produção crescente de IgG detectada a partir do 3° dia, com aumento progressivo persistindo durante todo o curso da infecção. Níveis elevados de IgM foram detectados no início da infecção com queda progressiva. O baixo nível de anticorpos IgA anti-*Yersinia* foi semelhante àquele observado no grupo controle. Esta baixa resposta de IgA em associação com a ausência de lesões artríticas, também, ocorre em pacientes com Yersiniose sem manifestação de artrite (GRANFORS et alii, 1980, 1986, 1988).

A presença de anticorpos específicos no soro dos animais de origem SPF infectados foi semelhante ao observado com o soro dos animais convencionais submetidos ao mesmo tratamento (MEDEIROS, 1994).

KONO et alii, 1985, trabalhando com camundongos CBA/H infectados por via oral pela *Yersinia enterocolitica* O:3 (10^8 bactérias por camundongos), observou baixos níveis de anticorpos específicos IgG, IgM e IgA. As diferenças entre os dados de KONO et alii e os obtidos neste trabalho refletem possivelmente as diferenças de suscetibilidade do animal utilizado; da via de inoculação; da quantidade de bactérias inoculadas e da própria cepa em estudo.

O mecanismo pelo qual *Yersinia enterocolitica* interage com o sistema imune humano e produz sinovites inflamatórias ainda não está bem esclarecido. Informações recentes indicam que as sinovites características dessas doenças resultam, em parte, da capacidade do patógeno artritogênico modular seletivamente à resposta imune do hospedeiro infectado. Algumas propriedades de um patógeno artritogênico são artrotropismo, persistência em hospedeiros suscepíteis, ativação seletiva de células Th1, modulação do sinal de transdução, propriedade de super-antígeno, mitógeno de célula B (LAHESMAA et alii, 1994).

Estudos realizados "in vitro" e observações clínicas indicaram que a maioria dos pacientes apresentam uma persistência de sinovites associada à presença do patógeno ou de seus componentes antigênicos. Na artrite reativa, a resposta imune do hospedeiro aos antígenos, presentes nas articulações, possui um palpel chave na iniciação da inflamação sinovial. Embora não tenha sido isolada a bactéria viavél do fluído sinovial de pacientes com artrite reativa, componentes antigênicos deste patógeno têm sido demonstrado nas suas células e no tecido através de técnicas imunohistoquímicas (TOIVANEN, 1994). Formas de LPS de *Yersinia* foram encontradas nas articulações de pacientes com artrite reativa (HERMANN, 1993).

Uma das preocupações centrais deste estudo foi determinar os possíveis derivados da bactéria que estariam envolvidos na ativação policlonal. Em vista disso, foram preparados a partir da *Yersinia enterocolitica* O:3, os seguintes componentes: extrato bruto, "Released Proteins"-RP e o LPS. A seguir, foi realizada uma comparação entre a resposta imune humoral, desenvolvida durante a infecção, e a resultante da estimulaçao com os diferentes derivados.

Lotes de camundongos foram estimulados com as várias preparações e acompanhados em diferentes dias numa cinética similar à da infecção. O número de células secretoras de imunoglobulinas foi determinado nos baços desses animais assim como os níveis de anticorpos específicos para *Yersinia.*

O Extrato Bruto foi preparado a partir da sonicação de uma suspensão de *Yersinia enterocolitica 0:*3, apresentando uma relação proteína polissacáride da ordem de 14:1.

No grupo de animais Swiss de origem SPF, inoculados com Extrato Bruto, como demonstrado na Figura 3, também ocorreu uma ativação policlonal dos linfócitos B, resultante de um aumento das células secretoras de anticorpos em todas as determinações (PFC-Ig totais e PFC-isotipos) realizadas nos animais estimulados em comparação com animais normais. O pico de Igs totais foi no 7° dia pós inoculação semelhante ao da bactéria inteira.

O pico de IgM foi no 3° dia , do mesmo modo que ocorreu com LPS e RP. Os isotipos IgG 2a, IgG2b e IgG3 tiveram máxima elevação no 7° dia pós-inoculação,e finalmente IgA e IgG1 tiveram pico no 21° dia. Os isotipos mais ativados foram IgG2a, IgG2b e IgG3.

Embora esta preparação não seja desprovida de LPS, a sua concentração proteíca é elevada, o que permite sugerir que a ativação policlonal das células B após infecção com *Yersinia* não se dá apenas pela estimulação com o LPS, mas também pelos antígenos proteícos derivados.

"Released proteins" (RPs) são proteínas codificadas pelo plasmídeo de virulência e secretadas em condições adequadas de temperatura e concentrações de íons cálcio. Estas proteínas secretadas (RPs) são expressas "in vivo", e tanto humanos como animais produzem anticorpos contra as mesmas estruturas durante a infecção por *Yersinia.* Análise imunoquímica tem demonstrado que RPs de diferentes espécies de *Yersinia* são similares em massa molecular e antigenicidade, sendo portanto utilizadas como antígeno especifico independente do sorotipo para diagnóstico de *Yersinioses* em técnicas de imunoblotting e ELISA (NAUMANN,1993, MAKI-IKOLA et alii, 1991, 1994, HEESEMANN,1987). No grupo de animais SWISS de origem SPF, inoculados com RPs, como demonstrado na Figura 4 tambem ocorreu uma ativação policlonal dos linfócitos B, resultante de um aumento das células secretoras de anticorpos em todas as determinações (PFC-Ig totais e PFC-isotipos) realizadas nos animais estimulados em comparação com animais normais. O máximo de ativação medida com soros anti-Igtotal e anti-IgM foi observado no 3°dia. Com os demais isotipos (IgA e sub-classes de IgG) observaram-se níveis máximos de secreção no 21° dia.

Lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas são potentes estimuladores de linfócitos B de camundongo "in vivo" e "in vitro", tendo sido implicado como um dos

possíveis responsáveis pelos eventos que levam ao desenvolvimento da artrite reativa. Na ausência de antígenos, LPS estimula a proliferação e secreção de anticorpos IgM policlonais inespecíficos (ANDERSSON,et alii, 1976, COUTINHO & MOLLER, 1975). Fagócitos mononucleares são capazes de degradar LPS de *Yersinia,* e devido a sua mobilidade, podem transportar LPS do sítio da infecção primária para outras partes do corpo, como articulações (WUORELA et alii, 1993).

No grupo de animais Swiss de origem SPF, inoculados com LPS, como demonstrado na Figura 5 ocorreu uma ativação policlonal dos linfócitos B, resultante de um aumento das células secretoras de anticorpos em todas as determinações (PFC-Ig totais e PFC-isotipos), realizadas nos animais estimulados em comparação com animais normais. O máximo de ativação medida com os soros anti-Ig total e anti-IgM, foi observado no 3° dia. O número de células secretoras de IgM foi 82 vezes maior, quando comparado com as determinações de IgM dos animais controles. O pico de secreção para IgG2a e IgG2b foi no 7° dia; IgG3 no 14°; e IgA no 21° dia.

IZUI et alii (1977, 1979) ao testarem preparações de LPS originárias de várias fontes, quanto à sua atividade mitogênica para os linfócitos B, verificaram que o LPS R595 de *S. minisota* foi a preparação que apresentou maior nível de estimulação, resultando numa produção acelerada e prolongada de IgM em várias linhagens de camundongos, inclusive em animais atímicos. Também foi estimulada a secreção de imunoglobulina IgG, havendo porém restrição de subclasses com aumento de níveis séricos apenas de IgG2b e IgG3. Já em camundongos atímicos, o LPS R595 estimulou a produção de todas as subclasses de IgG.

BJORKLUND & COUTINHO, 1983, verificaram que LPS de *Echerichia coli* administrado por via intravenosa em camundongos C3H/TIF resultava num rápido aumento no número de PFC-IgM das células esplênicas (20 vezes aumentadas em relação ao controle). Embora inibidas nos primeiros dois dias, IgG3, IgG2b e IgG2a foram estimuladas a seguir, alcançando números que são 100, 40 e 30 vezes respectivamente maiores do que aqueles dos camundongos normais. Em nossas determinações realizadas com o LPS administrado por via intravenosa em camundongos Swiss-SPF, também foi observado um rápido aumento do número de PFC-IgM.

A cinética de produção de anticorpos específicos no soro dos animais infectados com células viáveis e inoculados com Extrato Bruto, RP e LPS e foi determinada através do teste de ELISA, utilizando como antígeno o Extrato Bruto já descrito.

O perfil da produção de anticorpos especificos determinados nos soros dos camundongos Swiss de origem SPF infectados foi semelhante àquele observado com os animais Swiss convencionais.

Como demonstrado na Figura 2 a infecção pela *Yersinia* estimulou a produção de altos níveis de IgG os quais foram detectados já a partir do 3° dia, aumentando progressivamente e persistindo durante todo o curso da infecção. Níveis elevados de IgM foram detectados no início da infecção com uma queda posterior.

Nos soros dos animais inoculados com Extrato Bruto (Figura 6) e Rps (Figura 7), os níveis de produção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*Yersinia* foram semelhantes àqueles observados nos animais inoculados com LPS.

Nos soros dos animais inoculados com LPS, Figura 8, o pico de produção de anticorpos IgG antí-*Yersinia* ocorreu no 21°, decrescendo a seguir. O máximo de elevação dos níveis de anticorpos IgM foi observado no 7°dia. Os níveis de anticorpos IgA anti-*Yersinia* foi semelhante aos apresentados pelo grupo controle.

Nos animais infectados com células viáveis de *Yersinia enterocolitica* 0:3, a bactéria permanece multiplicando-se no hospedeiro e ativando o sistem imune, o que explica a elevação contínua dos níveis de anticorpos de IgG anti-*Yersinia* diferente do que ocorre com os antígenos derivados da bactéria. O período de permanência desta bactéria no intestino dos animais infectados por via intravenosa é de aproximadamente 49 dias (MEDEIROS, et alii, 1987).

Considerando-se que a *Yersinia enterocolitica* O:3 está associada a um quadro de artrite reumatóide, como uma manifestação secundária após a infecção, uma pesquisa de auto-anticorpos foi realizada nos diferentes soros provenientes de quaisquer estimulações. Utilizando-se a técnica de ELISA, os soros foram testados frente a um painel de constituíntes autólogos representados por: miosina, mielina, actina, colágeno, tireoglobulina, laminina e cardiolipina.

