



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE



PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - SBFIS

DENISAR PALMITO DOS SANTOS

**CAMUNDONGOS C57BI/6 E A/j APRESENTAM RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DIFERENCIADA APÓS A IMUNIZAÇÃO
COM *Staphylococcus aureus* E DESAFIO EM MODELO DE
BOLSÃO DE AR**

VITÓRIA DA CONQUISTA, BA

2015

DENISAR PALMITO DOS SANTOS

**CAMUNDONGOS C57BI/6 E A/j APRESENTAM RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DIFERENCIADA APÓS A IMUNIZAÇÃO
COM *Staphylococcus aureus* E DESAFIO EM MODELO DE
BOLSÃO DE AR**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva

Vitória da Conquista, BA

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Palmito, Denisar dos Santos - Camundongos C57Bl/6 e A/j apresentam resposta inflamatória diferenciada após a imunização com *Staphylococcus aureus* e desafio em modelo de bolsão de ar / Denisar Palmito dos Santos – 2015.

Orientador: Profº. Drº. Robson Amaro Augusto da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.

1. Inflamação – Imunização- *Staphylococcus aureus*.2. Bolsão inflamatório. I. Universidade Federal da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.II.Título.

CDU –

Denisar Palmito dos Santos

**CAMUNDONGOS C57BI/6 E A/j APRESENTAM RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DIFERENCIADA APÓS A IMUNIZAÇÃO
COM *Staphylococcus aureus* E DESAFIO EM MODELO DE
BOLSÃO DE AR**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 10 de Junho de 2015.

Prof^o. Dr^a Iara Apolinario Borges

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^o. Dr^o. Ricardo Evangelista Fraga

Universidade Federal da Bahia

Prof^o. Dr^o. Robson Amaro Augusto da Silva

Universidade Federal da Bahia

À Deus, por sempre iluminar meus caminhos
Aos meus pais Antenor e Dina, pelo imenso amor, força e carinho
À minha querida irmã Denize, pelo amor e exemplo de pessoa

Aos animais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar meus caminhos, guiando-me aos melhores caminhos que eu deveria percorrer;

Aos meus pais Antenor e Dina pelo imenso amor, proteção, força e carinho;

À minha querida irmã Denize, pelo amor e exemplo de pessoa;

Aos animais que utilizei nesta pesquisa, mesmo sem a opção da escolha, com muito pesar utilizei-os, mas para um bem maior;

Ao Professor Dr. Robson Amaro Augusto da Silva, por ter me dado a oportunidade de fazer o mestrado sob sua orientação. Sendo sempre um exemplo de profissional, jamais faltando com a palavra e honrando sempre os compromissos. Na realização desta pós eu aprendi muito e quero muito ser um profissional a altura do meu orientador, tenho orgulho de ter sido orientado por Robson;

A toda equipe do projeto de Pesquisa UreaSchis, Annie, Fernanda, Igor, Israel, Ítalo, Karine, Larissa, Leonardo, Marcos Paulo, Maria Poliana, Ivanéia, Palloma, Patrícia, Petrônio e Vida, por terem me ajudado neste trabalho, jamais faria sozinho, agradeço a cada um de vocês;

À Jessica Barreto por me apoiar nos momentos bons e ruins, sempre aguentando minhas variações de humor com a reta final desta pós. Você chegou no momento certo;

À Professora Dr^a Tiana Baqueiro, por me auxiliar em todos os momentos que eu a procurei, estando sempre à disposição para ajudar;

Ao Professor Dr. Mateus Freire Leite pelo exemplo de profissional, jamais esquecerei o exemplo de professor que eu tive em sala de aula e se estou na pós graduação hoje é graças ao empenho deste profissional que fará muita falta a UFBA/IMS-CAT;

Ao professor Dr. Juliano Amaral por não permitir que eu abrisse mão do mestrado no momento de fraqueza e sobretudo por sempre nos dar apoio e estimular a continuar no caminho da pesquisa;

À Professora Dr^a Telma de Jesus Soares pela competência, empenho e dedicação, contribuindo de forma sólida para o mestrado em fisiologia ser implementado na nossa instituição;

Ao Dr Lucas Miranda Marques por sempre estar disposto a nos ajudar;

À Banca, representada pelo Dr Ricardo Fraga e Dr^a Iara Borges, por aceitar meu convite e contribuir para a melhora do meu trabalho;

Aos meus amigos Geysa, Ricardo, Almir Junior, Ana Carolina, Jorgeanny e Mússio pelo companheirismo e pelos anos de amizade;

À técnica do laboratório de Histologia, Lucimara Pereira, pelo auxílio na realização de alguns experimentos;

Ao programa de pós-graduação em Biociências e a todos os colegas que nele participam, pelas brincadeiras e palavras de apoio;

Ao programa multicêntrico de pós-graduação em ciências fisiológicas, bem como todos os alunos do programa que são dedicados e elevam o nome da nossa pós e da UFBA/IMS-CAT;

À CAPES, pela concessão de bolsa e pelo auxílio financeiro para o projeto que possibilitou realização deste trabalho.

“Eu vejo o horizonte trêmulo,
eu tenho os olhos úmidos
Eu posso estar completamente enganado
Posso estar correndo pro lado errado
Mas a dúvida é o preço da pureza
e é inútil ter certeza”

(Humberto Gessinger)

RESUMO

PALMITO, Denisar dos Santos. Camundongos C57Bl/6 e A/j apresentam resposta inflamatória diferenciada após a imunização com *Staphylococcus aureus* e desafio em modelo de bolsão de ar. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

Introdução/Objetivo: *Staphylococcus aureus* é o principal agente etiológico de infecções bacterianas em humanos, sendo relatado como o agente causador de patologias como endocardite e sepse. O presente trabalho teve por objetivo avaliar quais os possíveis componentes do sistema imune poderiam atuar de maneira protetora contra a infecção por *S. aureus* em camundongos imunizados intradermicamente. **Materiais e métodos:** Camundongos C57Bl/6 e A/j foram imunizados intradermicamente com amostras de *S. aureus* inativadas por calor e, posteriormente, foram desafiados com amostras viáveis em um modelo de bolsão de ar. Nos tempos de 6, 12 e 24 horas após o desafio, a eutanásia ocorreu e o perfil celular do infiltrado inflamatório, bem como a carga bacteriana, foram avaliados no lavado do bolsão de ar. No soro e no lavado foram quantificados anticorpos da classe IgG e a pele do bolsão foi avaliada por técnicas histopatológicas. Pela técnica de ELISA foram quantificadas citocinas presentes no lavado do bolsão, baço e medula. **Resultados:** Animais imunizados e desafiados com amostras resistentes no modelo de bolsão apresentaram recrutamento celular inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos. Além disso, foi observada uma associação entre uma produção de anticorpos IgG e a redução da carga bacteriana em um modelo murino de imunização intradérmica. Ademais, animais imunizados apresentaram menor inflamação no sítio de infecção e uma maior produção local de IL-17A. Em relação as outras citocinas, não foram encontradas diferenças nos tecidos analisados. **Discussão:** *S. aureus* é capaz de induzir uma resposta sistêmica, assim como, recrutar células inflamatórias para o sítio de infecção. Porém, animais imunizados tendem a controlar melhor o processo inflamatório, aparentemente por uma correlação entre a produção de anticorpos IgG e a redução da carga bacteriana em um modelo murino de imunização intradérmica. A menor carga bacteriana nos animais imunizados se correlacionou,

também, com uma menor inflamação no sítio de infecção e uma maior produção local de IL-17A. **Conclusão:** A presença de anticorpos IgG2a se correlaciona com diminuição da carga bacteriana em animais imunizados intradermicamente com *S. aureus*, juntamente com a elevação de IL-17A no modelo de bolsão de ar.

Palavras-chave: Imunização; *Staphylococcus aureus*; Bolsão de ar; Anticorpos; IL-17A.

ABSTRACT

PALMITO, Denisar dos Santos. C57Bl/6 and A/j mice presente diferente inflammatory response patterns after immunization with *Staphylococcus aureus* and challenge in air pouch model. Master Dissertation - Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

Introduction / Objective: *Staphylococcus aureus* is the major etiological agent of bacterial infections in humans and is reported as the causative agent of diseases such as sepsis and endocarditis. This study aimed to evaluate which components of the immune system could act protectively against *S. aureus* infection in mice immunized intradermally. **Methods:** C57Bl/6 and A/j mice were immunized intradermally with *S. aureus* strains inactivated by heat and then were challenged with viable strains in an air pouch model. At the times of 6, 12 and 24 hours after challenge, the euthanasia was performed and the cellular profile of the inflammatory infiltrate as well as the bacterial load were evaluated in the air pouch lavages. Serum and lavages of air pouch were quantified for IgG antibodies and the skin was evaluated by histopathological techniques. Cytokines present in air pouch, spleen and bone marrow were quantified by ELISA. **Results:** Animals immunized and challenged with strains resistant to the air pouch model presented an inflammatory cell recruitment constituted predominantly by neutrophils. Furthermore, it was observed an association between the production of IgG antibodies and reduced the bacterial load in our model of intradermal immunization. In addition, immunized animals showed lower inflammation at the site of infection and increased local production of IL-17A. Regarding the other cytokines, no differences were found in the tissues. **Discussion:** *S. aureus* is able to induce a systemic response as well as recruiting inflammatory cells into the infection site. Immunized animals showed a higher control the inflammatory process correlated with the production of IgG antibodies and a reduced bacterial burden in the inflammatory site. The lower bacterial load in animals immunized correlated also with lower inflammation in the site of infection and increased local production of IL-17A. **Conclusion:** The presence of IgG2a antibodies correlates with a decreased bacterial load in animals immunized intradermally with *S. aureus* along with the elevation of IL-17A

Keywords: Immunization; *Staphylococcus aureus*; Air pouch; Antibodies; IL-17A.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs	Peptídeos antimicrobianos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CA-MRSA	<i>Community-Acquired Methicilin resistant S. aureus</i>
CAT	<i>Campus Anísio Teixeira</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPEC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GCP2	Proteína quimiotática 2 de granulócitos
HA-MRSA	<i>Hospital-Acquired Methicilin resistant Staphylococcus aureus</i>
<i>HK</i>	<i>Heat Killed</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgA	Imunoglobulina A
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL- 8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17

IL-17A	Interleucina 17A
IMS	Instituto Multidisciplinar em Saúde
INF- γ	Interferon gama
INSPEAR	<i>International Network Study Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance</i>
Kg	quilogramas
MAC	Complexo de ataque a membrana
MHC II	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
μ l	Microlitros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MRSA	<i>Methicilin resistant Staphylococcus aureus</i>
n	Número
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
PBS	Salina tamponada com fosfatos
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
PMN	Polimorfonucleares
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Th1</i>	<i>T helper 1</i>
<i>Th2</i>	<i>T helper 2</i>
<i>Th17</i>	<i>T helper 17</i>
TLR2	<i>Tooll Like Receptor tipo 2</i>

TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
U	Unidades
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
μ L	Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
=	igual
°C	graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de publicações anuais relacionadas ao desenvolvimento de imunizações contra infecções por *Staphylococcus aureus*. A figura é baseada na busca realizada no Pubmed, utilizando-se o termo "*immunization Staphylococcus aureus*".....6
- Figura 2: Desenho experimental** - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras de MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas, para posterior análise.....14
- Figura 3: Contagem total de leucócitos no sangue periférico ($\times 10^5/\text{ml}$)** - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o sangue coletado e quantificado quanto ao número total de leucócitos presentes utilizando câmara de Neubauer (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).....19
- Figura 4: Contagem diferencial de Neutrófilos no sangue periférico ($\times 10^5/\text{ml}$)** - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de amostrass de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Amostras de sangue foram coletadas, esfregaços sanguíneos confeccionados e a contagem diferencial de neutrófilos realizada por microscopia utilizando a câmara de Neubauer (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).....20
- Figura 5: Contagem diferencial de Monócitos e Linfócitos no sangue periférico ($\times 10^5/\text{ml}$)** - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA)

inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Amostras de sangue foram coletadas, esfregaços sanguíneos confeccionados e a contagem diferencial de neutrófilos realizada por microscopia utilizando a câmara de Neubauer (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed); (*p<0,05).....21

Figura 6: Lâminas representativas do recrutamento leucocitário na derme do bolsão inflamatório – Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram a pele do bolsão coletada e confeccionadas lâminas histopatológicas que foram analisadas por microscopia de luz (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; H/K = Heat Killed).....22

Figura 7: Recrutamento leucocitário na derme do bolsão inflamatório (/mm²) – Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram a pele do bolsão coletada e confeccionadas lâminas histopatológicas que foram analisadas por microscopia de luz (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed); (*p<0,05).....23

Figura 8: Contagem diferencial do recrutamento leucocitário na derme do bolsão inflamatório – Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram a pele do bolsão coletada e confeccionadas lâminas histopatológicas que foram analisadas por microscopia de luz quanto a contagem

total diferencial de polimorfonucleares (A) e mononucleares (B) (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed);(*p<0,05).....24

Figura 9: Contagem total de leucócitos no lavado do bolsão (x10⁵/ml) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e quantificado quanto ao número total de leucócitos presentes pela câmara de Neubauer (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed);(*p<0,05).....25

Figura 10: Infiltrado leucocitário no bolsão de ar - Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado, centrifugado e as células foram concentradas pela técnica do citospin e avaliado por microscopia de luz. Imagem representativa dos diferentes grupos avaliados (A=Animais desafiados com salina; B=Animais desafiados com *S. aureus*).....26

Figura 11: Contagem diferencial de Neutrófilos no lavado do bolsão (x10⁵/ml) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e pela técnica do citospin as células foram concentradas em lâminas e a contagem diferencial de neutrófilos realizada por microscopia (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed) ;(*p<0,05).....27

Figura 12: Contagem diferencial de Macrófagos e Linfócitos no lavado do bolsão (x10⁵/ml) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e pela técnica do citospin as células foram concentradas em lâminas e a contagem diferencial de macrófagos e linfócitos realizada por microscopia de luz (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed);(*p<0,05).....28

Figura 13: Representação das culturas de *Staphylococcus aureus* presentes no lavado do bolsão de ar - Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e foram cultivados em meio BHI (*brain heart infusion*). As UFCs foram quantificadas após 24 horas de cultivo (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed).....29

Figura 14: Carga bacteriana de *Staphylococcus aureus* no bolsão de ar (UFC x 10⁵ /ml) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e foram cultivados em meio BHI (*brain heart infusion*). As UFCs foram quantificadas após 24 horas de cultivo (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed);(*p<0,05).....30

Figura 15: Concentrações séricas de anticorpos IgG2a (Densidade Óptica) - Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10⁶ de amostras de

Staphylococcus aureus resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o sangue coletado para a obtenção do soro. Posteriormente, as concentrações séricas de IgG2a foram determinadas pela técnica de ELISA (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).....32

Figura 16: Concentrações de anticorpos IgG1 no lavado (Densidade Óptica) - Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado. Posteriormente, as concentrações no lavado de IgG1 foram determinadas pela técnica de ELISA (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).....33

Figura 17: Quantificação de IL-17A no ambiente inflamatório (pg/ml) – Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e avaliado pela técnica de ELISA quanto a presença de IL-17A (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*); (*p<0,05).....34

Figura 18: Quantificação de IL-1 β e TNF- α presentes no ambiente inflamatório (pg/ml)– Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão, baço e medula coletados e avaliados pela técnica de ELISA quanto a presença das citocinas IL-1 β e TNF- α

(n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed);(*p<0,05).....35

Figura 19: Quantificação de citocinas em diferentes sítios corpóreos no camundongo C57Bl/6 (pg/ml) – Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão, baço e medula coletados e avaliados pela técnica de ELISA quanto a presença das citocinas IFN- γ e IL-4 (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = Heat Killed);(*p<0,05).....36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	2
2.2. Infecções por <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.3. Resposta inflamatória contra <i>Staphylococcus aureus</i> e medidas imunoproláticas	4
2.4. Rotas de imunizações e Modelos animais	8
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivos específicos	11
4. MATERIAIS E MÉTODO	12
4.1. Obtenção das amostras de MRSA	12
4.2. Determinação da carga bacteriana e inativação por fervura	12
4.3. Animais	13
4.4. Imunização intradérmica com amostras inativadas de MRSA - Formação dos grupos	13
4.5. Imunização	13
4.6. Formação de novos grupos para o desafio	13
4.7. Desafio no modelo de bolsão inflamatório	14
4.8. Obtenções de espécimes clínicos	15
4.9. Quantificação de citocinas inflamatórias no baço e medula	15
4.10. Obtenção de células do sítio inflamatório	16
4.11. Determinação da carga bacterina	16
4.12. Quantificação de citocinas inflamatórias no lavado do bolsão	16
4.13. Quantificação de IgG1 e IgG2a no soro e no lavado do bolsão	17
4.14. Obtenção de amostras da pele e exsudato inflamatório	18
4.15. Análises estatísticas	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Desafio com <i>S. aureus</i> não causa leucocitose no sangue periférico	19
5.2. Animais imunizados apresentam neutrofilia no sangue periférico	20
5.3. Animais imunizados intrademicamente apresentam uma menor inflamação no sítio do desafio	22
5.4. Animais imunizados apresentam um menor recrutamento celular no sítio inflamatório	24

5.5.	Animais C57Bl/6 imunizados apresentam maior depuração bacteriana no bolsão	29
5.6.	A imunização induz elevação de anticorpos IgG2a no soro dos animais C57Bl/6	31
5.7.	Animais C57Bl/6 imunizados produzem IL-17A no sítio inflamatório após o desafio	34
5.8.	Animais imunizados e desafiados com <i>S. aureus</i> não apresentam alterações nas citocinas analisadas no lavado no bolsão de ar, medula e baço	35
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÃO	47
8.	REFERÊNCIAS	48
9.	ANEXO I – PARECER	62

1. INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas ocorrem em todo mundo e são um importante problema de saúde pública. Em meados do século passado, essas infecções levavam à morte um grande número de pacientes (ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010). Com a introdução dos antimicrobianos, a sobrevivência de pessoas infectadas aumentou, porém com o passar dos anos algumas amostras apresentaram resistência à principal classe de antimicrobiano utilizada: as penicilinas (WENZEL; EDMOND, 1998; GOMES; WESTH; DE LENCASTRE, 2006).

Dentre os patógenos, *Staphylococcus aureus* é o principal agente causador de doenças bacterianas no mundo. Essa bactéria leva a morte de milhões de pessoas anualmente, sobretudo por mecanismos de resistência cada vez mais aprimorados de resistência.

Os isolados de *S. aureus* que apresentam resistência à meticilina são denominados MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (LOWY, 1998). A meticilina foi o segundo antimicrobiano utilizado para tratamento das patologias causadas por este microrganismo após o surgimento da resistência a penicilina. Assim, surtos de infecções comunitárias por amostras resistentes apresentam ampla distribuição no globo terrestre e o aumento destas ressalta na necessidade de se desenvolver novas estratégias para prevenir infecções invasivas por *S. aureus* (LOWY, 1998; GELATTI et al., 2009).

Assim sendo, entender os mecanismos com os quais este patógeno causa infecções se torna importante para o desenvolvimento de maneiras profiláticas e de tratamento. Dentre essas medidas, a imunização toma grandes perspectivas mundialmente e aponta para o desenvolvimento racional de novas medidas imunoprofiláticas (ADHIKARI et al., 2012; POZZI et al., 2012).

Portanto, para desenvolver uma vacina ou imunização, é necessário, sobretudo, entender as vias de resposta imune do hospedeiro na infecção pelo patógeno. Nessa dualidade, Brad Spellberg e Robert Daum, 2012, questionaram qual deveria ser a resposta imune estimulada por uma vacina ou imunização na infecção por *S. aureus* para levar a prevenção.

Até o presente momento, está descrito que geralmente, a capacidade das bactérias de causar a doença em seres humanos é devido à evasão dos mecanismos da resposta imune inata o que inclui a resistência aos peptídeos antimicrobianos (AMPs) e morte por fagocitose (FINLAY; MCFADDEN, 2006).

Porém, ainda existem barreiras importantes que inviabilizam o desenvolvimento de uma vacina. Dentre elas, o fato desta bactéria fazer parte da microbiota humana, a grande capacidade desta bactéria em adquirir fatores de virulência e o grande número de doenças causadas por estas cepas (BESTEBROER; DE HAAS; VAN STRIJP, 2010; PROCTOR, 2012).

A dificuldade de compreender qual a resposta imune gera proteção contra a infecção por *S. aureus* é, talvez, o maior obstáculo para o desenvolvimento de uma vacinação (DELEO; DIEP; OTTO, 2009). A grande maioria do que é sabido hoje, se deu graças à utilização de modelos animais que proporcionaram o estudo e a compreensão sobre alguns mecanismos imunes envolvidos em uma imunidade protetora (PROCTOR, 2012).

Diante disto, este trabalho almejou avaliar a atuação de determinados componentes imunológicos em camundongos das linhagens C57Bl/6 e A/j imunizados com amostra de MRSA inativadas por calor e posteriormente desafiados com a mesma amostra de MRSA não inativada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus são cocos gram positivos, de tamanho variável entre 0,5 e 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não esporulados e capsulados. Podem aparecer isolados, aos pares, na forma de tétrades, cadeias curtas ou na forma de cachos irregulares (KLOOS; WOLFSHOHL, 1982). Esses patógenos são anaeróbios facultativos, com metabolismo oxidativo, fermentativos e utilizam carboidratos juntamente com aminoácidos como fonte de energia e carbono. Este coco também tem sido descrito como habitante das vias aéreas, normalmente como comensal, sendo assim, propaga-se facilmente, sendo transportado para inúmeros locais tanto ambientais, como da própria superfície do hospedeiro. Por conta desta distribuição, ele está relacionado com patologias em diversos locais do organismo, levando em alguns casos, a morte (LOWY, 1998; WERTHEIM et al., 2004; WERTHEIM et al., 2008; SPELLBERG; DAUM, 2012).

S. aureus é o principal agente etiológico de infecções bacterianas nos humanos. Ele é relatado como agente causador de patologias como endocardite,

sepsis, e diversas outras, representando um problema mundial para as instituições de saúde (FOWLER et al., 2005; CHAMBERS; DELEO, 2009). Pacientes podem ser acometidos por infecções principalmente relacionadas a unidades hospitalares, tais como: pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções pós-cirúrgicas, infecções relacionadas à inserção de cateteres endovenosos, dentre outros (JENSEN et al., 1993; FINELLI et al., 2005; AHOYO et al., 2012).

Essas infecções são facilitadas por fatores de risco, dentre eles a internação em unidade de tratamento intensivo, hospitalização prolongada, doença de base grave, procedimentos invasivos e exposição prolongada ou repetida a antimicrobianos (SPELLBERG; DAUM, 2012). Desta forma, as manifestações clínicas mais comuns de infecções nosocomiais, são as infecções da pele e tecidos moles, embora estejam também descritas infecções invasivas graves (SCHENNINGS et al., 2012).

2.2. Infecções por *Staphylococcus aureus*

Infecções por este microrganismo estão aumentando em todo o mundo, sendo que mais de 90% destas infecções ocorrem através da pele (FRIMODT-MOLLER et al., 1997; HOEN et al., 2002). Neste contexto de infecção, as barreiras físicas e, sobretudo o sistema imune do hospedeiro estarão diretamente relacionados com controle da infecção por este microrganismo. Entretanto, o *S. aureus* consegue evadir-se das defesas imunoprotetoras, devido a expressão dos fatores de virulência, como adesinas e as proteínas destinadas a neutralizar tanto componentes da imunidade inata bem como da adquirida (VELAZQUEZ-MEZA, 2005).

Ainda é relatado que pacientes geriátricos estão cada vez mais expostos a infecções por amostras ditas resistentes a antimicrobianos, tanto em hospitais quanto em comunidades (MCGARRY et al., 2004; TACCONELLI; POP-VICAS; D'AGATA, 2006). Uma vez que pacientes hospitalizados com idade mais avançada são mais propensos a ter comorbidades associadas como obesidade, diabetes *mellitus*, doença cardíaca e/ou pulmonar que necessitam de tratamento cirúrgico ou tratamento intensivo, ficando mais vulneráveis a infecções (OCHOA et al., 2005; MENNE et al., 2012; PROCTOR, 2012; WELLS et al., 2013). Contudo, também são

acometidos por infecções pacientes pediátricos e adultos, não estando relacionados apenas a pacientes geriátricos.

Além destes fatores citados, os indivíduos também podem ser imunologicamente comprometidos por configurações de saúde associadas, como infecção por HIV, pacientes com patologias renais em fase terminal e tratamento com imunossupressores (JENSEN et al., 1993). Tais condições são conhecidas por aumentarem o risco de infecção por *S. aureus* (SENTHILKUMAR; KUMAR; SHEAGREN, 2001; OCHOA et al., 2005; HIDRON et al., 2010).

Na América latina, como demonstrado por Alvarez et al, 2010, que relataram o estudo observacional realizado pela *International Network Study Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance* (INSPEAR), em 30 hospitais latino-americanos, onde foi constatado que 67% das infecções por *S. aureus* eram por amostras MRSA. Foi percebido então, que o controle de MRSA não era ideal, pois as taxas de infecção continuam a subir em muitas áreas. Além disso, a implementação de medidas de controle ainda precisa ser melhoradas (ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010).

Diante destes fatos, entender os mecanismos com os quais este patógeno causa a doença se torna importante para o desenvolvimento de maneiras profiláticas e de tratamento. Onde a vacinação como ação de saúde pública é a principal e mais eficaz medida profilática na prevenção de infecções, doenças e mortes, além de contribuir diretamente com a redução dos gastos públicos com a hospitalização (ECHANIZ-AVILES; SOLORZANO-SANTOS, 2001).

2.3. Resposta inflamatória contra *Staphylococcus aureus* e medidas imunoproláticas

Estudos envolvendo desenvolvimento de imunizações contra infecções estafilocócicas não são novos. Estes abordam que antígenos presentes na superfície bacteriana levam a proteção contra infecções em modelos animais. Entretanto, alguns destes estudos não apresentaram boa reprodutibilidade (PROJAN; NESIN; DUNMAN, 2006; SCHAFFER et al., 2006; PROCTOR, 2012; SCHENNINGS et al., 2012; SPELLBERG; DAUM, 2012).

A literatura faz referência às doenças infecciosas como sendo a terceira causa de morte no mundo, isso porque a diversidade de doenças emergentes e reemergentes, com potenciais diversos para a propagação global encontra-se em franca evolução como, por exemplo, os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (LIU, 2009; HIDRON et al., 2010; MONTGOMERY; DAVID; DAUM, 2015).

A patogenicidade causada por *S. aureus* depende da expressão de uma ampla gama de proteínas bacterianas, além de toxinas associadas e secretadas pela parede celular. Autores demonstraram que amostras resistentes apresentam uma virulência maior quando comparadas a amostras sensíveis aos antimicrobianos (INOUE et al., 2013).

Devido à alta capacidade de expressão de fatores de virulência, vários autores sugerem que o desenvolvimento de uma imunização deverá ser mais direcionado para uma determinada cepa presente em uma região do que para a espécie *S. aureus* de uma maneira geral (PROCTOR, 2012). Mesmo sendo da mesma espécie, esta bactéria apresenta diferenças quanto a expressão de fatores de virulência, uma vez que o aumento da expressão dos mesmo irá variar com o meio e a necessidade (SCHAUDER; BASSLER, 2001).

No que diz respeito ao número de comorbidades associadas, autores relatam que os pacientes com MRSA tinham significativamente mais comorbidades que pacientes infectados com a cepa sensível à meticilina. Além disso, a necessidade de submissão a cirurgia em pacientes infectados por amostras bacterianas resistentes é maior, bem como a taxa de recorrência das infecções (INOUE et al., 2013). Sendo assim, no desenvolvimento de uma imunização, o fator resistência deverá ser levado em consideração, pois como relatado, existem diferenças quanto a virulência entre as espécies sensíveis e resistentes.

Assim, frente às crescentes preocupações com os gastos econômicos na área da saúde, e do aumento das resistências aos antimicrobianos existentes, estudos para o desenvolvimento de medidas imunoproláticas vêm aumentando ao longo dos anos (Figura 1).

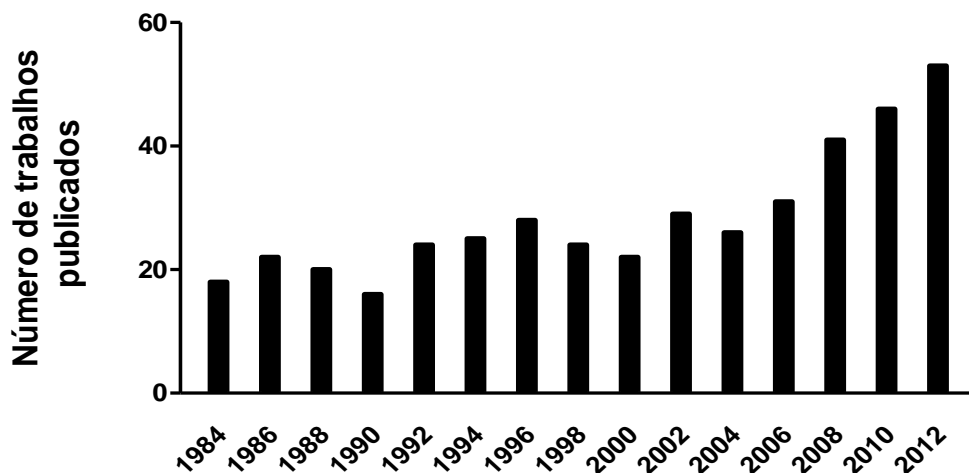


Figura 1. Número de publicações anuais relacionadas ao desenvolvimento de imunizações contra infecções por *Staphylococcus aureus*. A figura é baseada na busca realizada no Pubmed, utilizando-se o termo "*immunization Staphylococcus aureus*".

Autores apresentaram resultados promissores em seus trabalhos, porém, muitos deles relatam que a dificuldade inicial a ser superada é a falta de conhecimento integral da resposta inflamatória contra a infecção por essa bactéria gram-positiva (SPELLBERG; DAUM, 2012). Uma vez que o desenvolvimento racional de uma imunização perpassa pelo conhecimento pleno da resposta imune protetora e com isso, induzir de forma prévia esta resposta é o objetivo da imunoprofilaxia.

Além disso, sabe-se que neutrófilos constituem a principal defesa celular contra *S. aureus*, pois são capazes de liberar mediadores que vão promover a amplificação da resposta inflamatória, além da fagocitose (DELEO; DIEP; OTTO, 2009). Polimorfonucleares (PMN) ainda elaboram espécies reativas de oxigênio, liberam conteúdo dos grânulos tóxicos e redes de DNA, além da captação e eliminação do patógeno (HARRISON, C. J., 2009; NGUYEN et al., 2013).

Na infecção cutânea por *S. aureus*, a formação de abscesso é fundamental para a proteção do indivíduo, bem como o aumento e recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (CHO et al., 2012). No entanto, os mecanismos que regulam a sobrevivência de polimorfonucleares durante a evolução de um abscesso não estão bem definidos (KIM, M. H. et al., 2011). Assim como a imunidade contra *Staphylococcus* permanece obscura, necessitando de mais estudos que auxiliem neste entendimento.

Durante a infecção por *S. aureus*, neutrófilos são influenciados por fatores quimiotáticos do hospedeiro tais como a interleucina 8 (IL-8, CXCL8), CXCL1, proteína quimiotática 2 de granulócitos (GCP2, CXCL6) e fatores do sistema complemento como o C5a. Foi demonstrado experimentalmente que *S. aureus* é capaz de provocar a produção de inúmeros fatores de quimiotaxia *in vitro* e *in vivo* como, por exemplo, a interleucina 8 (STANDIFORD et al., 1994; SOELL et al., 1995; YAO; LOWY; BERMAN, 1996; DELEO; DIEP; OTTO, 2009).

Relatos na literatura demonstram que pacientes idosos apresentam diminuição na quantidade de PMN e desta forma ficam mais susceptíveis a doenças estafilocócicas invasivas na pele ou tecidos moles. A disseminação bacteriana foi associada também a reduções significativas de CXCL1, CXCL2 (MIP-2) e KC (IL-8 em camundongos) em resposta a MRSA (TSENG et al., 2012).

Estudos relacionam aspectos como neutropenia, neutrófilos afuncionais ou defeitos na quimiotaxia, com um aumento na susceptibilidade das pessoas em desenvolverem doenças provocadas por *S. aureus* (CHO et al., 2012). Este patógeno é ainda capaz de bloquear receptores de quimiocinas, como o receptor para CXCL2 no local da infecção, evitando desta forma o recrutamento de PMN (LAARMAN et al., 2012). Além disso, a fagocitose proporcionada por estas células pode ser melhorada pela opsoniação mediada por anticorpos e complemento, porém este fato não está bem esclarecido (HARRISON, C. J., 2009; NARITA et al., 2010). Contudo, observando este dado, uma sensibilização prévia a infecção por essas bactérias, com a geração anticorpos opsonizadores, pode contribuir para uma resposta mais eficaz via PMN, sendo que neutrófilos podem ser a chave para o desenvolvimento de uma imunização contra este patógeno (HARRISON, C. J., 2009).

No contexto da fagocitose, macrófagos desempenham um papel chave na regulação de respostas imunes protetoras, orientando as respostas imunes inata e adaptativa (CHAWLA; NGUYEN; GOH, 2011; SHI; PAMER, 2011). Em estágios iniciais de invasão microbiana ou de injúrias teciduais, macrófagos defendem a homeostase local iniciando uma complexa série de eventos celulares e bioquímicos. Esses ajustes patofisiológicos são mediados por uma extensa variedade de moléculas comunicantes, eicosanóides, intermediários reativos de oxigênio e, sobretudo, citocinas (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; ASAI et al., 2010).

Pouco se sabe sobre os mecanismos empregados pela imunidade adaptativa frente a infecção por *S. aureus*. Alguns autores acreditam que a indução de células T e células B, via imunização, já é suficiente para gerar uma proteção integral (BEKEREDJIAN-DING et al., 2007).

Segundo Proctor, 2012, antígenos específicos para células *Th17* podem ajudar na melhoria do desempenho de neutrófilos, com a geração de anticorpos ideais para a opsonização de cepas estafilocócicas. As células *Th17* estão atualmente sendo muito estudadas na geração de proteção frente a infecções, sobretudo com a produção de Interleucina 17 via células T CD4⁺ em modelos murinos. No entanto, os requisitos para a diferenciação e as propriedades das células *Th17* humanas e em modelos animais induzidas por patógenos permanecem pouco entendidos (VAN DE VEERDONK et al., 2009).

Encontrar antígenos que gerem proteção é importante, porém, a busca pela compreensão de como neutralizar a expressão de fatores de virulência é fundamental.

2.4. Rota de imunizações e Modelos animais

Modelos animais tentam simular ao máximo o que acontece durante a infecção e as abordagens são estimadas tais como ocorreriam em humanos. Porém, além da espécie e da anatomia, modelos murinos apresentam características que os diferenciam do humano quanto ao padrão de resposta frente a uma infecção. No entanto, a utilização de diferentes modelos pode aumentar o conhecimento sobre os fatores decisivos no controle da infecção (SEOK et al., 2013).

Dentre os modelos murinos, autores relatam como importante, a característica de susceptibilidade à infecção apresentada, por exemplo, pela linhagem A/j quando comparada à linhagem C57Bl/6. Estudos anteriores demonstraram que a resistência à infecção neste modelo, é regulada principalmente pelo *lócus Hc* no cromossomo 2 do animal. Mesmo após uma imunização com consequente desafio, esses dois modelos ainda apresentaram diferenças quanto a susceptibilidade em outros modelos de infecção com *Listeria monocytogenes* (CZUPRYNSKI; FAITH; STEINBERG, 2003).

Na literatura, estão presentes trabalhos que demonstram que a característica de resistência do camundongo C57Bl/6 está relacionada ao fato deste modelo apresentar um perfil de resposta imunológica mais *Th1*. Ou seja, com uma alta produção de INF- γ , citocina fundamental para a atividade bactericida devido a sua grande característica pró-inflamatória (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Além deste, foi observado que camundongos *A/j* apresentaram resposta *Th2* exacerbada concomitantemente com aumento no número de células *Th17*. A IL-17 em modelos de infecção, está diretamente relacionada a quimioatração de neutrófilos. Estes, são descritos na literatura como a principal célula no controle da infecção por *S. aureus* (LIN et al., 2009; NARITA et al., 2010). Desta forma, a utilização destes dois modelos se torna interessante para a comparação de respostas imunes diferentes frente a uma infecção. Além disso, a rota utilizada para a imunização poderá influenciar na resposta imunológica, seja ela celular ou via produção de anticorpos.

Dentre os vários objetivos de uma vacina, a capacidade de desencadear a interação de várias células do sistema imunitário tal como uma resposta imune normal é fundamental para a geração de proteção frente a uma infecção (DENIS; ALAIN; PLOY, 2007). Assim, é necessário apresentar os antígenos em um sítio anatômico onde este entrará em contato com células do sistema imune, e que este sítio represente a infecção tal como ela ocorre em situações de normais de entrada no organismo.

A rota de imunização é, portanto, essencial para o resultado da medida imunoprolática. Dentre elas, as injeções intramuscular e subcutânea são as mais populares. Antígenos injetados por via intramuscular podem formar persistentes precipitados que são dissolvidos e absorvidos de forma relativamente lenta (DENIS; ALAIN; PLOY, 2007). Superantígenos estafilocócicos, como a Enterotoxina B, foram avaliados como agentes imunizadores pela via intramuscular e foi observada a geração de proteção contra infecções nasais causadas por este patógeno em modelos murinos (LOWELL et al., 1996). No nosso trabalho, foi utilizada a via intradérmica por ter apresentado bons resultados quando realizadas sucessivas imunizações, apresentando respostas mediadas por anticorpos (TAKAHASHI et al., 2013). Além de simular de maneira mais precisa a infecção que ocorre em humanos por este patógeno (ASAI et al., 2010).

A pele, especialmente a sua camada epidérmica, é um ambiente imunológico acessível e um alvo atrativo para a entrega de imunógenos. A imunização pela mucosa é uma outra estratégia: a sua lógica é importante porque os organismos invadem o corpo através de superfícies mucosas, sobretudo com a geração de anticorpos da classe IgA, porém, o desenvolvimento de tolerância imunológica é um ponto limitador deste modelo (STILES et al., 2001; ARLIAN; TINKER, 2011).

Modelos animais podem ser utilizados ainda, para desenvolver protocolos que permitam uma observação do perfil de infiltrado celular após um possível desafio, quando imunizados previamente. Dentre estes modelos de observação, temos o bolsão de ar. O modelo de bolsão trata-se de um espaço de fácil acesso que pode ser produzido no tecido subcutâneo dorsal do camundongo, com uma injeção de um pequeno volume de ar. Este modelo tem se mostrado eficaz em estudos de observação da quimioatração celular para o sítio inflamatório induzido por infecções (EDWARDS; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1981). Logo, por ser um modelo de avaliação de inflamação, pode contribuir para o entendimento das respostas iniciais geradas na infecção por *S. aureus* em camundongos previamente imunizados.

3. OBJETIVOS

Avaliação da atuação de determinados componentes imunológicos em camundongos das linhagens C57Bl/6 e A/j imunizados com amostra de MRSA inativadas por calor e posteriormente desafiados com a mesma amostra de MRSA não inativada.

3.1. Objetivos específicos

- Estudar mecanismos envolvidos na imunidade contra *S. aureus*;
- Realizar quantificações de células inflamatórias em diferentes sítios anatômicos;
- Avaliar o padrão de depuração bacteriana nas duas diferentes linhagens;
- Avaliar a produção de anticorpos no sítio inflamatório e no soro dos animais imunizados;
- Realizar quantificações de citocinas pró-inflamatórias e IL-17A no bolsão inflamatório.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção da amostra MRSA

A amostra de MRSA 43300 foram obtidas da coleção do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, cedidas pelo Professor Doutor Lucas Miranda Marques.

As amostras foram armazenadas em freezer a - 80°C. No momento da cultura as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e semeadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*, pH7.4, HIMEDIA) e levadas a estufa por 24 horas a 37°C.

As provas bioquímicas de identificação para *S. aureus* foram realizadas para confirmação da amostra, como catalase, coagulase e a técnica do *gram*. A amostra positivou para todas essas análises, além do teste de sensibilidade a meticilina realizado anteriormente.

4.2. Determinação do tamanho do inóculo bacteriano e inativação por calor

A determinação da carga bacteriana inoculada nos animais se deu por espectrofotometria. O inóculo foi realizado por meio da suspensão direta, realizada no fluxo laminar previamente esterilizado, retirando-se 3 a 5 colônias das placas de culturas e diluindo-as em 1 ml de salina estéril. Posteriormente, uma alíquota da solução foi colocada em cubetas de quartzo para leitura no espectrofotômetro. Neste momento, foram observados alguns parâmetros: 0,135 de absorbância a 660 nm (0,5 na escala *McFarland*, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), para a obtenção da quantidade de 10^8 UFC de *S. aureus*.

Após a quantificação, foi realizada uma diluição seriada (100 microlitros da solução em 900 microlitros de salina) para a obtenção de 10^6 UFC, quantidade essa que foi a inoculada nos animais a serem imunizados. Para a sensibilização dos animais, a amostra bacteriana foi inativada por calor ("*Heat Killed*", 60°C por 30 minutos) antes de serem utilizadas nas imunizações.

4.3. Animais

Foram utilizados para os experimentos 72 camundongos C57Bl/6 e 72 camundongos A/J, obtidos do biotério da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde - *Campus* Anísio Teixeira (UFBA/IMS-CAT), com seis a oito semanas de idade. Foram mantidos em salas climatizadas e com fotoperíodo regulado no biotério da UFBA/IMS-CAT por todo período de experimentação.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IMS-CAT da UFBA (Anexo I).

4.4. Imunização intradérmica com amostra inativada de MRSA - Formação dos grupos

O experimento ocorreu de forma semelhante e independente nas diferentes linhagens de camundongos. Desta forma, os animais foram divididos em dois grupos: imunizados e controles, com 36 animais em cada grupo.

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com 50 mg/kg de quetamina e 10 mg/Kg de Xilazina, para realização das imunizações intradérmicas na orelha esquerda.

4.5. Imunização

No total, foram três imunizações. A sensibilização foi com amostra MRSA já inativadas pelo calor (Grupo 1), na quantidade de 10^6 presentes em um volume de 10 microlitros (μ l). O intervalo entre as imunizações foi de 14 dias. Os animais controle receberam o mesmo volume de salina estéril (Grupo 2).

4.6. Formação de novos grupos para o desafio

O desafio dos animais foi no modelo de bolsão inflamatório e ocorreu 14 dias após a última imunização. Neste momento, os animais imunizados formaram dois novos grupos: animais desafiados com amostra viva de MRSA (Grupo 3, n = 18) e os animais imunizados desafiados com salina (Grupo 4, n = 18), em cada um dos tempos analisados.

O mesmo ocorreu com os animais que receberam salina na orelha esquerda, onde parte deste grupo foi desafiados com amostra viva de MRSA (Grupo 5, n = 18) e o respectivo controle desafiados com salina (Grupo 6, n = 18); (Figura 2).

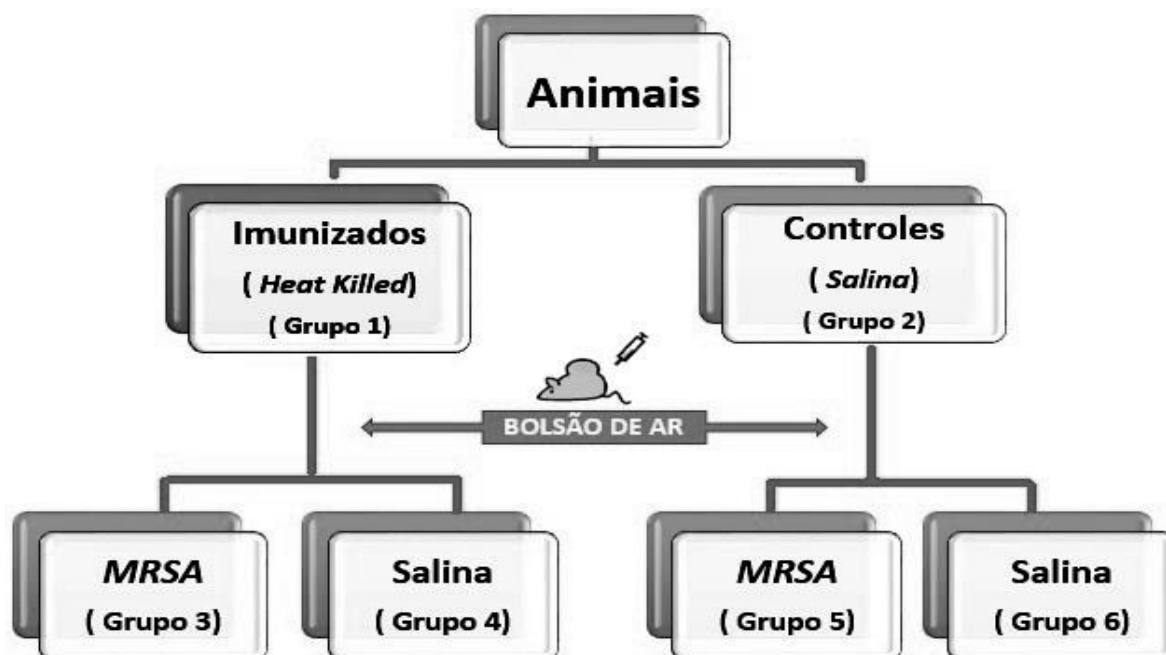


Figura 2: Desenho experimental - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras de MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas, para posterior análise.