Nos resultados das análises dos soros de animais infectados pela *Yersinia* (tabela2) foi demonstrado reatividade apenas com a miosina ($p \leq 0,05$) dados esses que não podem ser conclusivos e que deverão ser melhor explorados.Nos soros dos animais estimulados com RP a reatividade foi significativa ($p \leq 0,05$)frente os seguintes auto-antígenos: mielina, tiroglobulina e cardiolipina.Já os soros dos animais inoculados com LPS mostrou-se reativo ($p \leq 0,05$)com os seguintes antígenos autólogos : mielina, laminina e actina. A baixa reatividade detectada pode estar associada a problemas relativos à padronização da técnica de ELISA; na dependência da configuração estrutural dos diferentes antigenos alvo empregados, e uma possivel desnaturação da estrutura terciária com o comprometimento dos epítopos antigênicos dessas moléculas, em decorrência do manuseio nos procedimentos de purificação e de acondicionamento. Alterações importantes também podem ocorrer durante a imobilização dos antígenos em superfície sólidas. No teste ELISA, uma fonte freqüente de erro tem sido atribuída a ligações não específicas de imunoglobulinas, presentes na amostra de soro testada, ou dos anticorpos marcados com enzima (LYMBERI & BARBOUCHE, 1990).

Em conclusão os camundongos Swiss de origem SPF infectados com *Yersinia enterocolitica O: 3* ou estimulados com os seus derivados.apresentaram uma ativação policlonal do repertório de linfócitos B. À semelhança do que ocorre com camundongos Swiss convencionais o resultado de tal ativação policlonal é provavelmente não apenas da estimulação de LPS mas de outros componentes envolvidos na infecção. A diferença no perfil de um animal convencional e um de origem SPF reflete a influência do microambiente do hospedeiro na resposta imune

Embora não tenha sido observado sinais de artrite nos animais submetidos às diferentes estimulações, a detecção de anticorpos nos seus soros para constituintes autólogos é sugestiva para uma possível associação entre o fenômeno de ativação policlonal e a regulação do sistema imunológico.

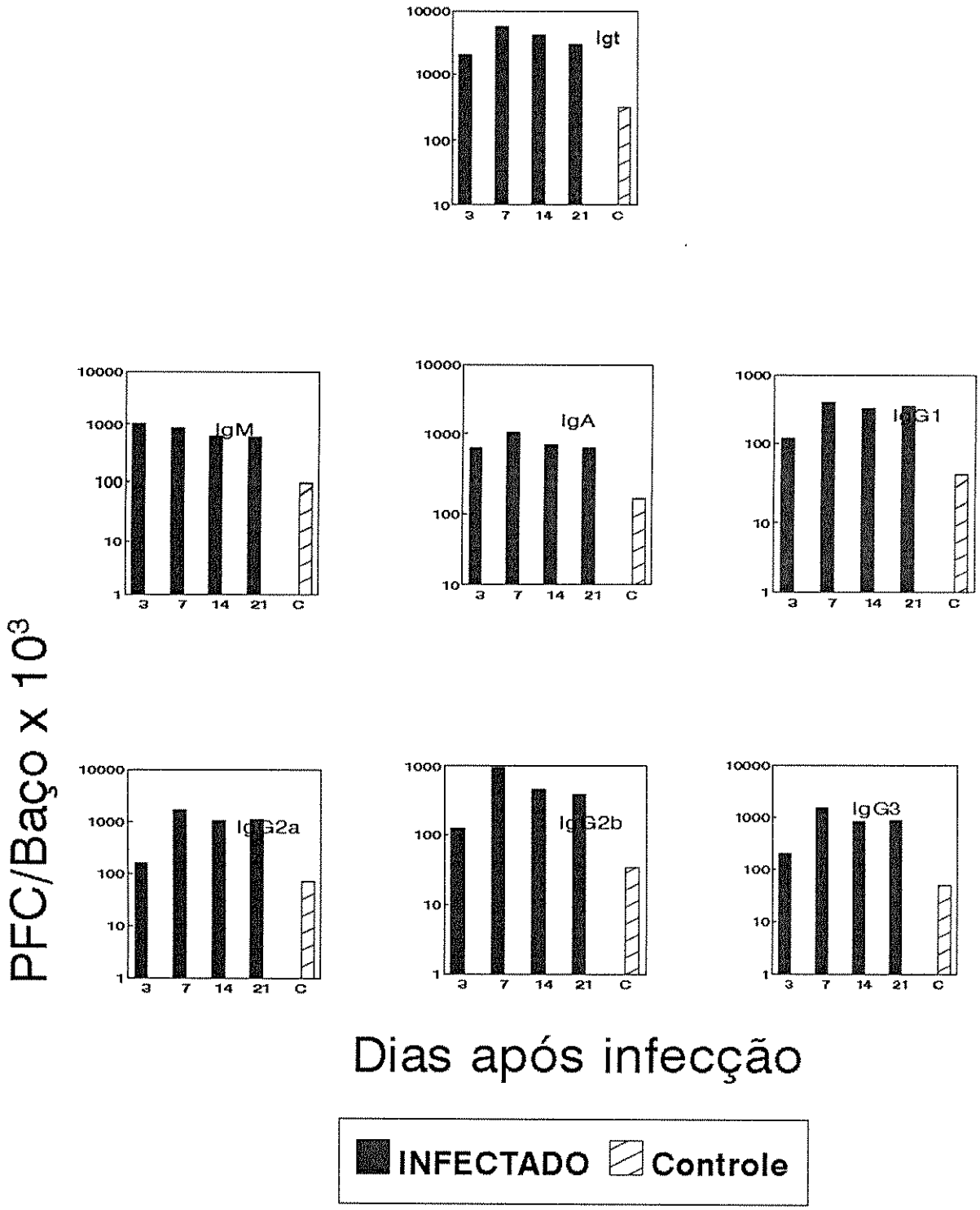

Figura 9 Número de PFC (Igs totais e isotipos) em escala logaritmica, determinado no baço de camundongos normais e infectados com Yersinia enterocolitica O:3.O valor expresso em cada barra representa a média de cinco animais. C=a média dos vários grupos controles.