4.7. Desafio no modelo de bolsão inflamatório

A confecção do bolsão de ar foi realizada como descrito por Edwards JC *et al*, 1981, com adaptações segundo a literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Inicialmente os animais, foram anestesiados intraperitonealmente com 50 mg/kg de quetamina e 10 mg/Kg de Xilazina, e receberam inóculo de 3 ml de ar estéril.

Os grupos 3 e 5 receberam 10^7 UFC de MRSA ressuspensos em 100 microlitros de salina. Os respectivos controles receberam o mesmo volume de salina (grupos 4 e 6). Posteriormente, nos tempos de 6, 12 e 24 horas, os animais foram eutanasiados (n=6/grupo/tempo).

Desta forma, após os tratamentos nos camundongos C57Bl/6 e A/j, foram formados grupos de animais imunizados com a amostra inativada e desafiados com a amostra viva no bolsão de ar (**Heat Killed/MRSA**), animais imunizados com a amostra inativada e que receberam salina no bolsão de ar (**Heat killed/ Salina**), animais que receberam salina na orelha esquerda e desafiados com a amostra viva no bolsão (**Salina/ MRSA**) e, por fim, animais que receberam salina na orelha esquerda e desafiados com salina no bolsão (**Salina/ Salina**).

A eutanásia dos animais foi realizada através de aprofundamento anestésico, com a administração de quetamina e xilazina, nas doses de 400mg/kg e 40mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal.

4.8. Obtenções de fluidos biológicos

O sangue foi coletado para contagens total e diferencial de leucócitos e obtenção do soro para quantificação de anticorpos IgG. Esfregaços sanguíneos foram confeccionados, corados por panótico rápido e avaliados por microscopia de luz.

Vinte microlitros de sangue foram coletados para a diluição em 380 microlitros de azul de *Turkey* (Newprov, Produtos para Laboratório) e a contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer (*Optik Labor*). O restante do sangue, foi centrifugado (1500 rpm por 10 minutos) para a obtenção do soro, que foi armazenado a - 20°C dentro de microtubos de 1ml para avaliação da produção de anticorpos IgG, bem como, de citocinas pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, BD Biosciences*).

4.9. Quantificação de citocinas inflamatórias no baço e medula

Uma placa de *ELISA* com 96 poços foi sensibilizada com 9,6 ml do anticorpo de captura (100 µl/poço) específico para uma determinada citocina, que poderia ser TNF- α , IL-1 β , IL-17A, INF- γ ou IL-4, incubada *overnight* a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada com 50 ml PBS *Tween* (InvitrogenTM) para retirar os anticorpos livres e bloqueada por 2 horas com 200 microlitros por poço de diluente de ensaio 1x (*Assay Diluent, BD Biosciences*). Em seguida, as placas foram lavadas mais uma vez e foram adicionadas as amostras (100 µl/poço) do baço, ou medula

(macerados em salina e coletado o sobrenadante) e incubados *overnight* a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas e nela adicionados os anticorpos de detecção (100 µl/poço) por 1 hora. Os poços foram novamente lavados e foi adicionado o anticorpo secundário conjugado livre (100 µl/poço). Uma solução de Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionada aos poços (100 µl/poço) e foi observado o padrão de mudança de coloração. A solução de parada da reação foi adicionada em cada placa (50 µl/poço) e a intensidade da cor foi medida em um leitor automático de placas (*ThermoPlate*) a 450 nanômetros.

4.10. Obtenção de células do sítio inflamatório

O lavado do bolsão foi realizado com 5 ml de salina estéril apirogênica a 4°C e armazenado em tubos de 15 ml, que foram acondicionados em gelo. As células em suspensão foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C, e o *pellet* com células foi ressuspendido em 1ml de meio *RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Invitrogen™)*. A contagem de células totais foi realizada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada pela técnica de citospin em lâminas coradas por panótico e analisadas por microscopia. O restante do lavado foi armazenado a -80°C para posterior quantificação de citocinas inflamatórias presentes e anticorpos IgG.

4.11. Determinação da carga bacteriana

Após o lavado do bolsão, foram cultivados 5 microlitros de cada lavado em placas de BHI (*Brain Heart Infusion, pH7.4, HIMEDIA*) e levadas a estufa por 24 horas a 37°C. A técnica utilizada para o semeio foi o *pour plate*, facilitando assim a quantificação do número de colônias formadas após o tempo de cultura. A quantificação das UFC foi realizada com o auxílio de um contador de colônias (*CP-600 Plus, Phoenix*).

4.12. Quantificação de citocinas inflamatórias no lavado do bolsão

Uma placa de ELISA com 96 poços foi sensibilizada com 9,6 ml do anticorpo de captura (100 µl/poço) específico para uma determinada citocina, que poderia ser

TNF- α , IL-1 β , IL-17A, INF- γ ou IL-4, incubada *Overnight* a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada com 50 ml PBS *Tween* (InvitrogenTM) para retirar os anticorpos livres e bloqueada por 2 horas com 200 microlitros por poço de diluente de ensaio 1x (*Assay Diluent*, *BD Biosciences*). Em seguida, as placas foram lavadas mais uma vez e foram adicionadas as amostras do lavado, 100 microlitros por poço, onde estavam presentes os antígenos que se ligaram aos anticorpos fixados nas placas e novamente, incubados *overnight* a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas e nela adicionados os anticorpos de detecção (100 μ l/poço) por 1 hora. Os poços foram novamente lavados e foi adicionado o anticorpo secundário conjugado livre (100 μ l/poço). Uma solução de Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionada aos poços (100 μ l/poço) e foi observado o padrão de mudança de coloração. A solução de parada da reação foi adicionada em cada placa (50 μ l/poço) e a intensidade da cor foi medida em um leitor automático de placas (*ThermoPlate*) a 450 nm.

4.13. Quantificação de IgG1 e IgG2a no soro e no lavado do bolsão

Três a cinco colônias da bactéria foram solubilizadas em 10 ml de NaOH e inativadas em banho-maria por 30 minutos a 60°C. Após o resfriamento, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a bactéria foi ressuspensa em 10 ml de tampão (*Coating Buffer*, *BD Biosciences*). Esta solução foi utilizada para sensibilização de uma placa com 96 poços, no volume de 100 microlitros por poço. Em seguida, a placa foi mantida a temperatura ambiente por 24 horas.

No dia seguinte, a placa foi lavada com PBS *Tween* (InvitrogenTM), e bloqueada por 2 horas com 200 microlitros por poço de diluente de ensaio 1x (*Assay Diluent*, *BD Biosciences*). Após o tempo de bloqueio, as placas foram novamente lavadas e em seguida foram plaqueadas as amostras do soro diluído (1:50) no volume de 100 microlitros por poço e mantida a temperatura ambiente por 1 hora, o lavado não foi diluído e plaqueado na respectiva placa também no volume de 100 microlitros por poço. Após mais uma lavagem da placa, foram adicionados os anticorpos IgG1 e IgG2a anti-IgG1 ou anti-IgG2a (InvitrogenTM), mantidos a temperatura ambiente por 1 hora.

Os poços foram novamente lavados e foi adicionado o anticorpo secundário conjugado livre (*BD Biosciences*) por 1 hora. Após lavar os poços, uma solução de Tetrametilbenzidina (*BD Biosciences*) foi adicionada aos poços e foi observado o

padrão de mudança de coloração. A solução de parada da reação foi adicionada (50 µl/poço) e a intensidade da cor foi medida em um leitor de placas (*ThermoPlate*) a 450nm.

4.14. Obtenção de amostras da pele e exsudato inflamatório

Amostras de pele do bolsão foram coletadas e fixadas em formol a 10% (*Impex, Labimpex*). Foram realizados cortes histológicos transversais de 5 micrômetros em blocos parafinizados. As laminas histológicas foram coradas por Hematoxilina e Eosina e avaliadas por microscopia de luz. Foi utilizado o software gratuito de código aberto, chamado *ImageJ*, para fazer a contagem das células.

4.15. Análises estatísticas

Na análise estatística dos experimentos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* através do programa *GraphPadPrism* (versão 5.0, Programa *GraphPad Inc.*, San Diego, CA, USA) com pós teste de *Dunns*. Para os demais desfechos, na comparação entre as linhagens foi utilizado o teste *Mann-Whitney* para realizar as comparações entre os grupos. Sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Desafio com *S. aureus* não causa leucitose no sangue periférico

Para avaliar se o modelo do bolsão de ar em camundongos imunizados intradermicamente poderia induzir alterações quantitativas nos leucócitos no sangue periférico, este tecido conjuntivo foi coletado de todos os animais nos tempos da eutanásia. Desta forma, como observado na figura 3, dados obtidos durante a contenção dos animais demonstram que, nos tempos avaliados, animais infectados e seus respectivos controles não apresentam leucitose após o desafio. No entanto, camundongos C57Bl/6 imunizados e desafiados com MRSA apresentam um número de leucócitos maior que os animais A/j.

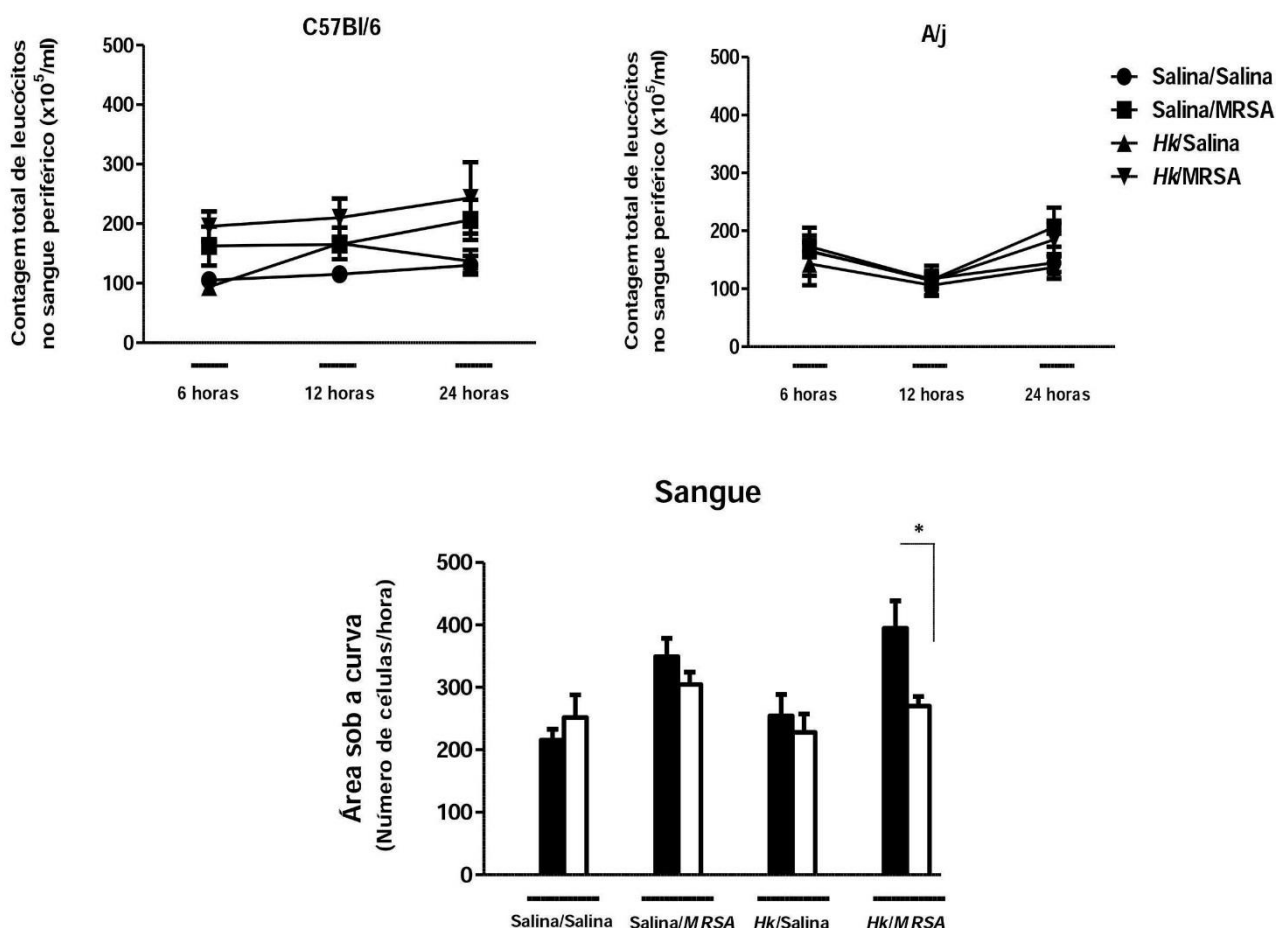


Figura 3: Contagem total de leucócitos no sangue periférico ($\times 10^5/\text{ml}$) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o sangue coletado e quantificado quanto ao número total de leucócitos presentes utilizando câmara de Neubauer ($n=6$); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(* $p<0,05$).

5.2. Animais imunizados apresentam neutrofilia no sangue periférico

Com o objetivo de avaliar as quantidades relativas dos diferentes tipos de leucócitos no sangue periférico, após o desafio, foi realizada uma contagem diferencial dos leucócitos por meio de microscopia de luz. A figura 4 representa os principais tipos celulares observados durante as análises feitas nas lâminas. Assim sendo, é possível perceber que ocorreram diferenças quantitativas no número de polimorfonucleares nos animais desafiados com *S. aureus*.

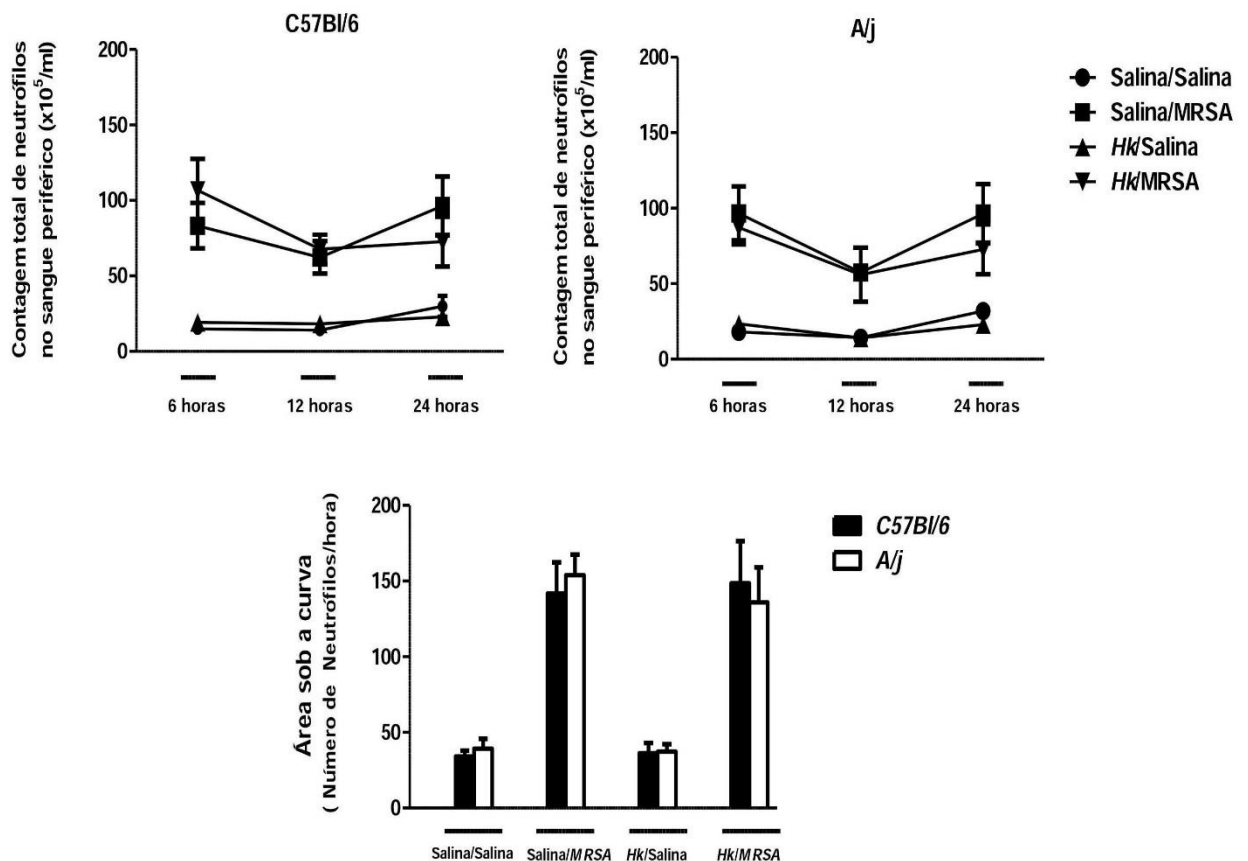


Figura 4: Contagem diferencial de Neutrófilos no sangue periférico ($\times 10^5/\text{ml}$) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de amostrass de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Amostras de sangue foram coletadas, esfregaços sanguíneos confeccionados e a contagem diferencial de neutrófilos realizada por microscopia utilizando a câmara de Neubauer ($n=6$); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*); (* $p < 0,05$).

Em relação as demais populações de leucócitos, não foram observadas diferenças entre mononucleares nos grupos analisados (Figura 5).

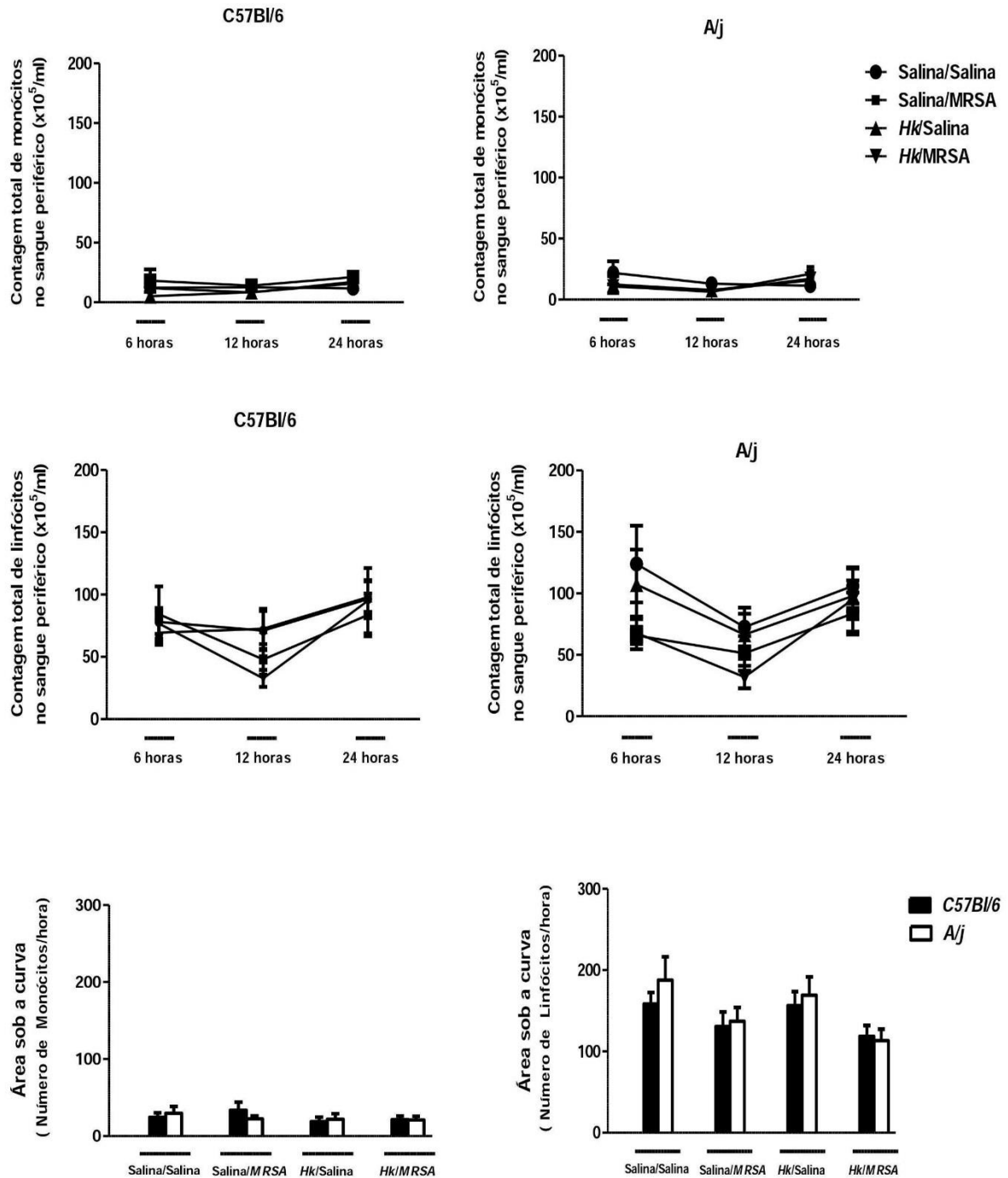


Figura 5: Contagem diferencial de Monócitos e Linfócitos no sangue periférico (x10⁵/ml) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Amostras de sangue foram coletadas, esfregaços sanguíneos confeccionados e a contagem diferencial de neutrófilos realizada por microscopia utilizando a câmara de Neubauer (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*); (*p<0,05).

5.3. Animais imunizados intrademicamente apresentam uma menor inflamação na derme do bolsão inflamatório

No intuito de avaliar o infiltrado celular presente na derme que recobre o bolsão inflamatório nos animais imunizados intrademicamente e desafiados com MRSA, a pele do dorso do animal foi coletada e processada para a confecção de lâminas histopatológicas. No nosso modelo foram observadas as quantidades e as populações celulares presentes no local, pela contagem diferencial. A figura 6 esquematiza como ficaram as lâminas de todos os grupos analisados.