CONCLUSÕES

Em vista dos resultados apresentados neste trabalho, é possível chegar às seguintes conclusões:

1 - Na infecção experimental de camundongos Swiss-SPF por via intravenosa com *Yersinia enterocolitica* O:3 ocorreu uma ativação de linfócitos B.

2 - A estimulação de camundongos com os derivados bacterianos extrato bruto, "Released Proteins"- RPs e LPS, igualmente promoveu uma ativação policlonal. Esta ativação é provavelmente decorrente não apenas da estimulação feita pelo LPS nas células bacterianas, mas também pela estimulação com outros constitutintes bacterianos como os "Released Proteins"-RPs.

3 - O processo de ativação policlonal, demonstrado durante a infecção ou sob a estimulação com os derivados bacterianos, é acompanhado da produção de anticorpos específicos anti-*Yersinia* predominando elevados títulos séricos dos isotipos IgG e IgM e baixa concentração de IgA.

4 -Embora não tenha sido observada sinais de artrite nos animais submetidos às diferentes estimulações, a detecção de anticorpos nos seus soros para contituíntes autólogos é sugestiva para uma possível associação entre o fenômeno de ativação policlonal e a regulação do sistema imunológico. .

5 - A comparação do perfil do comportamento de um animal criado convencionalmente com camundongos criados em biotério com barreira ressalta a importância da influência do microambiente do hospedeiro na resposta imune.

RESUMO

A infecção por *Yersinia enterocolitica* O:3 é uma dentre várias patologias humanas causadas por bactérias gram-negativas, que pode resultar em um quadro de doenças auto-imunes, entre elas a artrite reativa. A ativação policlonal de células B tem sido um dos mecanismos propostos que levaria a um aumento de produção de imunoglobulinas auto-reativas e por conseqüinte estaria associada à indução de uma doença auto-imune. Esta ativação de linfócitos B associada à infecção pela *Yersinia enterocolitica* O:3, foi pela primeira vez demonstrada em estudos realizados por MEDEIROS, em 1994, a partir de um modelo experimental desenvolvido em camundongos SWISS convencionais.

Neste presente trabalho utilizando camundongos Swiss originariamente livres de patógenos específicos (SPF) foi quantificada células esplênicas secretoras de imunoglobulinas (Igs totais e isotipos) após infecção com a *Yersinia enterocolitica* O:3 e estimulações com seus derivados: Extrato bruto, "Released Proteins' (RP) e Lipopolissacárides, através da técnica de PFC-Reverso-Proteína A, foi utilizado animais normais como grupo controle. Nos soros desses mesmos animais foram detectados níveis de anticorpos (IgG, IgMe IgA) anti-*Yersinia*.e pesquisados auto-anticorpos frente a um painel de constituíntes autólogos, representados por: miosina , mielina, actina, colágeno, tireoglobulina, laminina e cardiolipina através da técnica de ELISA

Os resultados demonstraram uma elevação no número de células esplênicas secretoras de anticorpos em todas as determinações realizadas (PFC-Ig totais e PFC-isotipos) com animais infectados com *Yersinia enterocolitica* O:3 ou inoculados com os seus derivados a partir do terceiro dia de inoculação.Estes dados representam uma redução quantitativa do número total de PFC em cerca de 12 vezes em relação àquela observada nos animais convencionais.

Anticorpos IgG e IgM específicos anti-*Yersinia* foram detectados em níveis elevados nos soros dos animais infectados ou estimulados com os diferentes derivados, porém não foram detectados níveis significativos de IgA

Na pesquisa de auto-anticorpos realizada nos soros de animais infectados pela *Yersinia* foi demonstrada reatividade apenas com a miosina, enquanto que os soros dos animais estimulados com LPS foram reativos com mielina, actina e laminina e os inoculados com RP reagiram com mielina, tiroglobulina e cardiolipina.

Em conclusão os camundongos Swiss de origem SPF infectados com *Yersinia enterocolitica O: 3* ou estimulados com os seus derivados.apresentaram uma ativação policlonal do repertório de linfócitos B. À semelhança do que ocorre com camundongos Swiss convencionais o resultado de tal ativação policlonal é provavelmente não apenas da estimulação de LPS mas de outros componentes envolvidos na infecção. A diferença no perfil de um animal convencional e um de origem SPF reflete a influência do microambiente do hospedeiro na resposta imune

Embora não tenha sido observado sinais de artrite nos animais submetidos às diferentes estimulações, a detecção de anticorpos nos seus soros para constituíntes autólogos é sugestiva para uma possível associação entre o fenômeno de ativação policlonal e a regulação do sistema imunológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A .H., & POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**.Philadelphia, W.B. Saunders company, 1994.

ANDERSSON, J., SJOBERG, O. & MOLLER, G. Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation. **Transplant Rev** , v.11, p. 131-7, 1976.

ARAÚJO, P. M. F., HOLMBERG, D., MARTINEZ, A. C. & COUTINHO, A Idiotypic multireactivity of "natural antibodies": "natural" anti-idiotypes also inhibit helper cells with cross-reactive clonotypes. **Scand.J. Immunol.**, v.125, p.497-506, 1987.

BERNABÉ, R. R. TUNESKOG, M., FORNI, L. MARTINEZ, A. C., HOLMBERG, D., IVARS, F. & COUTINHO, A. The protein A plaque assay for the detection of immunoglobulin - secreting cells In: BERNABÉ, R. R. , TUNESKOG, M., FORNI, L., MARTINEZ, A. C. & COUTINHO, A. **Immunological Methods**, Academic Press, v.2, p.187-97, 1981.