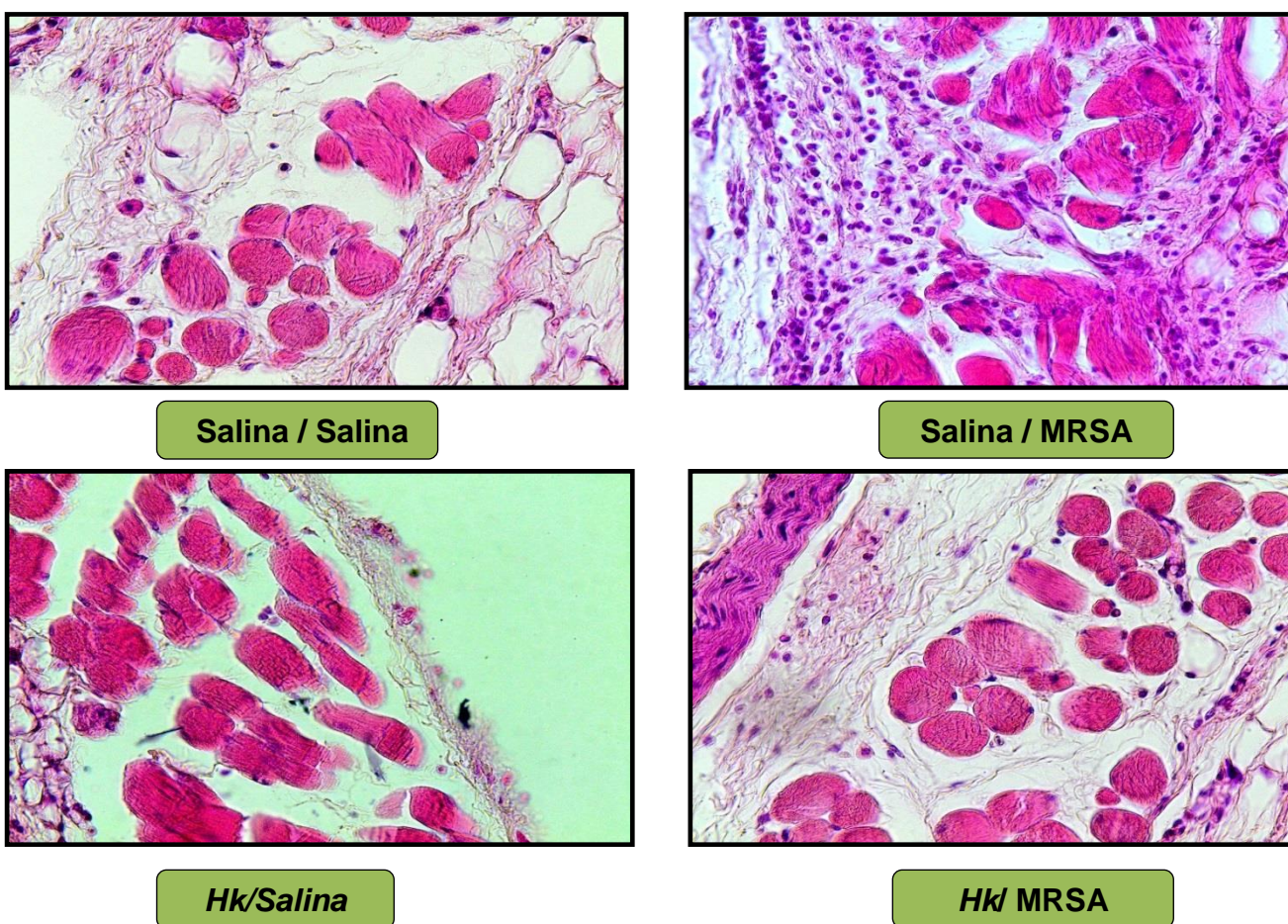


Figura 6: Lâminas representativas do recrutamento leucocitário na derme do bolsão inflamatório – Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram a pele do bolsão coletada e confeccionadas lâminas histopatológicas que foram analisadas por microscopia de luz (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*).

Foram realizadas as contagens totais e diferenciais do infiltrado celular na derme dos animais C57Bl/6 para o perfil celular do infiltrado inflamatório no sítio do desafio nos grupos. A figura 7 demonstra que animais desafiados com MRSA apresentaram intenso infiltrado na pele que recobre o bolsão, entretanto quando previamente imunizados, esse infiltrado se mostra menor quanto ao número de células em todos os tempos analisados.

Com o objetivo de analisar de forma relativa a presença das células inflamatórias, polimorfonucleares e mononucleares foram quantificados em todas as lâminas e representados na figura 8.

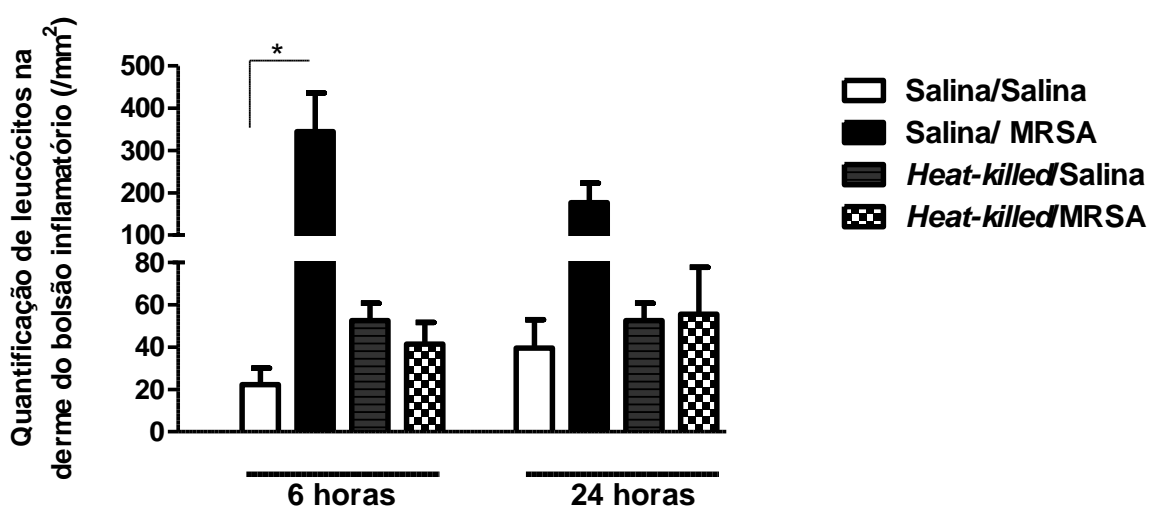


Figura 7: Recrutamento leucocitário na derme do bolsão inflamatório (mm^2) – Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram a pele do bolsão coletada e confeccionadas lâminas histopatológicas que foram analisadas por microscopia de luz ($n=6$); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(* $p<0,05$).

Como é possível analisar, polimorfonucleares são os principais tipos celulares presentes na derme dos animais desafiados com *S. aureus*, sendo que da mesma forma que o infiltrado total, essas células também estão em menores proporções em animais previamente imunizados (Figura 8). Em relação aos mononucleares, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

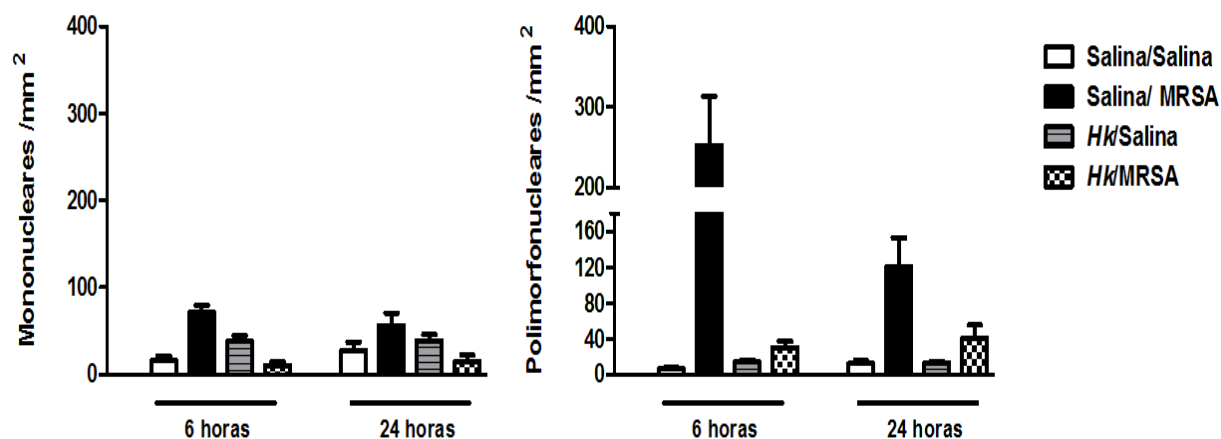


Figura 8: Contagem diferencial do recrutamento leucocitário na derme do bolsão inflamatório – Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram a pele do bolsão coletada e confeccionadas lâminas histopatológicas que foram analisadas por microscopia de luz quanto a contagem total diferencial de polimorfonucleares (A) e mononucleares (B) (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).

5.4. Animais imunizados apresentam um menor recrutamento celular no sítio inflamatório

No intuito de avaliar quais as possíveis diferenças no quantitativo celular presente no ambiente inflamatório, o lavado do bolsão foi realizado. Na figura 9 podemos perceber que animais desafiados com *S. aureus* apresentam recrutamento de células inflamatórias maior no bolsão de ar. Este infiltrado leucocitário em resposta ao desafio foi avaliado também nos tempos de 6, 12 e 24 horas após o desafio. Nestes tempos analisados, de maneira interessante, animais C57Bl/6 previamente imunizados apresentam um recrutamento precoce de células inflamatórias e esse número é mantido por quase todo o tempo analisado. Nesta mesma linhagem, animais não imunizados apresentaram uma elevação quantitativa mais tardia.

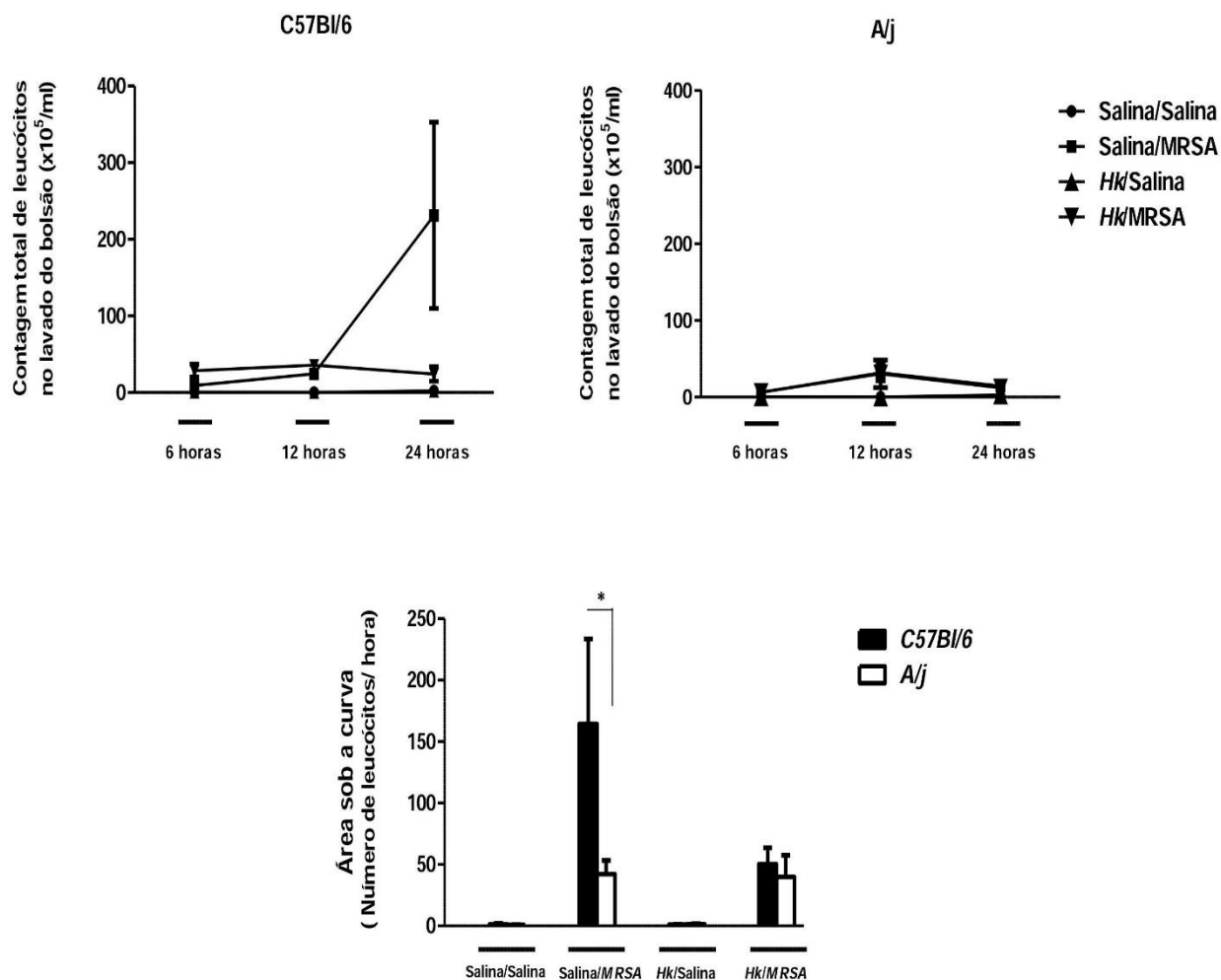


Figura 9: Contagem total de leucócitos no lavado do bolsão (x10⁵/ml) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e quantificado quanto ao número total de leucócitos presentes pela câmara de Neubauer (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).

Animais A/j imunizados e seus controles não apresentaram diferenças no perfil de recrutamento celular no ambiente inflamatório, além de quantitativamente menor quando comparados numericamente com animais C57Bl/6.

Pela técnica do citospin, é possível quantificar a diferença entre as populações celulares presentes nos infiltrados de animais desafiados com *S. aureus* e seus respectivos controles desafiados com salina. A Figura 10 mostra uma imagem representativa dos animais C57Bl/6, onde é possível observar o infiltrado de polimorfonucleares.

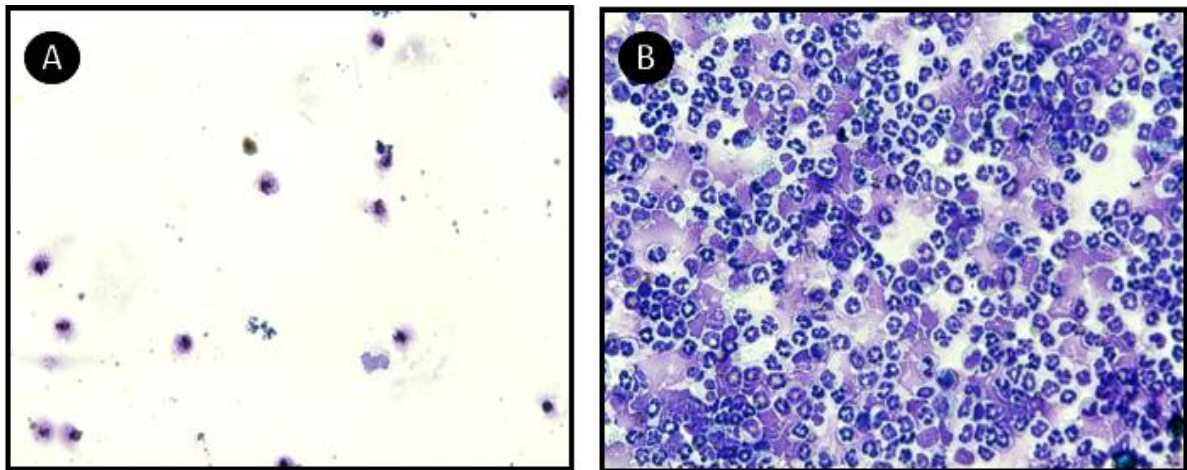


Figura 10: Infiltrado leucocitário no bolsão de ar - Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado, centrifugado e as células foram concentradas pela técnica do citospin e avaliados por microscopia de luz. Imagem representativa dos diferentes grupos avaliados (A=Animais desafiados com salina; B=Animais desafiados com *S. aureus*).

A presença de neutrófilos foi quantificada para avaliação da proporção relativa presente no ambiente inflamatório nos diferentes grupos analisados, bem como, nos dois tipos de linhagens estudados.

A figura 11 representa graficamente a quantificação de neutrófilos presentes em todos os tempos analisados (6, 12 e 24 horas) após o desafio nas linhagens de camundongos C57Bl/6 e A/j.

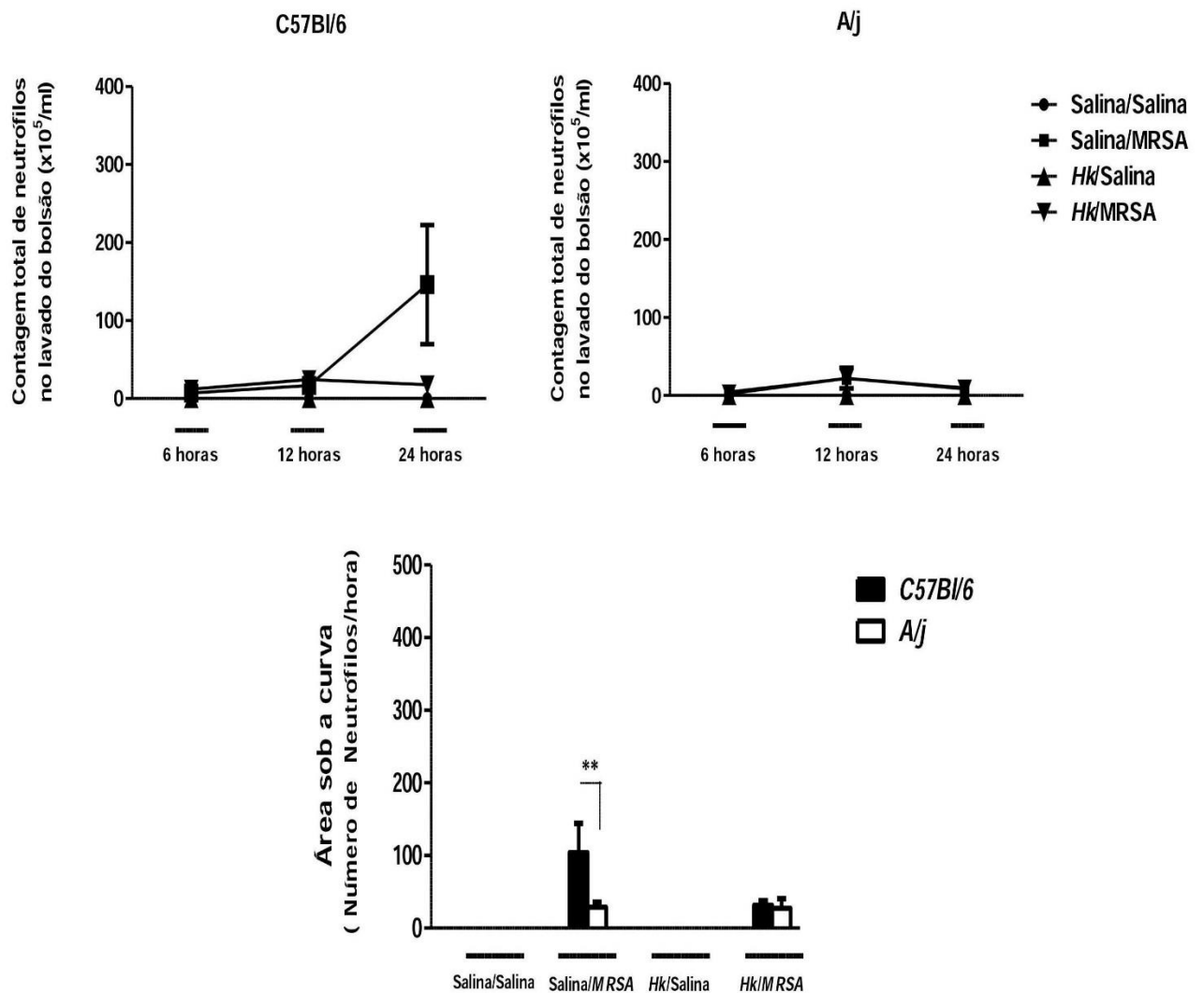


Figura 11: Contagem diferencial de Neutrófilos no lavado do bolsão ($\times 10^5/\text{ml}$) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e pela técnica do citospin as células foram concentradas em lâminas e a contagem diferencial de neutrófilos realizada por microscopia ($n=6$); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*) ;(* $p<0,05$).

A linhagem de A/j acompanhada neste estudo não apresentou diferenças no recrutamento neutrofílico nos grupos estudados, porém, essas células estão em proporções quantitativas menores quando comparadas a linhagem C57Bl/6. Na figura 12, quando analisados os mononucleares observamos que ocorrem proporções e elevações similares aos dos neutrófilos, nos tempos analisados.