BJORKLUND, M. & COUTINHO. A Isotype commitment in the ïn vivo" immune response. II Policlonal plaque-forming cell responses to lipopolysaccharide in the spleen and bone marrow. **Eur. J. Immunol.**, v.13, p.44-50, 1983.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microrganism. **Crit. Rev. Microbiol**, v.5, p.11-41, 1977.

BOLIN, I. PORTNOY, D. A., WOLF-WATZ, H. Expression of the temperature inducible other membrane proteins of *Yersinia*, **Infect Immun.**, v.48, p.234-46, 1985.

BOYCE, J. M; EVANS, J. R.; EVANS, D. G. & DU PONT, H. L. Production of heat-stable,methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica* . **Infect. Immun.,** v.25, p.532-7, 1979.

BURNET, F. M. A modification of Jerne´s theory of antibody production using the concept of clonal selection. **Aust. J. Sci.,** v.20, p.67-77, 1957.

CARSON, D. A.Genetic factors in the etiology and pathogenesis of autoimmunity. **FASEB J.**, v.6, p.2800-5, 1992.

CARTER, P. B., VARGA, C. F. & KEET, E. E. New strain of *Yersinia.enterocolitica.* pathogenic for rodents. **Appl. Microbiol**, v.26, p.1016-8, 1973.

CARTER, P. B., & COLLINS, F. M. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in mice: kinecties of growth, **Infect. Immun.**, v.9, p.851-7, 1974.

COUTINHO, A. & MOLLER, G. Thymus independent B cell induction and paralysis. **Adv.Immunol.**, v.21, p.113, 1975.

COUTINHO, A., FORNI, L., HOLMBERG, D., IVARS, F. & VAZ, N. M. From an antigen centered, clonal perspective of immune response to an organism centered, network perspective of autonomous activity in a self referencial immune system. **Immunol. Rev.**, v.79, p.151-68, 1984.

COUTINHO, A. & FORNI, L. Beware of idyotipes a commentary. **J. Moll. Cell. Immunol.** v.1, p.345-6,1985.

COUTINHO, A. Beyond clonal selection and network. **Immunol. Rev.**, v.110, p.64-87,1989.

DIGHIERD, G., LYMBERI, P., MAZIE, J. C., ROUYRE, S., BUTLER-BROWNE, G., WHALEN, R.G. & AVRAMEAS, S. Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. **J. Immunol.**, v.131, p.2267-72, 1983.

DITTEBRANDT, M. Aplication of the weichselbawn biureto reaction to the determination of protein. **Amer.Clin. Path.**, v.18, p.439, 1948.

D'IMPERIO LIMA, M. R., JOSKOWICZ, M., COUTINHO, A., KIPNIS, T. & ELSEN, H. Very large and isotypically atypical policlonal plaque-forming cell responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. **Eur. J. Immunol.**, v.15, p.201-3, 1985.

DZIARSKI, R. Preferential induction of autoantibody secretion in polyclonal activation by peptidoglycan and lipopolyssaccharide.II. In vivo studies. **J . Immunol.**, v.128, p.1026-30, 1982.

DZIARSKI, R. Autoimmunity polyclonal activation or antigen induction? **Immunol. Today**, v.9, p.340-2, 1988.

DUBÓIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F.Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal.Chem.**, v.28, p.350-6, 1956.

EDEN, W. V. Possible role of bacterial heat-shock proteins in autoimmune Diseases. **Zbl. Bakt.,** v.278, p.377-82, 1993.

EHRENSTEIN, M. & ISEMBERG, D. Autoimmunity associated with infection: leprosy acute rheumatic fever and Lyme disease. **Curr. Opinion Immunol.**, v.3, p.930-33, 1991.

FALCÃO , D. P. , SHIMIZU, M. T. & TRABULSI, L. R., Kinects of infection induced by *Yersinia.* **Curr. Microbiol**, v.11, p.303.8, 1984.

FRIEDMAN, S. M., POSNETT, D. N., TUMANG, J. R. A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune Disease. **Arthritis and Rheumatism**, v.34, p.468-80, 1991.

GAEDE, K., MACK, D. & HEESEMANN, J. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rats : analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-

susceptible Lewis rats and arthritis.resistent Fisher rats. **Med. Microbilo. Immunol.**, v.181, p.165-72, 1992.

GALANOS, C., FREUDENBERG, M. A, LUDERITZ, O., RIETSCHEL, L. T. & WESTPHAL, O. Chemical, physicochimical and biological properties of bacterial lipopolissacharides. **Prog. clin. Biol. Res.**, v.29, p.322-32, 1979.

GOLDBERG, S. S. , CORDEIRO, M. N. , PEREIRA, A. A. S., MARES-GUIA, M. L. Release of Lipopolysaccharide (LPS) from cell surface of **Trypanosoma cruzi** by EDTA. **Int. J. Paras.**, v.13, p.11-18, 1983.

GEMSKI, P., LAZERE, J. R. & CASEV, T. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica.* **Infect. Immun.**, v. 27, p. 682-5, 1980

GRANFORS, K. Do bacterial antigens cause reactive arthrites- **Rheum. Des. clin**. North Am.,v.18,p. 37 - 48, 1979.

GRANFORS ,K. Measurement of immunoglobulin (IgM), IgG and IgA antibodies against *Yersinia .enterocolitica* .by enzyme - linked immunosorbent assay: persistence of serum antibodies during disease . **J. clin. microbiol**., v.9, p.336-41, 1979.

GRANFORS, K., VILJANEN, M. K., TIILIKAINEN, A. & TOIVANEN, A. Persistence of IgM, IgG and IgA antibodies to *Yersinia* in *Yersinia* arthrits. **J. Infect. Dis**., v.141, p.424-9, 1980.

GRANFORS, K. & TOIVANEN, A. IgA anti-*Yersinia* antibodies in *Yersinia* triggered reactive arthrites. **Ann. Rheum. Dis**., v.45, p.561-5, 1986.

GRANFORS, K., LAHESMAA-RANTALA, R. & TOIVANEN, A. IgM, IgG and IgA antibodies in *Yersinia* infection. **J. Infect. Dis.**, v.157, p.601-2, 1988.

GRANFORS, K., LAHESMAA-RANTALA, R., STAHLBERG, T. H. & TOIVANEN, A. Comparison of bacteria with and without plasmid-encoded proteins as antigens for

measurement of immunoglobulin M, G, and A antibodies to *Yersinia enterocolitica* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journ. Microbiol.**, v.27, p. 583-85, 1989.

GRIPENBERG-LERCHE, & TOIVANEN, P. *Yersinia* associated arthritis in SHR rats: effect of the microbiol status of the host. **Ann. Rheum. Dis.**, v.52, p.223-8, 1993.

GRIPENBERG-LERCHE, C., SKURNIK, M., TOIVANEN, P. Role of YadA in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 : Experimental studies with Rats. **Infect. Immun.** , v.62, p.5568-75, 1994.

HAKANSSON, S. BERGMAN, T., VANOOTEGHEM, J. C., CORNELIS, G., WOLF-WATZ, H. YopB e YopD constitutive a novel class of *Yersinia* Yop Proteins. **Infect Immun.**, v.61, p.71-80, 1993.

HITCHOCK, P. J, L.EIVE, L, MAKELA, P. H., RIETSCHEL, E. T., STRITTMATTER, W. & MORRISON, D. C. Lipopolyssacharide nomenclature - Past, present and future. **J. Bacteriol.**, v.166, p.699-705, 1986.

HILL, J.L. & YU, D.T.Y. Development of an experimental animal model for reactive arthritis induced by *Yersinia enterocolitica* infection. **Infect.Immun.** v.55, p.721-6, 1987.

HILL, J. L. & YU, D. T. Y. Development of an experimental animal model for reactive arthritis induced by *Yersinia enterocolitica* infection. **Infect. Immun.**, v.22, p.1935, 1992.

HEESEMANN, J., EGGERS, C. & SCHRODER, J. Serological diagnosis of Yersinioses by Immunoblot technique using virulence associated antigen of enteropathogenic. **Contr. Microbiol. Immunol.**, v.9, p.285-9, 1987.

HEESEMANN, J., GROSS, V., SCHMIDT, N., LAUFS, R. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. Grow in calcium deficient media. **Infect. Immun.**, v.54, p.561-67, 1990.

HEESEMANN, J., GAEDE, K. & AUTENRIETH, I. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T cell deficient athymic C57/BL6 nude mice : Comparison of time course, histomorphology and immune response. **Infect. Immun.**, 1993.

HEESEMANN,J., GAEDE, K., AUTENRIETH, I. B. Experimental *Yersinia enterocolitica* infections in rodents: A model for human yersinioses. **APMIS**, v.101, p.417-29, 1993

HERMANN, E. T cells in reactive arthritis, **APMIS**, v.101, p.177-86, 1993.

IZUI, S., KOBAYAKAWA, T., ZRYD, M. D., LOUIS, J. & LAMBERT, P. H. Mechanism for induction of anti-DNA antibodies by bacterial lipopolysaccharides in mice. II. Correlation between anti-DNA induction and polyclonal antibody formation by various polyclonal B lymphocyte activators. **J. Immunol.** v.122, p.2157-62, 1977.

IZUI, S., LAMBERT, P. H., FOURNIÉ, G. J., TURLER, H. & mIESCHER, P. A. Features of systemic lupus erythematosus in mice injected with bacterial lipopolysaccharides. Indentification of circulating DNA and renal localization of DNA-anti-DNA complexes. **J. Exp. Med.** v. 145, p.1115-30,1977.

IZUI, S., EISENBERG, R.A. & DIXON, F.J. IgM rheumatoid factors in mice injected with bacterial lipopolysacharides. **J. Immun.**, v.122, p.2096-102, 1979.

IZUI, S. , KOBAYAKAWA, T., ZRYD, M. D., LOUIS, J. & LAMBERT, P. H. Mechanism for induction of anti-DNA antibodies by bacterial lipopolysacharides in mice II. Correlation between anti-DNA induction and polyclonal antibody formation by various polyclonal B lymphocyte activators. **J. Immunol.**, v.122, p.096-102, 1979.

IZUI, S., KOBAYAKAWA, T., LOUIS, J. & LAMBERT, P. H. Induction of thymocytotoxic autoantibodies after injection of bacterial lipopolysaccharide in mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 9, p.338-41, 1979.

JANEWAY, C. A. JR. Varieties of idiotype specific helper T cells:a commentary. **J. moll. Cell. Immunol.**, v.2, p.256-66, 1986.

JERNE, N. K. & NORDIN A. A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells **Science,** v.140, 1963.

JERNE, N. K. , HENRY, C., NORDIN, A. A., FUJI, H., KOROS, A. M. C. & LEFKOVITZ, I. Plaque forming cells: methodology and theory. **Transplant. Rev.** , v. 18, p.130, 1974.