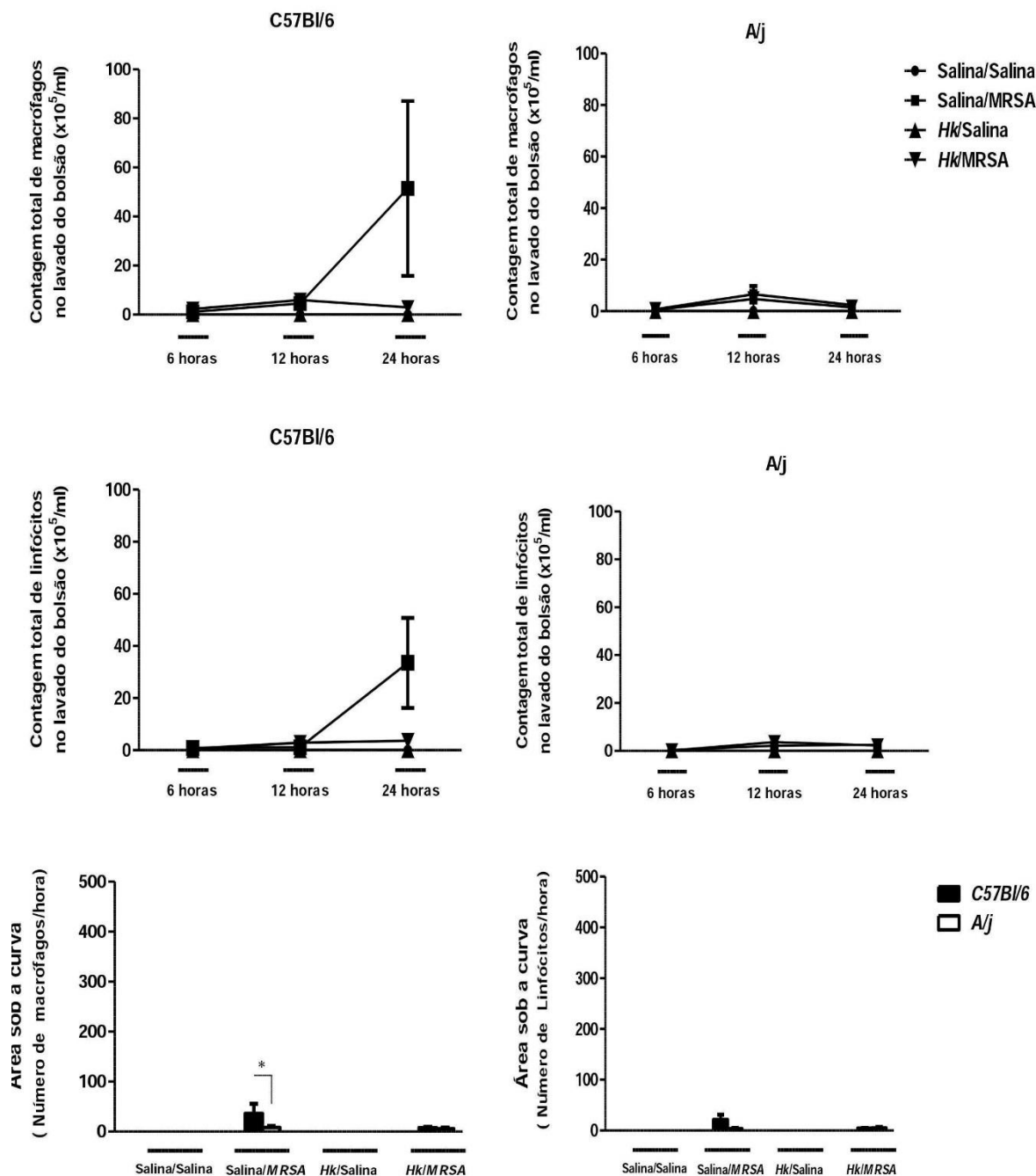


Figura 12: Contagem diferencial de Macrófagos e Linfócitos no lavado do bolsão (x10⁵/ml) - Camundongos C57Bl/6 e A/J previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e pela técnica do citospin as células foram concentradas em lâminas e a contagem diferencial de macrófagos e linfócitos realizada por microscopia de luz (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).

5.5. Animais C57Bl/6 imunizados apresentam maior depuração bacteriana no bolsão

Para analisar se a imunização alteraria o padrão de depuração bacteriana após o desafio, foram quantificadas as unidades formadoras de colônias (UFC) nas duas linhagens. De maneira representativa, a figura 13 demonstra o comportamento do crescimento bacteriano em placas de cultura com amostras obtidas nos diferentes grupos após 24 horas de cultivo.

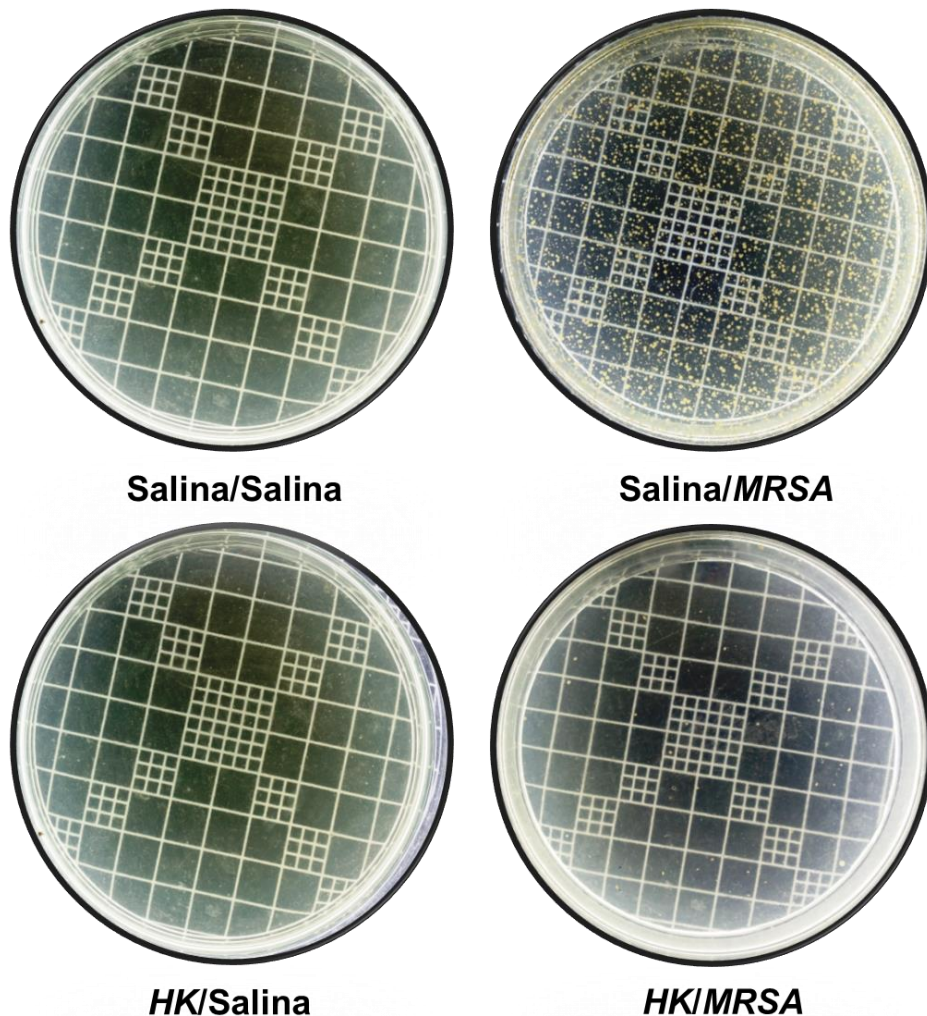


Figura 13: Representação das culturas de *Staphylococcus aureus* presentes no lavado do bolsão de ar - Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e foram cultivados em meio BHI (*brain heart infusion*). As UFCs foram quantificadas após 24 horas de cultivo (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*).

Com as informações obtidas pelas placas de culturas, foi possível quantificar as UFCs presentes, sendo esquematizada em forma de gráficos na figura 14. Foi observado que ocorreram dados inversos nas diferentes linhagens analisadas, sendo que camundongos C57Bl/6 previamente imunizados apresentaram uma menor formação de UFC nos diferentes tempos analisados quando comparados com animais da mesma linhagem não imunizados previamente.

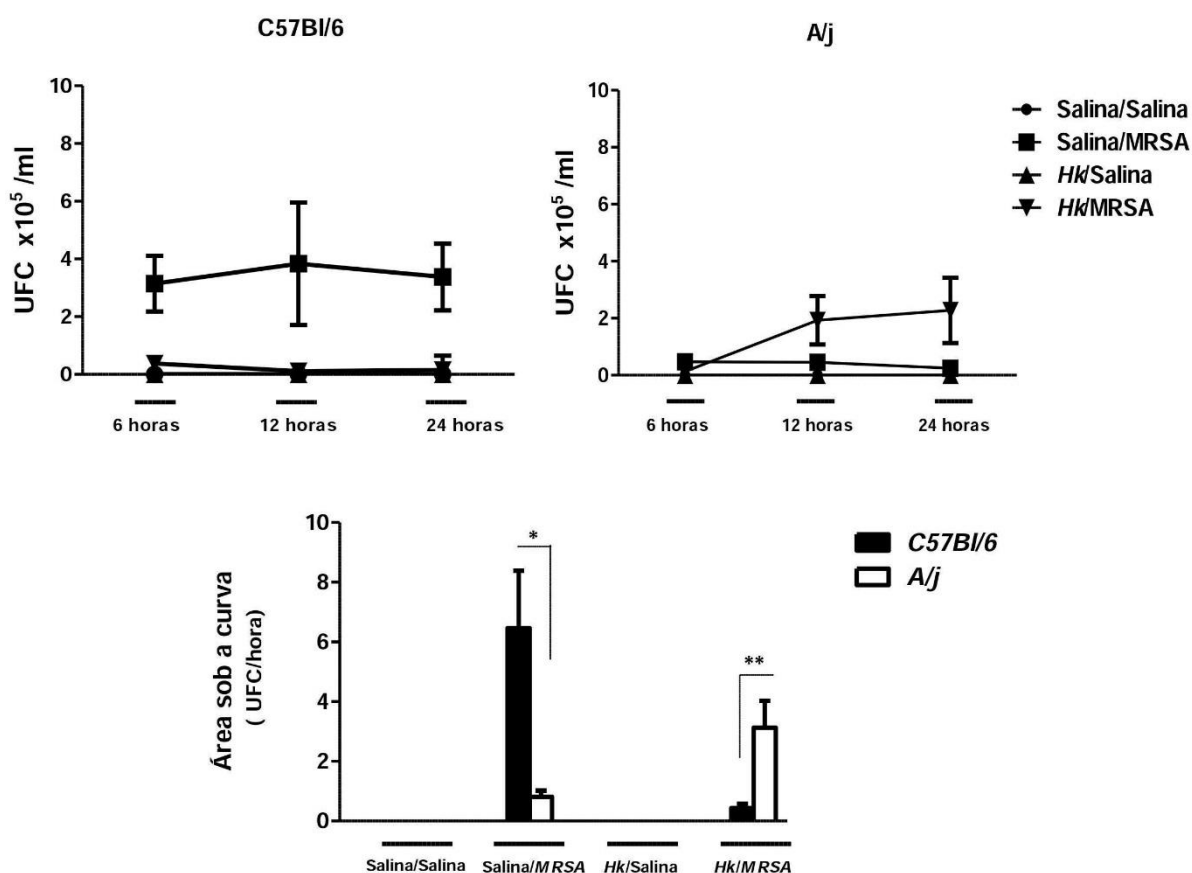


Figura 14: Carga bacteriana de *Staphylococcus aureus* no bolsão de ar (UFC x 10⁵ /ml) - Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10⁶ de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10⁷ UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e foram cultivados em meio BHI (*brain heart infusion*). As UFCs foram quantificadas após 24 horas de cultivo (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).

Camundongos A/j apresentam flutuações quantitativas com relação a carga bacteriana nos tempos analisados. No tempo de 6 horas, animais imunizados seguiram o mesmo padrão da linhagem C57Bl/6, porém os camundongos A/j apresentam variações nos tempos seguintes, ocorrendo uma inversão quantitativa entre imunizados e seus controles. Por fim, após 24 horas animais B6 imunizados apresentaram depuração bacteriana maior que animais A/j imunizados.

5.6. A imunização induz elevação de anticorpos IgG2a no soro dos animais C57Bl/6

Com o objetivo de avaliar se a depuração bacteriana está relacionada a produção de anticorpos, foram quantificados pela técnica de ELISA anticorpos da classe IgG no soro e no lavado do bolsão de ar.

A figura 15 mostra que a imunização promove um aumento nos títulos de anticorpos IgG2a no soro dos animais C57Bl/6. Apesar das flutuações dos valores nos tempos analisados, é possível observar maiores valores para os camundongos previamente imunizados.

Porém, animais A/j imunizados não apresentaram elevações nos títulos de anticorpos analisados em nenhum dos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas, como ocorrido com camundongos B6.

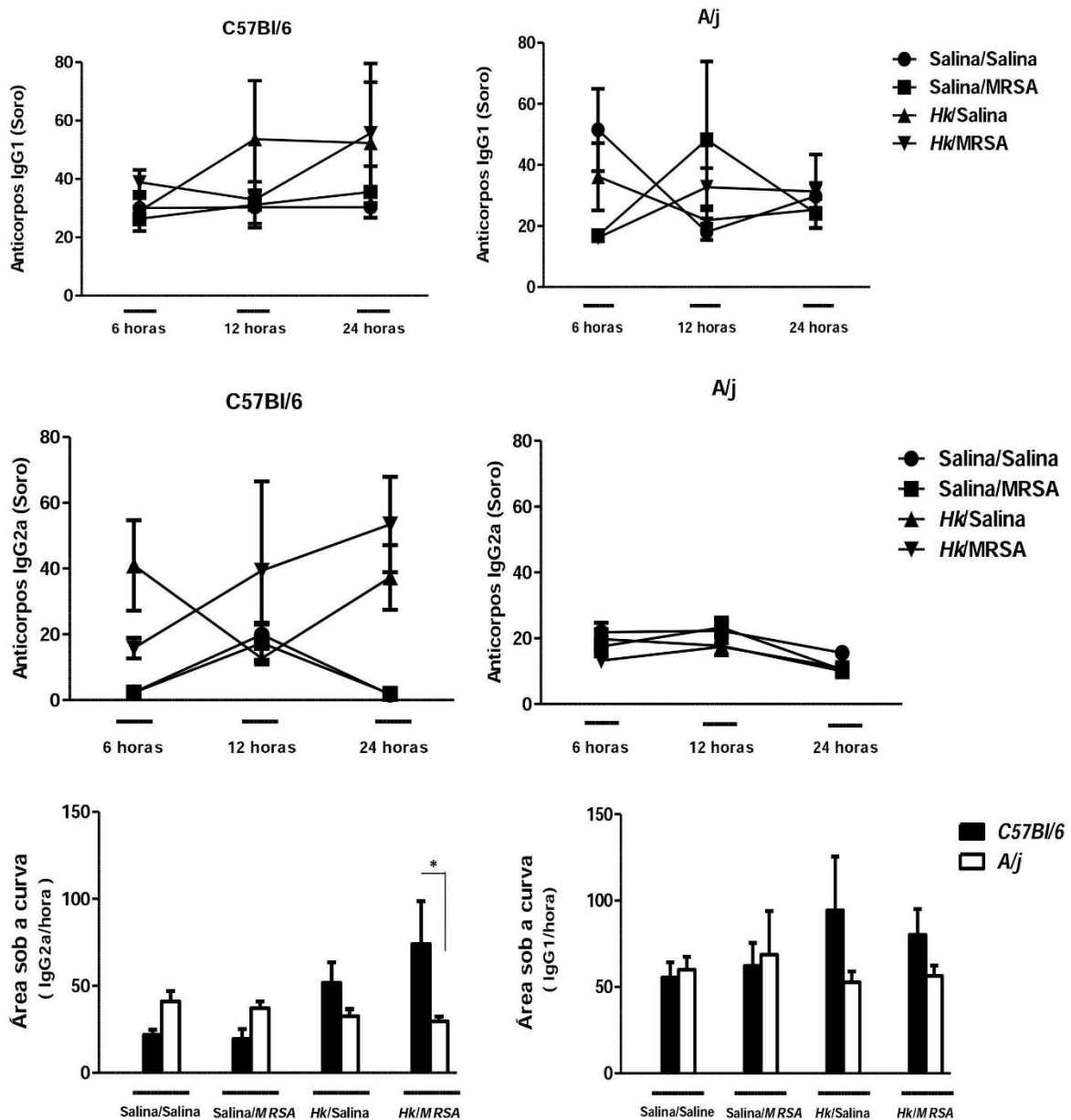


Figura 15: Concentrações séricas de anticorpos IgG2a (Densidade Óptica) - Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o sangue coletado para a obtenção do soro. Posteriormente, as concentrações séricas de IgG2a foram determinadas pela técnica de ELISA (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*); (*p<0,05).

Quando comparados, animais imunizados B6 e A/j é possível perceber que ocorrem diferenças significativas entre as linhagens. Uma vez que, animais C57Bl/6 imunizados apresentam maiores títulos de anticorpos IgG2a que a linhagem A/j imunizada.

Para analisar a concentração de anticorpos no local do desafio o lavado foi avaliado. Foi observada a presença de anticorpos IgG1 neste local, sem diferenças marcantes entre os grupos, nas duas linhagens. Porém, ocorreu uma diminuição na quantidade destes anticorpos após 24 horas do desafio (Figura 16).

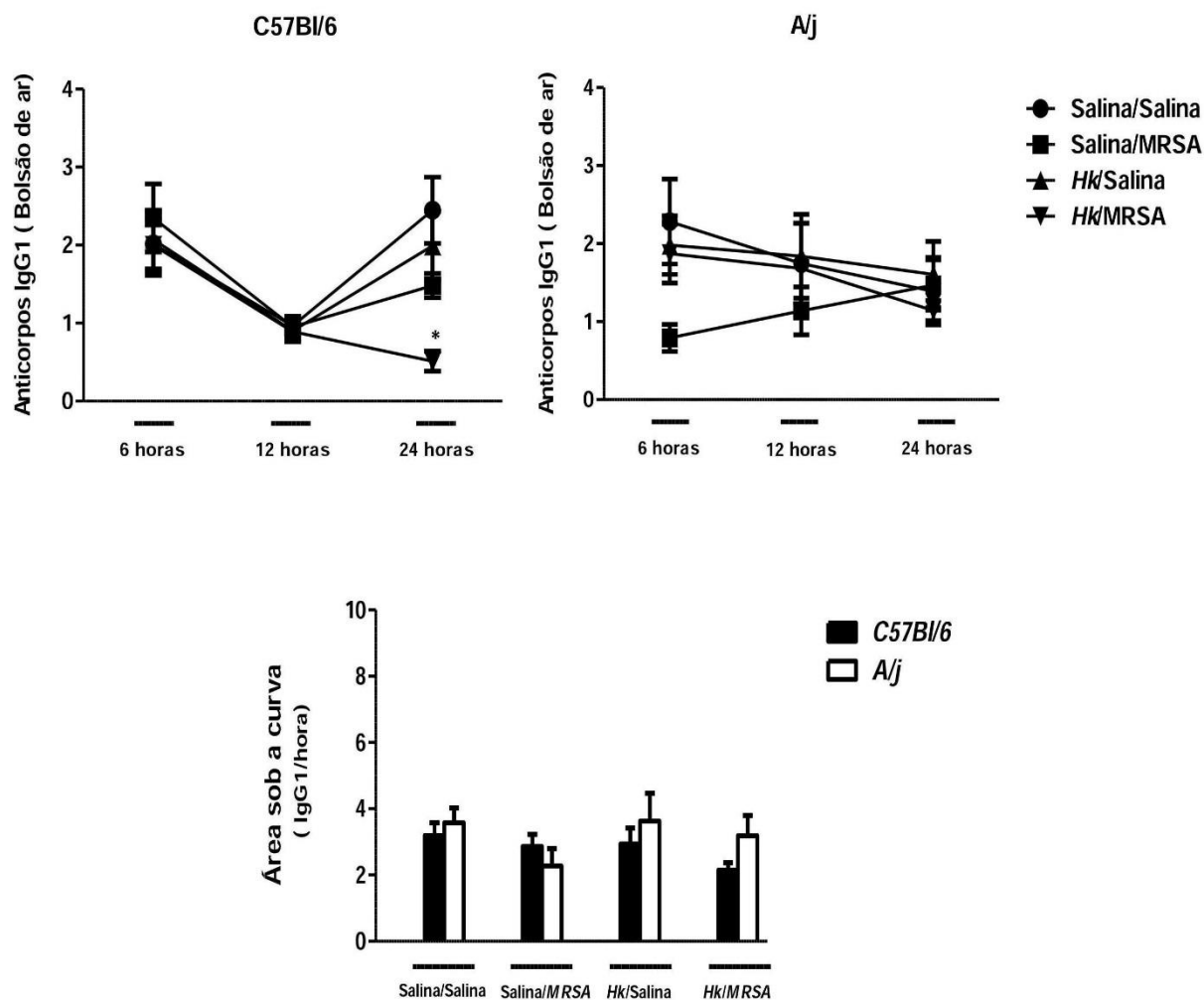


Figura 16: Concentrações de anticorpos IgG1 no lavado (Densidade Óptica) - Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado. Posteriormente, as concentrações no lavado de IgG1 foram determinadas pela técnica de ELISA (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).

5.7. Animais C57Bl/6 imunizados produzem IL-17A no sítio inflamatório após o desafio

No intuito de avaliar se após o desafio os animais imunizados produziram IL-17A o lavado do ambiente inflamatório foi coletado e pela técnica de ELISA foi determinada a quantidade desta citocina no material coletado. Sendo assim, foi observado que após 24 horas do desafio, animais B6 imunizados apresentaram elevações significativas de IL-17A quando comparados a B6 não imunizados e desafiados (Figura 17).

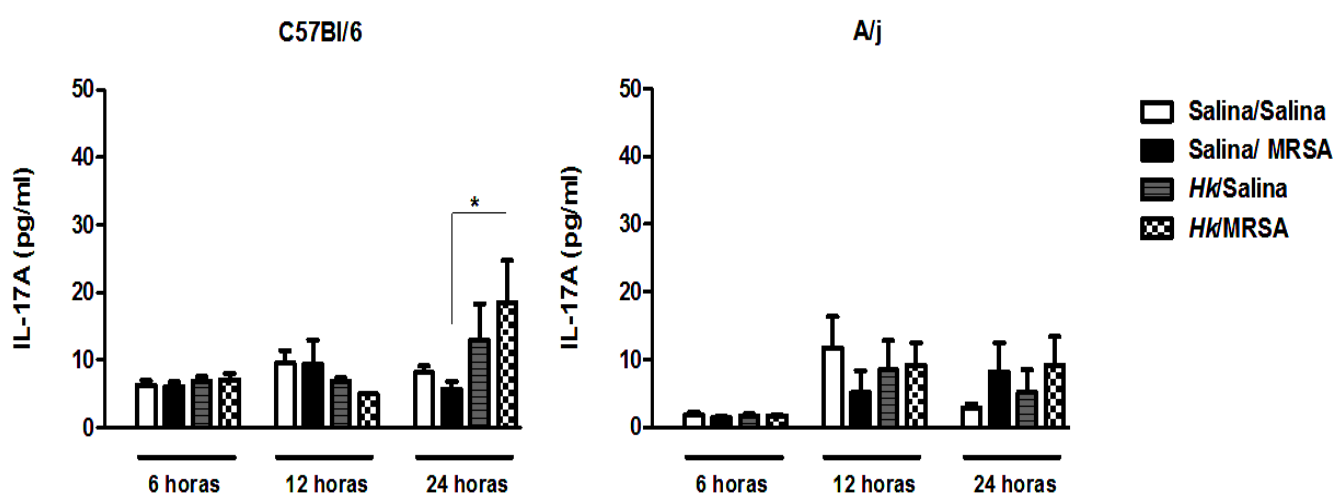


Figura 17: Quantificação de IL-17A no ambiente inflamatório (pg/ml) – Camundongos C57Bl/6 e A/j previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão coletado e avaliado pela técnica de ELISA quanto a presença de IL-17A (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*); (* $p < 0,05$).