JERNE, N. K.Towards a network theory of the immune system. **Ann. Immunol.**, v.125, p. 373-89, 1974.

KAPPERUD, G., SKARPEID, H. J., SOLBERG, R. & BERGAN, T. Outer menbrane proteins and plasmids in different *Yersinia enterocolitica* sorogroups isolated from mam and animals. **Acta Path Microbiol. Immunol. Scand** [B],v.93, p.27-35, 1985.

KAPPERUD, G.,NAMORK, E. & SKARPEID, H. J. Temperature inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Y. e.*and *Y. Pseudotuberculosis*. **Infect Immun.** v.47, p.561-6, 1985.

KONO, D. H., OGASAWARA, M. & YU, D. T. Y. An animal model to study serum immunoglobulin response to infection by *Yersinia enterocolitica.* **Clin. Exp. Rhematol.,** v.3, p.117-21, 1985.

KUNKEL, H. G. Individual antigenic specificity and diversity of human antibodies .**Fed. Proc**, v.29, p.55-60, 1970.

LACHICA, R. V., ZINK, D. L. Plasmid associated cell surface charge and hydrofobicity of *Yersinia enterocolitica.* **Infect. Immun**. v.44, p.540-3, 1984.

LAHESMAA, R., SHANAFELT, M. C., STEINMAN, L., PELTZ, G. Immunopathogeneses of human inflammatory arthritis lessons from Lyme and reactive arthritis. **J. Infect. Dis.**, v. 170, p.178-85, 1994.

LAHESMAA, R., SKURNIK, M. & TOVANEN, P. Molecular mimicry: any role in the pathogenesis of spondyloarthropathies? **Immunol. Res.**, v.12, p.193-208, 1993.

LAITINEN, O. LEIRISALD, M., SKYLU, G. Relation between HLA-B27 and clinical features in pacients with *Yersinia* arthrites. **Arthritis rheum**. v. 20, p. 1121-4, 1977.

LARSEN, J.H.The spectrum of clinical manifestations infections with *Yersinia enterocolitica* and their pathogenesis. **Control. Microbiol. Immunol**. v.5, p.257, 1979.

LEIRISALO, M., SKYLV, G., KOUSA, M., VOIPIOPULKKI, L. M., SUORANTA, H., NISSLA, M., HVIDMAN, L., NIELSEN, E. D., SUEJGAARD, A.,TIILIKAINEN, A. & LAITINEN, O. Followup study on patients with Reiters disease and reactive arthrites, with special reference to HLA-B27. **Arthrites Rheum.**, v.25, p.249-59, 1982.

LOPES, L. M., PEREIRA, M. A. C., GERKEN, S. E. & VAZ, N. Polyclonal activation of B lymphocytes during experimental infection with *Shistosoma mansoni*. **Parasitology**, v.100, p.83-91, 1990.

LIMA, A. O .& SILVA, W. D. **Imunologia, Imunopatologia e Alergia: métodos**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.537, 1970.

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

LYMBER, P. & BARBOUCHE,R. Assay for autoantibodies. **Current Opinion in Immunol.**, v.2, p.917-22, 1990.

MAIR, N. S. & FOX, E. Yersiniosis lab. diagnosis clinical features. Epidemiology. London , Public **Health Laboratory Service** , p.1, 28, 31-2, 1986.

MAKI-IKOLA, O.,HEESEMANN, J., LAHESMAA, R., TOIVANEN, A. & GRANFORS, K. Combined use of released proteins and lipopolysaccharide in enzyme-linked immunosorbent assay for serologic screening of *Yersinia* infections. **J. Infect. Dis.**, v.163, p.409-12, 1991.

MAKI-IKOLA, O. LAHESMAA, R. HEESEMANN, J., MERILAHTT-PALO, R., SARIO, R., TOIVANEN, A., GRANFORS, K. *Yersinia*-specific antibodies in serum and synovial fluid in patients with *Yersinia* triggered reactive arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.53, p. 535-9, 1994.

MEDEIROS, B. M. M., SHIMIZU, M. T., FALCÃO, D. P. Período de infectividade de animais inoculados experimentalmente com *Yersinia* sp. **Rev. Saúde Publ.** v.21, p.261-4, 1987.

MEDEIROS, B. M. M. de & FALCÃO , D. P. Estudo da cinética de produção de anticorpos aglutinantes em camundongos infectados experimentalmente com *Yersinia sp.* **Rev. Ciênc. Farm.**, v.7, p. 151-6, 1985.

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

MEDEIROS, B. M. M. Ativação Policlonal de Células B em Camundongos Infectados com *Yersinia enterocolitica* O:3, São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1994. 127 p.,Tese de Doutorado. Microbilogia e Imunologia E. P. M.

MERILAHTI-PALO, R. GRIPEMBERG-LERCHE, C., SODERSTROM, K. O., TOIVANEN, P. Long-term follow-up of SHR rats with experimental *Yersinia* associated arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.51, p.91-6, 1992.

MILLET, I., LAFONT, S., FRAISSINETTE, A., JEANNIN, M., REVILLARD, J. P., NORMIER, G. & DUSSOURD, L. Polyclonal activation of murine B cells by a membrane proteoglycan of *Klebsiella pneumoniae*. **Clin. Exp. Immunol.**,v.70, p.201-8, 1987.

MISHELL, B. B. & SHIIGI, S. M. (eds) **Selected Methods in Cellular Immunology**. New york, W. H. Freeman and company, 1980. p.16.

NAUMANN, M. , HANSKI, C. & GRUTZKAU, A. Immunological analysis of the plasmid-encoded proteins from the highly pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8 and the less pathogenic serogroup O:3 **J. Med. Microbiol.** , v.38, p.118-121, 1993.

NICKERSON, C. L. HOGEN, K. L. LUTHRA, H.S. & DAVID, C.S. Effect of H-2 genes on expression of HLA-b27 and *Yersinia* induced arthritis **. Scand J. Rheumatolol.**, Suppl. v.87, p.85-90, 1990.

NICOLE, P., MOLLARET, H. H., BRAULT, J. Noveaux resultats sur la lysotype de *Yersinia enterocolitica* portant sur plus de 4000 souches d'origines diverses. **Rev. Epidem. Sonté Publ.,** v.24, p. 479-96, 1976.

OLDSTONE, M. B. A. Molecular mimicry and autoimmune disease. **Cell.**, v.50. p.819-20, 1987.

OUDIN, M. J. & MICHEL, M. Une nouvelle forme d'allotypie desglobulines Y du serum de lapin apparemmement lue à la fonction et à la specificite anticorps. CRC **Acad. Sci. Paris,** v.257, p.805-12, 1963.

PORTNOY, D. P. MOSELEY, S. L. & FALKOW, S. Characterization of plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica*.pathogenesis. **Infect. Immun**. v.31, p.775-82, 1981.

PRPIC, J. K. ROBBINS-BROWNE, R. M. & DAVEY, R. B. Differentation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using Congo red agar. **J. Clin. Microbiol.** v.18, p.486-90, 1983.

PROBST, P. Identification of the Yersinia enterocolitica Urease b subunit as a target antigen for Human Synovial T Lymphocytes in Reactive Arthritis. **Infect. Immun.** ,v.61, p.4507-09, 1993.

RICCIARDI, I. D., PEARSON, A. D., SUCKLING, W. G. & KLEIN, C. Long term fecal excretion and resistence induced im mice infected with *Yersinia enterocolitica.* **Infect. Immun.,** v.21, p. 342-4, 1978.

ROBINS-BROWNE, R. M. & PRPIC, J. K. Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica.* **Infect Immun**. v.47, p. 774-9, 1985.

SCOTT, B. B., BARCLAY, G. R., SMITH, D. G. E. IgG antibodies to Gram-negative endotoxin in human sera Lipopolysaccharide (LPS) cross-reactivity due to antibodies to LPS core Serodiagn. Immunother. **Infect. Dis**., v.4, p.25-38, 1990.

SHENEP, J. L.GIGLIOTTI, F., DAVIS, D. S. & HILDNER, W. K. Reactivity of antibodies to core glycolipid with Gram-negative bacteria. **Rev. Infect. Dis**. v.9, p.639-43, 1987.

STELLRECHT, K.A. & VELLA, A. T. Evidence for polyclonal B cell activation as the mechanism for LCMV-induced auto-imune hemolityc anemia.Immunol . **Letters**, v.31, p.273-8, 1992.

STUART, P. M. & WOODWARD, J. G. *Yersinia enterocolitica* produces superantigenic activity. **J. Immunol.**, v.148, p.225-33, 1992.

TITE, J. P. , KAYE, J., SAIZAWA, K. M., MING, J., KATZ, M. E., SMITH, L. A. & JANEWAY, C. A. JR. Direct interations between B and T lymphocytes bearing complemmentary receptors. **J. Exp. Med.**, v.163, p. 189-200, 1986.

TOIVANEN, A., MERILAHTI-PALO, R., GRIPENBERG, C., LAHESMAA-RANTALA, R., SODERSTROM, K. O., JAAKKOLA, U. M. *Yersinia* associated arthritis in the rat: experimental model for human reactive arthritis? **Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect.,** v.94, p.261-9, 1986.

TOIVANEN, A. & TOIVANEN, P. Pathogeneses of reactive arthritis. In: TOIVANEN, A. & TOIVANEN, P. **Reactive arthritis**. Boca Raton, CRC Press, p.167-78, 1988.

TOIVANEN, A. Infection and arthritis. **Annals of Medicine**, v.26, p.245-8, 1994.

TOYOS, J. R. de LOS, VAZQUEZ, J., SAMPEDRO, A., HARDISSON, C. *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is arthritogenic for mice. **Microbiol. Pathogenesis,** v.8, p.363-70, 1990.

TOYOS, J. R. De LOS, MENENDEZ, P. SAMPEDRO, A. & HARDISSON, C. *Yersinia enterocolitica* serotype O:3-induced arthritis in mice: Microbiological and histopathological information. **APMIS**, v.100, p.455-64, 1992.

VAZ, N. M. Tolerancia e insensibilidade em imunologia.**Ciênc. Cult.,** v.32, p.21-3, 1980.

VAZ, N. M. Reconhecer a si próprio-idéias para uma nova imunologia - **Ciênc. Cult.**, v.2, p.32-8,1983.

VAZ, N. M. Ordem e desordem: uma abordagem imunologica. **Ciênc.Cult.**, v.40, p.452-9,1988.

VAZ, N. M. & FARIA, A. M. C. The construction of immunological identity. **Ciênc.Cult.**, v.42, p.429-43, 1990.

WUORELA, M., JALKANEN, S.,TOIVANEN, P., GRANFORS, K. *Yersinia* lipopolysaccharide is modified by human monocytes. **Infect. Imm.**, v.61, p.5261-70, 1993.