Entretanto, nos animais A/j as elevações das quantidades de IL-17A não foram significativas entre os grupos nos tempos analisados.

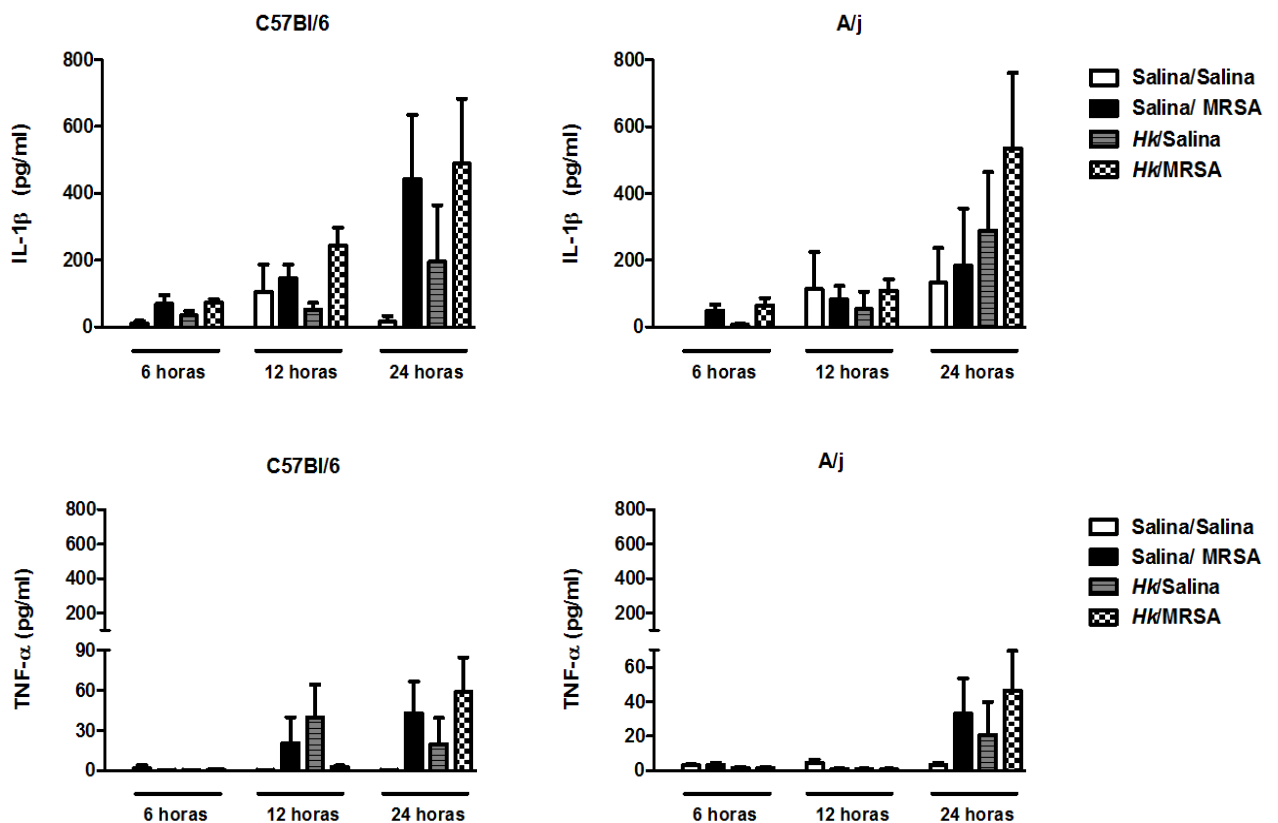


Figura 18: Quantificação de IL-1 β e TNF- α presentes no ambiente inflamatório (pg/ml)– Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão, baço e medula coletados e avaliados pela técnica de ELISA quanto a presença das citocinas IL-1 β e TNF- α (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).

A análise das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α pela mesma técnica demonstrou não haver diferenças entre os grupos, bem como entre as linhagens nos tempos analisados (Figura 18).

5.8. Animais imunizados e desafiados com *S. aureus* não apresentam alterações nas citocinas analisadas no lavado no bolsão de ar, medula e baço

Com o objetivo de avaliar se a imunização promove uma elevação das principais citocinas após o desafio, as amostras obtidas do lavado, medula e do

baço foram analisadas pela técnica de ELISA para a quantificação destas citocinas. Sendo assim, foi possível perceber que mesmo após o desafio com a bactéria, não ocorreram alterações significativas destas citocinas nestes sítios corpóreos (Figura 19).

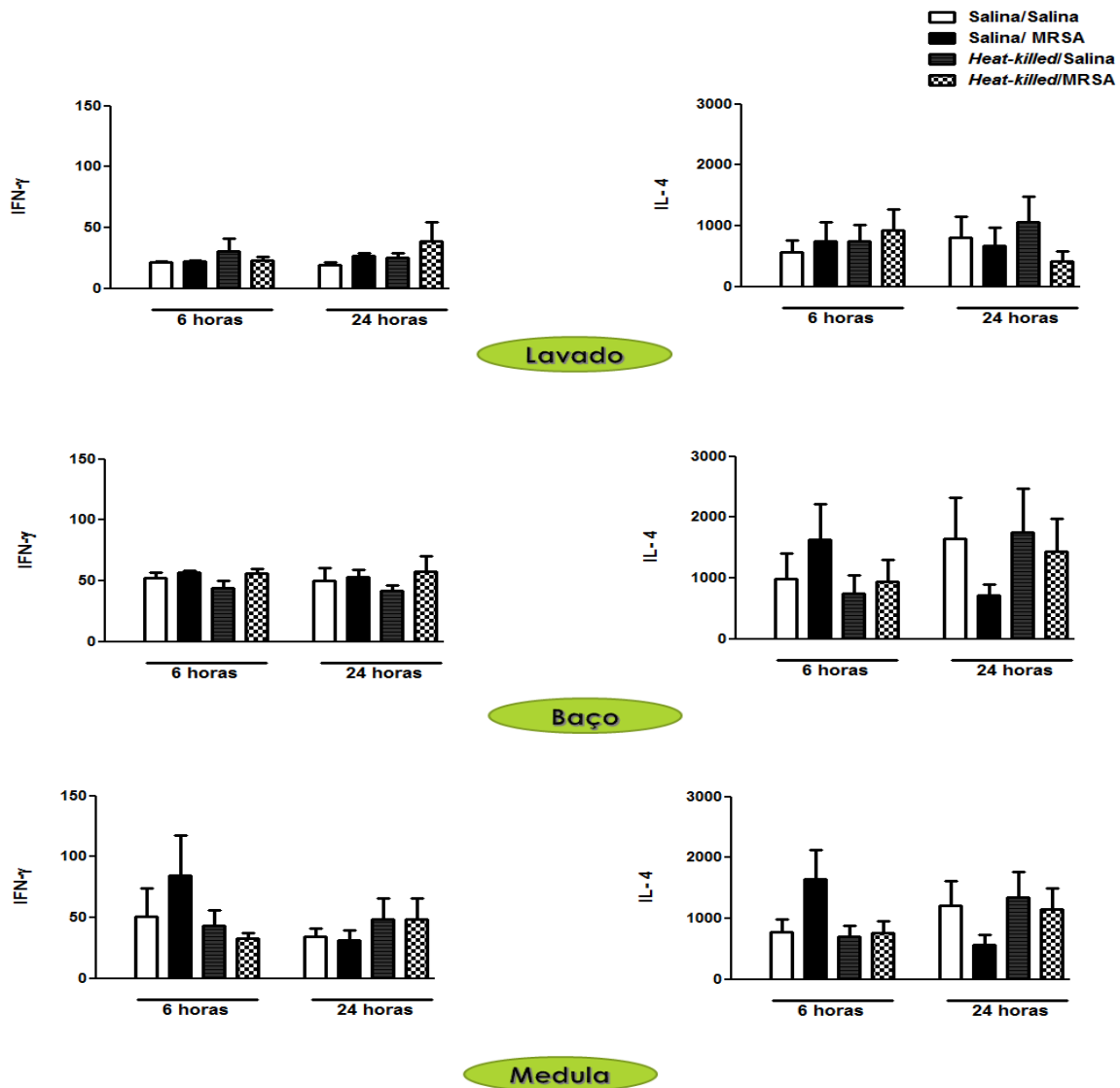


Figura 19: Quantificação de citocinas em diferentes sítios corpóreos no camundongo C57Bl/6 (pg/ml) – Camundongos C57Bl/6 previamente imunizados com 10^6 de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) inativadas por calor, foram desafiados no bolsão de ar com a quantidade de 10^7 UFC de amostras MRSA vivas. Após o desafio, os animais foram eutanasiados nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Os animais tiveram o lavado do bolsão, baço e medula coletados e avaliados pela técnica de ELISA quanto a presença das citocinas IFN- γ e IL-4 (n=6); (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; HK = *Heat Killed*);(*p<0,05).

6. DISCUSSÃO

Em processos infecciosos, a geração de uma resposta protetora adequada é o principal aspecto que irá distinguir se o hospedeiro irá progredir para cura ou desenvolver a doença. A busca por uma imunidade protetora contra *S. aureus* vem sendo amplamente estudada, desta forma, o presente trabalho mostrou uma correlação entre a produção de anticorpos IgG e a redução da carga bacteriana em um modelo murino de imunização intradérmica. A menor carga bacteriana nos animais imunizados se correlacionou, também, com uma menor inflamação no sítio de infecção e uma maior produção local de IL-17A.

Inicialmente, a imunização dos camundongos se deu com a bactéria resistente a meticilina, devido as maiores chances dessa cepa em produzir fatores de virulência em maiores proporções (GORDON; LOWY, 2008). Além disso, a patogenicidade, bem como, a produção de fatores de virulência já são amplamente descritos em cepas resistentes a antibióticos (OTTO, 2012). No presente estudo, utilizamos a bactéria inteira, sendo este fato mais próximo da realidade das infecções. No entanto, muitas vezes em processos inflamatórios não necessariamente a bactéria esteja presente, mas sim determinadas toxinas por ela produzidas (FREES; SORENSEN; INGMER, 2005; VELAZQUEZ-MEZA, 2005).

Quando analisado o perfil de leucócitos no sangue periférico não encontramos diferenças quanto ao total de leucócitos. No entanto, os neutrófilos estão entre os principais tipos celulares que se elevam na corrente sanguínea após uma infecção bacteriana (MEKONTSO-DESSAP et al., 2005; MEHRZAD; DUCHATEAU; BURVENICH, 2009; CHO et al., 2012). Diferentes trabalhos com *S. aureus* mostram a elevação de neutrófilos no sangue periférico após o desafio (HERMANN et al., 1990; FOWLER et al., 2005; RIGBY; DELEO, 2012). Estes trabalhos apresentam vários sítios corpóreos que foram utilizados para o desafio (ASAI et al., 2010; CHO et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2013).

Diversos fatores podem levar a neutrofilia, como a liberação de adrenalina durante o estresse de manipulação (PARKS; DAVIS, 2012). Contudo, nossos grupos controles não mostraram neutrofilia significativa nos diferentes tempos analisados e quanto a isso, não foram observadas diferenças entre as linhagens. Na literatura, buscou-se os dados hematológicos das linhagens, sob condições normais (HARRISON, S. D., JR. et al., 1978).

Tais dados, nos permitiram avaliar se nossos animais estavam com seus padrões hematológicos dentro da normalidade. Nossos dados são próximos, ressaltando que a indução do bolsão gera um estresse no animal, com consequente liberação de catecolaminas e cortisol, levando a leucocitose. Além disso, o número de animais usados nos grupos é menor quando comparados a trabalhos com estudos hematológicos (HARRISON, S. D., JR. et al., 1978; BENSCHOP; RODRIGUEZ-FEUERHAHN; SCHEDLOWSKI, 1996).

Ademais, quando comparadas as duas linhagens quanto ao perfil de leucócitos no sangue periférico, foi observado que animais B6 imunizados apresentaram uma maior elevação celular nas horas avaliadas. Diferentes trabalhos descrevem a importância de uma resposta inicial rápida, com elevações celulares, principalmente em infecções bacterianas onde esses agentes colonizam o tecido rapidamente (PHILLIPS et al., 1978; MURPHY et al., 2014).

Mecanismos envolvidos na sinalização podem estar relacionados nessa diferença no recrutamento celular. Sobretudo quando observamos na literatura trabalhos que descrevem a presença dos componentes do sistema complemento, C3a e C5a, onde os animais A/j apresentam deficiência no complemento (DROMER et al., 1989; GERARD; GERARD, 1994a). Logo, processos iniciais podem estar comprometidos diante da falta desses componentes o que pode influenciar em um retardo no recrutamento de células para o sítio inflamatório.

Porém, elevações das populações celulares na corrente sanguínea podem ser influenciadas por muitos fatores, podendo não necessariamente está relacionado ao desafio bacteriano. Além do mais, no presente estudo, correlacionamos a redução da carga bacteriana com a concentração sérica de anticorpos IgG. Nossos dados reafirmam em um modelo de imunização diferente a importância da imunidade humoral no controle de uma infecção bacteriana extracelular assim como tem sido apontado por outros autores (FENG et al., 2013).

Animais da linhagem C57Bl/6 apresentaram elevações nos títulos de IgG2a no soro, entretanto, o mesmo não ocorreu com a linhagem A/j. Em modelos de estudos, a imunidade protetora contra microrganismos extracelulares *gram* positivos é influenciada, sobretudo, por opsonização e fagocitose com participação dos anticorpos específicos para os polissacarídeos presentes na cápsula e tem sido uma excelente forma de obter proteção pós desafio (JUNG et al., 2012).

Anticorpos da classe IgG2a são fundamentais na resposta contra *S. aureus*. Diferentes autores descrevem a participação deste anticorpo na imunidade contra este patógeno. O fato de que o grupo C57Bl/6 imunizados tiveram proteção e diminuição nas cargas bacterianas no ambiente inflamatório, pode estar relacionado a obtenção de anticorpos proporcionada pelas imunizações (WOODY et al., 1998; JUNG et al., 2012; FENG et al., 2013).

Essa correlação é importante, pois diferentes trabalhos descrevem insucessos após a tentativa de desenvolver imunizações contra *S. aureus* (PROCTOR, 2012; FOWLER; PROCTOR, 2014). Parte disso, está ligado ao fato desta bactéria fazer parte da microbiota normal de seres humanos e, desta forma, este microrganismo desenvolveu diferentes mecanismos de evasão contra a resposta imune (ROOIJAKKERS; VAN KESSEL; VAN STRIJP, 2005; RIVAS et al., 2007).

Além disso, existem diferenças marcantes entre as cepas de *S. aureus*, o que influencia diretamente o tipo de resposta inflamatória contra este patógeno e dificulta o entendimento dos processos inflamatórios contra essa bactéria (SCHAUDER; BASSLER, 2001; INOUE et al., 2013). Trabalhos relatam que são bem diversas as respostas inflamatórias em relação a produção de anticorpos anti-*S. aureus* (VERKAIK et al., 2010). Tal fato, é uma barreira para a padronização no entendimento da resposta imune mediada por anticorpos frente a este microrganismo.

Títulos elevados de IgG2a são importantes elementos contra estruturas bacterianas como os polissacarídeos capsulares e ácidos teicóicos e lipoteicóicos (JUNG et al., 2012). As diferenças encontradas entre as linhagens na produção de anticorpos e na proteção, pode estar correlacionada na interação que ocorre entre anticorpos da classe IgG com proteínas do sistema complemento (DROMER et al., 1989).

Por exemplo, IgG1 pode se ligar ao C1q e ativar a via clássica do complemento, conduzindo a opsonização e fagocitose da bactéria mediada por polimorfonucleares (BINDON et al., 1988; IDUSOGIE et al., 2000; MICHAELSEN et al., 2006). A linhagem de camundongos A/j apresenta deficiência no sistema complemento, fato que pode explicar o porquê da não proteção observada nestes animais após o desafio. Porém, a especificidade dessa informação deve ser melhor avaliada com a quantificação de proteínas do sistema complemento, dentre outras

avaliações. Trabalhos com outros patógenos apontam a importância da interação de anticorpos IgG com componentes do sistema complemento como o C5. Tal interação provoca melhora na opsonização, bem como, um melhor direcionamento dos processos inflamatórios (DROMER et al., 1989).

Na literatura, já é bem descrito que o modelo A/j apresenta deficiência no C5 do complemento (GERARD; GERARD, 1994a; MULLICK et al., 2006). Na deficiência do complemento, a interação anticorpos-complemento está prejudicada e o animal A/j fica mais suscetível a infecções bacterianas, devido a falta do C5 (HOMANN et al., 1997; AHN et al., 2010).

O sistema complemento é composto por várias proteínas, sendo o C5 uma delas, trata-se de uma proteína solúvel, formada basicamente por duas cadeias α e β , unidas entre si por uma ponte dissulfeto, estando o seu gene localizado no cromossomo 2 murino. Alguns autores trazem diferenças entre a expressão dessa proteína em modelos murinos, como por exemplo, duas variantes alélicas desse gene, sendo uma delas responsável pela ausência de C5 no soro das linhagens A/j (D'EUSTACHIO et al., 1986).

De acordo com WETSEL; FLEISCHER; HAVILAND, 1990, a incapacidade do camundongo A/j de sintetizar C5 era causada por uma deleção de dois pares de base (Timina e Adenina) no éxon 7 do gene referente a expressão dessa proteína. Sendo assim, ocorre a formação de um códon de parada prematuro que impede a tradução do RNA mensageiro em uma proteína C5 funcional (WETSEL; FLEISCHER; HAVILAND, 1990; HAVILAND et al., 1991). O sistema complemento é um fator fundamental no combate a infecções por *S. aureus*.

Entre os mecanismos de virulência deste patógeno, estão os que visam inibir as proteínas do complemento. Na literatura, estão descritos trabalhos que avaliaram a inibição do sistema complemento por proteínas liberadas por *S. aureus* (LANGLEY et al., 2005). Em um deles, a proteína SSL7 liberada por esse patógeno, promoveu a inibição do C5, bem como sua conversão em C5a pela C5 convertase, além da inibição de anticorpos, como o IgA que também interage com o complemento (LAURSEN et al., 2010).

Após a conversão do C5, são formadas duas proteínas C5a e C5b. Esta última, é o maior fragmento sendo descrito como uma molécula com capacidade quimiotática, o outro fragmento, C5a, é relatado que desempenha diversas funções no organismo, participando da resposta imune através do aumento da síntese de

moléculas de adesão por células endoteliais, atração de leucócitos circulantes para o sítio inflamatório, elevação da capacidade de eliminação de partículas fagocitadas por neutrófilos e macrófagos, dentre outros (MANTHEY et al., 2009).

Já é bem descrito a capacidade bloqueadora dessas proteínas por *S. aureus*, mas além de bloquear diretamente os componentes produzidos, este patógeno pode bloquear as estruturas que convertem essas proteínas do complemento (JONGERIUS et al., 2007). Todos esses dados, reforçam a vulnerabilidade que a linhagem deficiente de complemento apresenta quando desafiada com este coco.

Outro fato é a capacidade de expressão no neutrófilo quando estimulado de receptores para C3 e C5, pertencentes a família de GPCRs (receptores acoplados a proteína G) (VAN KESSEL; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014). PMN expressam um grande número de GPCRs no momento da defesa do organismo, eles podem detectar peptídeos bacterianos, toxinas, quimiocinas, entre outros (LATTIN et al., 2007; SUN; YE, 2012). Quando ativados por proteínas do complemento, esses receptores aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio intracelular, além de promover um aumento na fagocitose (MOLLNES et al., 2002; VAN KESSEL; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014).

Animais deficientes de C5 apresentam um menor recrutamento neutrófilos para o sítio inflamatório, possivelmente, devido à falta da interação proteína-receptor (SNYDERMAN; PHILLIPS; MERGENHAGEN, 1971). Quando incubados neutrófilos obtidos de camundongos deficientes de C5 com o soro de outra linhagem detentora dessa proteína, foi percebido um aumento na quimiotaxia dessas células *in vitro* (MARDER et al., 1985).

Essa proteína tem sua ação por estímulos em receptores específicos, entre eles, temos o C5aR e C5L2, porém, este último não permanece acoplado a nenhuma proteína G, além do mais, ainda não está elucidado o seu mecanismo de ação e sua função biológica (GAO et al., 2005). Contudo, outros estudos mostram que animais deficientes de C5L2 têm uma resposta reduzida a determinados estímulos inflamatórios (CHEN et al., 2007).

Essa interação entre complemento e anticorpos é fundamental para a resposta inflamatória contra *S. aureus*, sobretudo porque individualmente, esses componentes podem não ser eficazes na defesa contra esse patógeno. Uma vez que, bactérias gram-positivas e microrganismos encapsulados geralmente são resistentes a essa atividade do MAC. Porém, em animais previamente

sensibilizados, o controle da infecção ocorre de maneira mais inicial e direcionada ao patógeno, algo que pode dificultar a expressão de mecanismos de evasão.

A deficiência do componente C5 é pouco descrita, sabe-se que o componente C5a liga-se ao receptor C5a-R que pertence à família das proteínas G, para ativação da proteína quinase C (PKC). As PKCs ativadas fosforilam a proteína p47-phox, iniciando a cascata do complexo phox nos fagossomos. Logo, sem estes fatores, ocorre uma redução na função dos fagócitos (GERARD; HUGLI, 1981; GERARD; GERARD, 1994b; MOLLNES et al., 2002; DANIEL et al., 2006).

A redução de função desses fagócitos, como por exemplo macrófagos, está relacionada à menor produção de espécies reativas de oxigênio e deficiente ativação de NADPH oxidase, havendo pouca geração de íon superóxido e de outros subprodutos bactericidas (DANIEL et al., 2006).

S. aureus possui cápsula e necessita ser revestido por complemento para ser fagocitado pelas células inflamatórias (CUNNION; LEE; FRANK, 2001; CUNNION; FRANK, 2003). Contudo, um forma importante de defesa é extracelular, através de lise pelo complexo de ataque a membrana (MAC) mediada pelos componentes do complemento (SERRUTO et al., 2010). Na ausência destes fatores, como na deficiência de C5 no camundongo A/j, a formação do MAC pode ser prejudicada, acarretando uma maior susceptibilidade à infecções bacterianas (AHN et al., 2010).

Porém, autores trazem relatos que apenas o complemento sem a participação direta de anticorpos não é suficiente para provocar a depuração bacteriana de bactérias gram positivas, por neutrófilos e macrófagos (FRANK; JOINER; HAMMER, 1987; CHABOT-ROY et al., 2006). Desta forma, a proteção observada no animal B6 imunizado pode ser devido a uma atuação mútua do sistema complemento e anticorpos da classe IgG.

Corroborando ainda com esse dado, animais B6 não imunizados apresentam o sistema complemento e mesmo assim, não foi observada proteção nestes animais. Outros autores trazem relatos que a deficiência deste componentes no modelo A/j leva a uma resposta desregulada na produção de citocinas (MULLICK et al., 2004).

Camundongos B6 e A/j são amplamente estudados, sobretudo para investigar o controle genético da imunidade do hospedeiro a patógenos infecciosos. Em estudos com modelos de sepse, animais A/j apresentaram maior

susceptibilidade a infecções que o camundongo B6, especialmente durante a fase aguda de infecção (DOMINGUEZ-PUNARO MDE et al., 2008).

Além de todos esses fatores citados, desde a década de 70 que autores já descrevem que o componente C5 é fundamental para a atração de leucócitos para o sítio de inflamação (SNYDERMAN; PHILLIPS; MERGENHAGEN, 1971; WARD; ZVAIFLER, 1971). Neste estudo, foi observado que animais A/j apresentaram um menor recrutamento celular para o bolsão de ar nos tempos iniciais após uma infecção por *S. aureus*. Componentes presentes na superfície bacteriana como o fator de aglomeração A, a proteína A e o polissacarídeo capsular já são descritos na literatura por dificultarem o reconhecimento pelas opsoninas na superfície da bactéria (FOSTER, 2009).

A opsonização e fagocitose são passos iniciais para a captura da bactéria pelos fagócitos com ativação da cascata do complemento (KUROKAWA et al., 2013). Neste estudo, as primeiras horas pós infecção foram avaliadas e foi observado já a presença desses anticorpos no lavado dos animais. Porém, após 24 horas, ocorreu uma redução dos títulos de IgG1 no lavado dos camundongos C57Bl/6, provavelmente por serem consumidos após a opsonização e fagocitose, dado que fortalece ainda mais a prerrogativa da ação destes anticorpos na proteção.

Neste ponto, nosso trabalho mostrou haver uma menor quantidade de neutrófilo no lavado dos animais C57Bl/6 imunizados nos tempos analisados, porém, como citado anteriormente, mesmo com uma menor quantidade de polimorfonucleares, estes animais tiveram uma maior depuração bacteriana. Isso é relevante, pois quanto maior a inflamação, maiores são os danos teciduais que a mesma pode causar ao hospedeiro (HENSON; JOHNSTON, 1987; MITTAL et al., 2014; WALLACH; KANG; KOVALENKO, 2014).

Logo, o recrutamento de células para o sítio infeccioso e sua ativação pode ser fundamental para o controle da carga bacteriana. Além disso, a imunização intradérmica foi capaz de conferir uma imunidade sistêmica frente ao fato do desafio ter ocorrido em um sítio corporal diferente da região da imunização. Anticorpos podem direcionar a resposta de neutrófilos, porém outros fatores tem forte impacto na atuação de polimorfonucleares, como por exemplo, células *Th17*.

Mesmo com os relatos que células *Th17* estejam relacionadas com a patogênese de várias auto-imunidades e doenças inflamatórias crônicas, como

encefalomielite, lúpus, esclerose múltipla, dentre outras, alguns autores destacam o papel promissor desse perfil celular na defesa contra microrganismos extracelulares (CURTIS; WAY, 2009; WAITE; SKOKOS, 2012). Autores avaliaram a participação benéfica proporcionada pela IL-17 em modelos de infecção cutânea (MILLER; CHO, 2011). Em outros sítios corpóreos, recentemente, em modelo de infecção pulmonar, foi observado que a exposição aos antígenos estafilocócicos, induziu respostas mediadas tanto por linfócitos *Th1* como *Th17*, além da migração de polimorfonucleares, causando inflamação pulmonar (KIM, M. R. et al., 2012).

Dentre os locais onde *S. aureus* pode colonizar, as fossas nasais são o principal reservatório. Neste local, camundongos *knockout* para IL-17 foram incapazes de eliminar eficazmente *S. aureus*. Sendo assim, respostas imunes associadas à *Th17* podem ser alvos estratégicos para eliminar infecções persistentes em seres humanos (ARCHER; HARRO; SHIRTLIFF, 2013).

Muitos trabalhos têm descrito que esta citocina é produzida por linfócitos T, porém, a maior parte deste componente em processos inflamatórios é secretada por células da imunidade inata (CUA; TATO, 2010). A liberação de IL-17A por neutrófilos tem sido descrita por diferentes autores (LEY; SMITH; STARK, 2006; WERNER et al., 2011). Camundongos deficientes em IL-17A ou IL-17F se mostraram susceptíveis a infecções de pele causadas por bactérias gram-positivas, como *S. aureus* (CYPOWYJ et al., 2012). No mesmo estudo, foi demonstrado que a administração de anticorpos neutralizantes de IL-17A foi correlacionada com menor formação de abscessos intra-abdominais, prejuízos na defesa sistêmica e infecções bacterianas exacerbadas (CYPOWYJ et al., 2012).

Corroborando com autores que ressaltaram o papel da IL-17A na proteção contra infecções por *S. aureus*, nossos resultados apresentaram elevações dessas citocinas em animais B6 imunizados 24 horas após o desafio. Destacando dessa forma, que o direcionamento da resposta inflamatória promovida pela imunização foi importante para a proteção nesses animais. Autores relatam que a exposição prévia levou a proteção de camundongos e com elevações quantitativas de IL-17 (JOSHI et al., 2012).

Neste trabalho, avaliamos a resposta inflamatória nas primeiras horas após o desafio, com o tempo de no máximo 24 horas. Neste aspecto, os trabalhos são pouco conclusivos com relação ao desfecho da infecção, já que alguns autores trazem que nas primeiras horas IL-17 já começaria a agir, porém, outros avaliam

um período maior de tempo para a atuação desta citocina (CHO et al., 2010; ARCHER; HARRO; SHIRTLIFF, 2013).

Com outros patógenos, estudos anteriores também mostraram que o eixo de citocinas relacionadas com o padrão *Th17* desempenha um papel protetor, como por exemplo, atuando na proteção contra as infecções bacterianas e fúngicas por *Micobacterium tuberculosis* e *Pneumocystis jiroveci* (RUDNER et al., 2007; MONIN et al., 2015).

Poucos são os relatos que abordam a importância de citocinas deste perfil após processos infecciosos por *S. aureus*. Desta forma, este trabalho apresenta mais um dado para a construção do melhor mecanismo de proteção bem como resposta imune em infecções causadas mundialmente por este coco. Porém, mais trabalhos devem ser realizados na busca pelo esclarecimento pleno da atuação de células *Th17* na infecção por *S. aureus*.

No acompanhamento nos animais, não foi observado em nenhum deles a formação de abscessos durante as imunizações. A via intradérmica utilizada é descrita como uma das melhores vias para a indução de uma imunidade adaptativa contra o patógeno estudado, principalmente por não levar a indução de tolerância e por representar de maneira mais fiel fatos que ocorrem nos seres humanos (TAKAHASHI et al., 2013). Uma vez que *S. aureus* promove grande parte das suas infecções no ambiente intradérmico. Na pele, modelos de imunização com *S. aureus*, resultaram em redução do tamanho da lesão e presença de intenso infiltrado neutrofílico quando os animais foram desafiados. A magnitude do infiltrado tem sido correlacionada com um aumento na produção de citocinas, como IL-17 e quimiocinas relacionadas com a quimiotaxia de polimorfonucleares (TKACZYK et al., 2013).

A dose do antígeno, a via e o esquema de imunização, são fatores atuantes na indução da resposta imune. As vias de inoculação subcutânea, intradérmica e intramuscular levam geralmente os imunógenos para os nódulos linfáticos regionais, e, mais frequentemente, induzem a imunidade celular.

Neste estudo, usamos a via intradérmica sobretudo por terem uma população de células dendríticas nessa região sendo apresentadoras de antígenos eficazes e assim, apresentam papel fundamental na determinação da resposta imune (CLAUSEN; KEL, 2010). Células apresentadoras de antígenos durante seu processo de migração passam por processos de maturação celular e desenvolvem

propriedades potentes para o estímulo celular, sobretudo MCH II para células T *naïves* levando a processos de diferenciação celular em linfócitos. Esse processo, foi reforçado neste estudo, uma vez que usamos 3 imunizações em intervalos de 14 dias.

Assim, quando chegam ao linfonodo drenante as células dendríticas já estão em um fenótipo maduro, capaz de levar a ativação de linfócitos e assim iniciar uma resposta imune eficiente especialmente adaptada a combater patógenos. A partir da análise dos dados literários, é possível correlacionar a participação dessas células em infecções causadas por gram positivas, uma vez que vários autores descrevem a capacidade dessas células em montar uma resposta eficaz com *S. aureus* (DAI; GRAMMER; STREILEIN, 1993; WU; XU, 2014).

Trabalhos que utilizaram a mesma rota de imunização que o nosso obtiveram resultados promissores. Além disso, no nosso trabalho foram utilizadas doses relativamente baixas de estímulo quando comparadas as usadas por outros autores (CHO et al., 2012).

O modelo de bolsão inflamatório propiciou a observação de citocinas, anticorpos, bem como células presentes nos tempos analisados nos animais imunizados e infectados. Por ser de realização e análise simples, este modelo de estudo se torna importante pela fácil obtenção de material biológico para análise por diversas técnicas. Desta forma, permite uma análise mais precisa do que ocorre no ambiente da inflamação.

Em relação as outras citocinas analisadas até então, não foram encontradas diferenças entre os grupos estudados, quando analisamos sistemicamente, este fato pode estar relacionado ao tempo que analisamos. Neste tempo, possivelmente, atuação de quimiocinas seria um fator marcante. Porém, em modelos de imunização do *S. aureus* citocinas como IFN- γ não tiveram elevações quantitativas importantes, porém, esses dados são controversos, necessitando de mais estudos para elucidação do papel desta citocina após a imunização (MURPHY et al., 2014).

Desta forma, este estudo traz importantes informações que vão permitir fornecer a literatura mais um dado para a complexa elucidação da resposta inflamatória contra *S. aureus*. Porém, mais trabalhos devem ser realizados no intuito de colaborar com mais fatos para o total esclarecimento da resposta do hospedeiro contra este patógeno.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a imunização intradérmica com *S. aureus* promove proteção em camundongos C57Bl/6, com a redução da carga bacteriana correlacionando-se com aumento da concentração sérica de anticorpos IgG. Além disso, também foi observado uma menor inflamação no sítio de infecção e uma maior produção local de IL-17A. Contudo, no outro modelo animal utilizado, A/J, não foram encontrados resultados semelhantes, o que culminou com a não proteção nesta linhagem. A análise literária permite pressupor que neste modelo animal, a deficiência do componente do complemento, C5, esteja relacionada com a não interação dessas proteínas com anticorpos, diminuição da opsonização e fagocitose além da redução da quimiotaxia de polimorfonucleares. E, por fim, esta linhagem de camundongos não apresentou uma produção significativa de IL-17A no ambiente inflamatório. O entendimento da resposta protetora contra a infecção por *S. aureus* é a chave para o desenvolvimento racional de uma imunoprevenção, sendo assim, mais trabalhos devem ser realizados no intuito do esclarecimento da imunidade contra este patógeno.

8. REFERÊNCIAS

ADHIKARI, R. P.; KARAUZUM, H.; SARWAR, J.; ABAANDOU, L.; MAHMOUDIEH, M.; BOROUN, A. R.; VU, H.; NGUYEN, T.; DEVI, V. S.; SHULENIN, S.; WARFIELD, K. L.; AMAN, M. J. Novel structurally designed vaccine for *S. aureus* alpha-hemolysin: protection against bacteremia and pneumonia. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38567, 2012.

AHN, S. H.; DESHMUKH, H.; JOHNSON, N.; COWELL, L. G.; RUDE, T. H.; SCOTT, W. K.; NELSON, C. L.; ZAAS, A. K.; MARCHUK, D. A.; KEUM, S.; LAMLERTTHON, S.; SHARMA-KUINKEL, B. K.; SEMPOWSKI, G. D.; FOWLER, V. G., JR. Two genes on A/J chromosome 18 are associated with susceptibility to *Staphylococcus aureus* infection by combined microarray and QTL analyses. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 9, p. e1001088, 2010.

AHOYO, T.; MARTIN-ODOOM, A.; BANKOLE, H. S.; BABA-MOUSSA, L.; ZONON, N.; LOKO, F.; PREVOST, G.; SANNI, A.; DRAMANE, K. Epidemiology and Prevention of Nosocomial Pneumonia Associated with Panton-Valentine Leukocidin (PVL) Producing *Staphylococcus Aureus* in Departmental Hospital Centre of Zou Collines in Benin. **Ghana Med J**, v. 46, n. 4, p. 234-240, 2012.

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Prevention strategies for methicillin-resistant *S taphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **Braz J Infect Dis**, v. 14 Suppl 2, n., p. S107-118, 2010.

ARCHER, N. K.; HARRO, J. M.; SHIRTLIFF, M. E. Clearance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage is T cell dependent and mediated through interleukin-17A expression and neutrophil influx. **Infect Immun**, v. 81, n. 6, p. 2070-2075, 2013.

ARLIAN, B. M.; TINKER, J. K. Mucosal immunization with a *Staphylococcus aureus* IsdA-cholera toxin A2/B chimera induces antigen-specific Th2-type responses in mice. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 9, p. 1543-1551, 2011.

ASAI, A.; TSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; HANAFUSA, T.; HERNDON, D. N.; SUZUKI, F. Pathogenic role of macrophages in intradermal infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in thermally injured mice. **Infect Immun**, v. 78, n. 10, p. 4311-4319, 2010.

BEKEREDJIAN-DING, I.; INAMURA, S.; GIESE, T.; MOLL, H.; ENDRES, S.; SING, A.; ZHRINGER, U.; HARTMANN, G. *Staphylococcus aureus* protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 2803-2812, 2007.

BENSCHOP, R. J.; RODRIGUEZ-FEUERHAHN, M.; SCHEDLOWSKI, M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. **Brain Behav Immun**, v. 10, n. 2, p. 77-91, 1996.

BESTEBROER, J.; DE HAAS, C. J.; VAN STRIJP, J. A. How microorganisms avoid phagocyte attraction. **FEMS Microbiol Rev**, v. 34, n. 3, p. 395-414, 2010.

BINDON, C. I.; HALE, G.; BRUGGEMANN, M.; WALDMANN, H. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. **J Exp Med**, v. 168, n. 1, p. 127-142, 1988.

CHABOT-ROY, G.; WILLSON, P.; SEGURA, M.; LACOUTURE, S.; GOTTSCHALK, M. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. **Microb Pathog**, v. 41, n. 1, p. 21-32, 2006.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 9, p. 629-641, 2009.

CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 738-749, 2011.

CHEN, N. J.; MIRTSOS, C.; SUH, D.; LU, Y. C.; LIN, W. J.; MCKERLIE, C.; LEE, T.; BARIBAULT, H.; TIAN, H.; YEH, W. C. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 203-207, 2007.

CHO, J. S.; PIETRAS, E. M.; GARCIA, N. C.; RAMOS, R. I.; FARZAM, D. M.; MONROE, H. R.; MAGORIEN, J. E.; BLAUVELT, A.; KOLLS, J. K.; CHEUNG, A. L.; CHENG, G.; MODLIN, R. L.; MILLER, L. S. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1762-1773, 2010.

CHO, J. S.; GUO, Y.; RAMOS, R. I.; HEBRONI, F.; PLAISIER, S. B.; XUAN, C.; GRANICK, J. L.; MATSUSHIMA, H.; TAKASHIMA, A.; IWAKURA, Y.; CHEUNG, A. L.; CHENG, G.; LEE, D. J.; SIMON, S. I.; MILLER, L. S. Neutrophil-derived IL-1 β is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 11, p. e1003047, 2012.

CLAUSEN, B. E.; KEL, J. M. Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? **Immunol Cell Biol**, v. 88, n. 4, p. 351-360, 2010.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 7, p. 479-489, 2010.

CUNNION, K. M.; LEE, J. C.; FRANK, M. M. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun**, v. 69, n. 11, p. 6796-6803, 2001.

CUNNION, K. M.; FRANK, M. M. Complement activation influences *Staphylococcus aureus* adherence to endothelial cells. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1321-1327, 2003.

CURTIS, M. M.; WAY, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 177-185, 2009.

CYPOWYJ, S.; PICARD, C.; MARODI, L.; CASANOVA, J. L.; PUEL, A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 9, p. 2246-2254, 2012.

CZUPRYNSKI, C. J.; FAITH, N. G.; STEINBERG, H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. **Infect Immun**, v. 71, n. 2, p. 682-689, 2003.

D'EUSTACHIO, P.; KRISTENSEN, T.; WETSEL, R. A.; RIBLET, R.; TAYLOR, B. A.; TACK, B. F. Chromosomal location of the genes encoding complement components C5 and factor H in the mouse. **J Immunol**, v. 137, n. 12, p. 3990-3995, 1986.

DAI, R.; GRAMMER, S. F.; STREILEIN, J. W. Fresh and cultured Langerhans cells display differential capacities to activate hapten-specific T cells. **J Immunol**, v. 150, n. 1, p. 59-66, 1993.

DANIEL, D. S.; DAI, G.; SINGH, C. R.; LINDSEY, D. R.; SMITH, A. K.; DHANDAYUTHAPANI, S.; HUNTER, R. L., JR.; JAGANNATH, C. The reduced bactericidal function of complement C5-deficient murine macrophages is associated with defects in the synthesis and delivery of reactive oxygen radicals to mycobacterial phagosomes. **J Immunol**, v. 177, n. 7, p. 4688-4698, 2006.

DELEO, F. R.; DIEP, B. A.; OTTO, M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 23, n. 1, p. 17-34, 2009.

DENIS, F.; ALAIN, S.; PLOY, M. C. [New routes of administration: epidermal, transcutaneous mucosal ways of vaccination]. **Med Sci (Paris)**, v. 23, n. 4, p. 379-385, 2007.

DOMINGUEZ-PUNARO MDE, L.; SEGURA, M.; RADZIOCH, D.; RIVEST, S.; GOTTSCHALK, M. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse

strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 3901-3910, 2008.

DROMER, F.; PERRONNE, C.; BARGE, J.; VILDE, J. L.; YENI, P. Role of IgG and complement component C5 in the initial course of experimental cryptococcosis. **Clin Exp Immunol**, v. 78, n. 3, p. 412-417, 1989.

ECHANIZ-AVILES, I. G.; SOLORZANO-SANTOS, F. Meeting the challenge: prevention of pneumococcal disease with conjugate vaccines. **Salud Publica Mex**, v. 43, n. 4, p. 352-367, 2001.

EDWARDS, J. C.; SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. **J Pathol**, v. 134, n. 2, p. 147-156, 1981.

FENG, M. H.; CUI, J. C.; NAKANE, A.; HU, D. L. Vaccination with plasmid DNA encoding a mutant toxic shock syndrome toxin-1 ameliorates toxin-induced lethal shock in mice. **Tohoku J Exp Med**, v. 231, n. 1, p. 1-8, 2013.

FINELLI, L.; MILLER, J. T.; TOKARS, J. I.; ALTER, M. J.; ARDUINO, M. J. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 2002. **Semin Dial**, v. 18, n. 1, p. 52-61, 2005.

FINLAY, B. B.; MCFADDEN, G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 767-782, 2006.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Vet Dermatol**, v. 20, n. 5-6, p. 456-470, 2009.

FOWLER, V. G., JR.; MIRO, J. M.; HOEN, B.; CABELL, C. H.; ABRUTYN, E.; RUBINSTEIN, E.; COREY, G. R.; SPELMAN, D.; BRADLEY, S. F.; BARSIC, B.; PAPPAS, P. A.; ANSTROM, K. J.; WRAY, D.; FORTES, C. Q.; ANGUERA, I.; ATHAN, E.; JONES, P.; VAN DER MEER, J. T.; ELLIOTT, T. S.; LEVINE, D. P.; BAYER, A. S. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. **JAMA**, v. 293, n. 24, p. 3012-3021, 2005.

FOWLER, V. G., JR.; PROCTOR, R. A. Where does a *Staphylococcus aureus* vaccine stand? **Clin Microbiol Infect**, v. 20 Suppl 5, n., p. 66-75, 2014.

FRANK, M. M.; JOINER, K.; HAMMER, C. The function of antibody and complement in the lysis of bacteria. **Rev Infect Dis**, v. 9 Suppl 5, n., p. S537-545, 1987.

FREES, D.; SORENSEN, K.; INGMER, H. Global virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: pinpointing the roles of ClpP and ClpX in the sar/agr regulatory network. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 8100-8108, 2005.

FRIMODT-MOLLER, N.; ESPERSEN, F.; SKINHOJ, P.; ROSDAHL, V. T. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in Denmark from 1957 to 1990. **Clin Microbiol Infect**, v. 3, n. 3, p. 297-305, 1997.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GAO, H.; NEFF, T. A.; GUO, R. F.; SPEYER, C. L.; SARMA, J. V.; TOMLINS, S.; MAN, Y.; RIEDEMANN, N. C.; HOESEL, L. M.; YOUNKIN, E.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. **FASEB J**, v. 19, n. 8, p. 1003-1005, 2005.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; PA, D. A. [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination]. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GERARD, C.; HUGLI, T. E. C5a: a mediator of chemotaxis and cellular release reactions. **Kroc Found Ser**, v. 14, n., p. 147-160, 1981.

GERARD, C.; GERARD, N. P. C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 12, n., p. 775-808, 1994a.

GERARD, C.; GERARD, N. P. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. **Curr Opin Immunol**, v. 6, n. 1, p. 140-145, 1994b.

GOMES, A. R.; WESTH, H.; DE LENCASTRE, H. Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 10, p. 3237-3244, 2006.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clin Infect Dis**, v. 46 Suppl 5, n., p. S350-359, 2008.

HARRISON, C. J. Innate immunity as a key element in host defense against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Minerva Pediatr**, v. 61, n. 5, p. 503-514, 2009.

HARRISON, S. D., JR.; BURDESHAW, J. A.; CROSBY, R. G.; CUSIC, A. M.; DENINE, E. P. Hematology and clinical chemistry reference values for C57BL/6 X DBA/2 F1 mice. **Cancer Res**, v. 38, n. 8, p. 2636-2639, 1978.

HAVILAND, D. L.; HAVILAND, J. C.; FLEISCHER, D. T.; WETSEL, R. A. Structure of the murine fifth complement component (C5) gene. A large, highly interrupted gene with a variant donor splice site and organizational homology with the third and fourth complement component genes. **J Biol Chem**, v. 266, n. 18, p. 11818-11825, 1991.

HENSON, P. M.; JOHNSTON, R. B., JR. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. **J Clin Invest**, v. 79, n. 3, p. 669-674, 1987.

HERMANN, M.; JACONI, M. E.; DAHLGREN, C.; WALDVOGEL, F. A.; STENDAHL, O.; LEW, D. P. Neutrophil bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* adherent on biological surfaces. Surface-bound extracellular matrix proteins activate intracellular killing by oxygen-dependent and -independent mechanisms. **J Clin Invest**, v. 86, n. 3, p. 942-951, 1990.

HIDRON, A. I.; KEMPKER, R.; MOANNA, A.; RIMLAND, D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. **Infect Drug Resist**, v. 3, n., p. 73-86, 2010.

HOEN, B.; ALLA, F.; SELTON-SUTY, C.; BEGUINOT, I.; BOUVET, A.; BRIANCON, S.; CASALTA, J. P.; DANCHIN, N.; DELAHAYE, F.; ETIENNE, J.; LE MOING, V.; LEPORT, C.; MAINARDI, J. L.; RUIMY, R.; VANDENESCH, F. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. **JAMA**, v. 288, n. 1, p. 75-81, 2002.

HOMANN, C.; VARMING, K.; HOGASEN, K.; MOLLNES, T. E.; GRAUDAL, N.; THOMSEN, A. C.; GARRED, P. Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality. **Gut**, v. 40, n. 4, p. 544-549, 1997.

IDUSOGIE, E. E.; PRESTA, L. G.; GAZZANO-SANTORO, H.; TOTPAL, K.; WONG, P. Y.; ULTSCH, M.; MENG, Y. G.; MULKERRIN, M. G. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. **J Immunol**, v. 164, n. 8, p. 4178-4184, 2000.

INOUE, S.; MORIYAMA, T.; HORINOUCHE, Y.; TACHIBANA, T.; OKADA, F.; MARUO, K.; YOSHIYA, S. Comparison of clinical features and outcomes of *staphylococcus aureus* vertebral osteomyelitis caused by methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 283, 2013.

JENSEN, A. G.; ESPERSEN, F.; SKINHOJ, P.; ROSDAHL, V. T.; FRIMODT-MOLLER, N. Staphylococcus aureus meningitis. A review of 104 nationwide, consecutive cases. **Arch Intern Med**, v. 153, n. 16, p. 1902-1908, 1993.

JONGERIUS, I.; KOHL, J.; PANDEY, M. K.; RUYKEN, M.; VAN KESSEL, K. P.; VAN STRIJP, J. A.; ROOIJAKKERS, S. H. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. **J Exp Med**, v. 204, n. 10, p. 2461-2471, 2007.

JOSHI, A.; PANCARI, G.; COPE, L.; BOWMAN, E. P.; CUA, D.; PROCTOR, R. A.; MCNEELY, T. Immunization with Staphylococcus aureus iron regulated surface determinant B (IsdB) confers protection via Th17/IL17 pathway in a murine sepsis model. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 3, p. 336-346, 2012.

JUNG, D. J.; AN, J. H.; KUROKAWA, K.; JUNG, Y. C.; KIM, M. J.; AOYAGI, Y.; MATSUSHITA, M.; TAKAHASHI, S.; LEE, H. S.; TAKAHASHI, K.; LEE, B. L. Specific serum Ig recognizing staphylococcal wall teichoic acid induces complement-mediated opsonophagocytosis against Staphylococcus aureus. **J Immunol**, v. 189, n. 10, p. 4951-4959, 2012.

KIM, M. H.; GRANICK, J. L.; KWOK, C.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L.; CURRY, F. R.; MILLER, L. S.; SIMON, S. I. Neutrophil survival and c-kit(+)-progenitor proliferation in Staphylococcus aureus-infected skin wounds promote resolution. **Blood**, v. 117, n. 12, p. 3343-3352, 2011.

KIM, M. R.; HONG, S. W.; CHOI, E. B.; LEE, W. H.; KIM, Y. S.; JEON, S. G.; JANG, M. H.; GHO, Y. S.; KIM, Y. K. Staphylococcus aureus-derived extracellular vesicles induce neutrophilic pulmonary inflammation via both Th1 and Th17 cell responses. **Allergy**, v. 67, n. 10, p. 1271-1281, 2012.

KLOOS, W. E.; WOLFSHOHL, J. F. Identification of Staphylococcus species with the API STAPH-IDENT system. **J Clin Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 509-516, 1982.

KUROKAWA, K.; JUNG, D. J.; AN, J. H.; FUCHS, K.; JEON, Y. J.; KIM, N. H.; LI, X.; TATEISHI, K.; PARK, J. A.; XIA, G.; MATSUSHITA, M.; TAKAHASHI, K.; PARK, H. J.; PESCHEL, A.; LEE, B. L. Glycoepitopes of staphylococcal wall teichoic acid govern complement-mediated opsonophagocytosis via human serum antibody and mannose-binding lectin. **J Biol Chem**, v. 288, n. 43, p. 30956-30968, 2013.

LAARMAN, A. J.; MIJNHEER, G.; MOOTZ, J. M.; VAN ROOIJEN, W. J.; RUYKEN, M.; MALONE, C. L.; HEEZIUS, E. C.; WARD, R.; MILLIGAN, G.; VAN STRIJP, J. A.; DE HAAS, C. J.; HORSWILL, A. R.; VAN KESSEL, K. P.; ROOIJAKKERS, S. H. Staphylococcus aureus Staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis. **EMBO J**, v. 31, n. 17, p. 3607-3619, 2012.

LANGLEY, R.; WINES, B.; WILLOUGHBY, N.; BASU, I.; PROFT, T.; FRASER, J. D. The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria. **J Immunol**, v. 174, n. 5, p. 2926-2933, 2005.

LATTIN, J.; ZIDAR, D. A.; SCHRODER, K.; KELLIE, S.; HUME, D. A.; SWEET, M. J. G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 1, p. 16-32, 2007.

LAURSEN, N. S.; GORDON, N.; HERMANS, S.; LORENZ, N.; JACKSON, N.; WINES, B.; SPILLNER, E.; CHRISTENSEN, J. B.; JENSEN, M.; FREDSLUND, F.; BJERRE, M.; SOTTRUP-JENSEN, L.; FRASER, J. D.; ANDERSEN, G. R. Structural basis for inhibition of complement C5 by the SSL7 protein from *Staphylococcus aureus*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 8, p. 3681-3686, 2010.

LEY, K.; SMITH, E.; STARK, M. A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. **Immunol Res**, v. 34, n. 3, p. 229-242, 2006.

LIN, L.; IBRAHIM, A. S.; XU, X.; FARBER, J. M.; AVANESIAN, V.; BAQUIR, B.; FU, Y.; FRENCH, S. W.; EDWARDS, J. E., JR.; SPELLBERG, B. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 12, p. e1000703, 2009.

LIU, G. Y. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. **Pediatr Res**, v. 65, n. 5 Pt 2, p. 71R-77R, 2009.

LOWELL, G. H.; KAMINSKI, R. W.; GRATE, S.; HUNT, R. E.; CHARNEY, C.; ZIMMER, S.; COLLETON, C. Intranasal and intramuscular proteosome-staphylococcal enterotoxin B (SEB) toxoid vaccines: immunogenicity and efficacy against lethal SEB intoxication in mice. **Infect Immun**, v. 64, n. 5, p. 1706-1713, 1996.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **N Engl J Med**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MANTHEY, H. D.; WOODRUFF, T. M.; TAYLOR, S. M.; MONK, P. N. Complement component 5a (C5a). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 11, p. 2114-2117, 2009.

MARDER, S. R.; CHENOWETH, D. E.; GOLDSTEIN, I. M.; PEREZ, H. D. Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. **J Immunol**, v. 134, n. 5, p. 3325-3331, 1985.

MCGARRY, S. A.; ENGEMANN, J. J.; SCHMADER, K.; SEXTON, D. J.; KAYE, K. S. Surgical-site infection due to *Staphylococcus aureus* among elderly patients: mortality, duration of hospitalization, and cost. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 25, n. 6, p. 461-467, 2004.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation. **Vet Microbiol**, v. 134, n. 1-2, p. 106-112, 2009.

MEKONTSO-DESSAP, A.; HONORE, S.; KIRSCH, M.; PLONQUET, A.; FERNANDEZ, E.; TOUQUI, L.; FARCET, J. P.; SOUSSY, C. J.; LOISANCE, D.; DELCLAUX, C. Blood neutrophil bactericidal activity against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* during cardiac surgery. **Shock**, v. 24, n. 2, p. 109-113, 2005.

MENNE, E. N.; SONABEND, R. Y.; MASON, E. O.; LAMBERTH, L. B.; HAMMERMAN, W. A.; MINARD, C. G.; KAPLAN, S. L.; HULTEN, K. G. *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients with diabetes mellitus. **J Infect**, v. 65, n. 2, p. 135-141, 2012.

MICHAELSEN, T. E.; THOMMESEN, J. E.; IHLE, O.; GREGERS, T. F.; SANDIN, R. H.; BREKKE, O. H.; SANDLIE, I. A mutant human IgG molecule with only one C1q binding site can activate complement and induce lysis of target cells. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 1, p. 129-138, 2006.

MILLER, L. S.; CHO, J. S. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 505-518, 2011.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P.; MALIK, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014.

MOLLNES, T. E.; BREKKE, O. L.; FUNG, M.; FURE, H.; CHRISTIANSEN, D.; BERGSETH, G.; VIDEM, V.; LAPPEGARD, K. T.; KOHL, J.; LAMBRIS, J. D. Essential role of the C5a receptor in *E coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1869-1877, 2002.

MONIN, L.; GRIFFITHS, K. L.; SLIGHT, S.; LIN, Y.; RANGEL-MORENO, J.; KHADER, S. A. Immune requirements for protective Th17 recall responses to *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Mucosal Immunol**, v., n., p., 2015.

MONTGOMERY, C. P.; DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Host factors that contribute to recurrent staphylococcal skin infection. **Curr Opin Infect Dis**, v., n., p., 2015.

MULLICK, A.; ELIAS, M.; PICARD, S.; BOURGET, L.; JOVCEVSKI, O.; GAUTHIER, S.; TUIE, A.; HARAKIDAS, P.; BIHUN, C.; MASSIE, B.; GROS, P. Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in a C5-deficient mouse strain. **Infect Immun**, v. 72, n. 10, p. 5868-5876, 2004.

MULLICK, A.; LEON, Z.; MIN-OO, G.; BERGHOUT, J.; LO, R.; DANIELS, E.; GROS, P. Cardiac failure in C5-deficient A/J mice after *Candida albicans* infection. **Infect Immun**, v. 74, n. 8, p. 4439-4451, 2006.

MURPHY, A. G.; O'KEEFFE, K. M.; LALOR, S. J.; MAHER, B. M.; MILLS, K. H.; MCLOUGHLIN, R. M. *Staphylococcus aureus* infection of mice expands a population of memory gammadelta T cells that are protective against subsequent infection. **J Immunol**, v. 192, n. 8, p. 3697-3708, 2014.

NARITA, K.; HU, D. L.; MORI, F.; WAKABAYASHI, K.; IWAKURA, Y.; NAKANE, A. Role of interleukin-17A in cell-mediated protection against *Staphylococcus aureus* infection in mice immunized with the fibrinogen-binding domain of clumping factor A. **Infect Immun**, v. 78, n. 10, p. 4234-4242, 2010.

NGUYEN, Q. T.; NGUYEN, T. H.; JU, S. A.; LEE, Y. S.; HAN, S. H.; LEE, S. C.; KWON, B. S.; YU, R.; KIM, G. Y.; LEE, B. J.; KIM, B. S. CD137 expressed on neutrophils plays dual roles in antibacterial responses against Gram-positive and Gram-negative bacterial infections. **Infect Immun**, v. 81, n. 6, p. 2168-2177, 2013.

OCHOA, T. J.; MOHR, J.; WANGER, A.; MURPHY, J. R.; HERESI, G. P. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric patients. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 6, p. 966-968, 2005.

OTTO, M. MRSA virulence and spread. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 10, p. 1513-1521, 2012.

PARKS, K. R.; DAVIS, J. M. Epinephrine, cortisol, endotoxin, nutrition, and the neutrophil. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 13, n. 5, p. 300-306, 2012.

PHILLIPS, S. M.; REID, W. A.; DOUGHTY, B.; KHOURY, P. B. The cellular and humoral immune response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. V. Prerequisite mechanisms for the development of optimal protective immunity. **Cell Immunol**, v. 38, n. 2, p. 239-254, 1978.

POZZI, C.; WILK, K.; LEE, J. C.; GENING, M.; NIFANTIEV, N.; PIER, G. B. Opsonic and protective properties of antibodies raised to conjugate vaccines targeting six *Staphylococcus aureus* antigens. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46648, 2012.

PROCTOR, R. A. Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? **Vaccine**, v. 30, n. 19, p. 2921-2927, 2012.

PROJAN, S. J.; NESIN, M.; DUNMAN, P. M. Staphylococcal vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream? **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 5, p. 473-479, 2006.

RIGBY, K. M.; DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 237-259, 2012.

RIVAS, A. L.; SCHWAGER, S. J.; GONZALEZ, R. N.; QUIMBY, F. W.; ANDERSON, K. L. Multifactorial relationships between intramammary invasion by *Staphylococcus aureus* and bovine leukocyte markers. **Can J Vet Res**, v. 71, n. 2, p. 135-144, 2007.

ROOIJAKKERS, S. H.; VAN KESSEL, K. P.; VAN STRIJP, J. A. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 12, p. 596-601, 2005.

RUDNER, X. L.; HAPPEL, K. I.; YOUNG, E. A.; SHELLITO, J. E. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. **Infect Immun**, v. 75, n. 6, p. 3055-3061, 2007.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SCHAFFER, A. C.; SOLINGA, R. M.; COCCHIARO, J.; PORTOLES, M.; KISER, K. B.; RISLEY, A.; RANDALL, S. M.; VALTULINA, V.; SPEZIALE, P.; WALSH, E.; FOSTER, T.; LEE, J. C. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. **Infect Immun**, v. 74, n. 4, p. 2145-2153, 2006.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes Dev**, v. 15, n. 12, p. 1468-1480, 2001.

SCHENNINGS, T.; FARNEBO, F.; SZEKELY, L.; FLOCK, J. I. Protective immunization against *Staphylococcus aureus* infection in a novel experimental wound model in mice. **APMIS**, v. 120, n. 10, p. 786-793, 2012.

SENTHILKUMAR, A.; KUMAR, S.; SHEAGREN, J. N. Increased incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia in hospitalized patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 8, p. 1412-1416, 2001.

SEOK, J.; WARREN, H. S.; CUENCA, A. G.; MINDRINOS, M. N.; BAKER, H. V.; XU, W.; RICHARDS, D. R.; MCDONALD-SMITH, G. P.; GAO, H.; HENNESSY, L.; FINNERTY, C. C.; LOPEZ, C. M.; HONARI, S.; MOORE, E. E.; MINEI, J. P.; CUSCHIERI, J.; BANKEY, P. E.; JOHNSON, J. L.; SPERRY, J.; NATHENS, A. B.; BILLIAR, T. R.; WEST, M. A.; JESCHKE, M. G.; KLEIN, M. B.; GAMELLI, R. L.; GIBRAN, N. S.; BROWNSTEIN, B. H.; MILLER-GRAZIANO, C.; CALVANO, S. E.; MASON, P. H.; COBB, J. P.; RAHME, L. G.; LOWRY, S. F.; MAIER, R. V.; MOLDAWER, L. L.; HERNDON, D. N.; DAVIS, R. W.; XIAO, W.; TOMPKINS, R. G. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 9, p. 3507-3512, 2013.

SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; SCARSELLI, M.; GROS, P.; VAN STRIJP, J. A. Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 6, p. 393-399, 2010.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 762-774, 2011.

SNYDERMAN, R.; PHILLIPS, J. K.; MERGENHAGEN, S. E. Biological activity of complement in vivo. Role of C5 in the accumulation of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory exudates. **J Exp Med**, v. 134, n. 5, p. 1131-1143, 1971.

SOELL, M.; DIAB, M.; HAAN-ARCHIPOFF, G.; BERETZ, A.; HERBELIN, C.; POUTREL, B.; KLEIN, J. P. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. **Infect Immun**, v. 63, n. 4, p. 1380-1386, 1995.

SPELLBERG, B.; DAUM, R. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 335-348, 2012.

STANDIFORD, T. J.; ARENBERG, D. A.; DANFORTH, J. M.; KUNKEL, S. L.; VANOTTEREN, G. M.; STRIETER, R. M. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. **Infect Immun**, v. 62, n. 1, p. 119-125, 1994.

STILES, B. G.; GARZA, A. R.; ULRICH, R. G.; BOLES, J. W. Mucosal vaccination with recombinantly attenuated staphylococcal enterotoxin B and protection in a murine model. **Infect Immun**, v. 69, n. 4, p. 2031-2036, 2001.

SUN, L.; YE, R. D. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. **Acta Pharmacol Sin**, v. 33, n. 3, p. 342-350, 2012.

TACCONELLI, E.; POP-VICAS, A. E.; D'AGATA, E. M. Increased mortality among elderly patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **J Hosp Infect**, v. 64, n. 3, p. 251-256, 2006.

TAKAHASHI, K.; KUROKAWA, K.; MOYO, P.; JUNG, D. J.; AN, J. H.; CHIGWESHE, L.; PAUL, E.; LEE, B. L. Intradermal immunization with wall teichoic acid (WTA) elicits and augments an anti-WTA IgG response that protects mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection independent of mannose-binding lectin status. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e69739, 2013.

TEIXEIRA, C. R.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R. B.; SANTOS, C. S.; ANDRADE, B. B.; RAFFAELE-NETTO, I.; SILVA, J. S.; GUGLIELMOTTI, A.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **J Immunol**, v. 175, n. 12, p. 8346-8353, 2005.

TKACZYK, C.; HAMILTON, M. M.; DATTA, V.; YANG, X. P.; HILLIARD, J. J.; STEPHENS, G. L.; SADOWSKA, A.; HUA, L.; O'DAY, T.; SUZICH, J.; STOVER, C. K.; SELLMAN, B. R. *Staphylococcus aureus* alpha toxin suppresses effective innate and adaptive immune responses in a murine dermonecrosis model. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75103, 2013.

TSENG, C. W.; KYME, P. A.; ARRUDA, A.; RAMANUJAN, V. K.; TAWACKOLI, W.; LIU, G. Y. Innate immune dysfunctions in aged mice facilitate the systemic dissemination of methicillin-resistant *S. aureus*. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41454, 2012.

VAN DE VEERDONK, F. L.; GRESNIGT, M. S.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. **BMB Rep**, v. 42, n. 12, p. 776-787, 2009.

VAN KESSEL, K. P.; BESTEBROER, J.; VAN STRIJP, J. A. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Front Immunol**, v. 5, n., p. 467, 2014.

VELAZQUEZ-MEZA, M. E. [*Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination]. **Salud Publica Mex**, v. 47, n. 5, p. 381-387, 2005.

VERKAIK, N. J.; BOELEN, H. A.; DE VOGEL, C. P.; TAVAKOL, M.; BODE, L. G.; VERBRUGH, H. A.; VAN BELKUM, A.; VAN WAMEL, W. J. Heterogeneity of the humoral immune response following *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 29, n. 5, p. 509-518, 2010.

WAITE, J. C.; SKOKOS, D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. **Int J Inflam**, v. 2012, n., p. 819467, 2012.

WALLACH, D.; KANG, T. B.; KOVALENKO, A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 1, p. 51-59, 2014.

WARD, P. A.; ZVAIFLER, N. J. Complement-derived leukotactic factors in inflammatory synovial fluids of humans. **J Clin Invest**, v. 50, n. 3, p. 606-616, 1971.

WELLS, S.; ANDERSON, T.; TIEMIEIER, A.; WROBEL, J.; MARAQA, N.; SMOTHERMAN, C.; WHEELER, S.; BAILEY, C.; KRAEMER, D.; RATHORE, M. H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with congenital heart disease in the pediatric intensive care unit. **World J Pediatr Congenit Heart Surg**, v. 4, n. 4, p. 344-348, 2013.

WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. **Clin Infect Dis**, v. 27, n. 2, p. 245-249; quiz 250-241, 1998.

WERNER, J. L.; GESSNER, M. A.; LILLY, L. M.; NELSON, M. P.; METZ, A. E.; HORN, D.; DUNAWAY, C. W.; DESHANE, J.; CHAPLIN, D. D.; WEAVER, C. T.; BROWN, G. D.; STEELE, C. Neutrophils produce interleukin 17A (IL-17A) in a dectin-1- and IL-23-dependent manner during invasive fungal infection. **Infect Immun**, v. 79, n. 10, p. 3966-3977, 2011.

WERTHEIM, H. F.; VOS, M. C.; OTT, A.; VAN BELKUM, A.; VOSS, A.; KLUYTMANS, J. A.; VAN KEULEN, P. H.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; MEESTER, M. H.; VERBRUGH, H. A. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. **Lancet**, v. 364, n. 9435, p. 703-705, 2004.

WERTHEIM, H. F.; WALSH, E.; CHOUDHURRY, R.; MELLES, D. C.; BOELEN, H. A.; MIAJLOVIC, H.; VERBRUGH, H. A.; FOSTER, T.; VAN BELKUM, A. Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. **PLoS Med**, v. 5, n. 1, p. e17, 2008.

WETSEL, R. A.; FLEISCHER, D. T.; HAVILAND, D. L. Deficiency of the murine fifth complement component (C5). A 2-base pair gene deletion in a 5'-exon. **J Biol Chem**, v. 265, n. 5, p. 2435-2440, 1990.

WOODY, M. A.; KRAKAUER, T.; ULRICH, R. G.; STILES, B. G. Differential immune responses to staphylococcal enterotoxin B mutations in a hydrophobic loop dominating the interface with major histocompatibility complex class II receptors. **J Infect Dis**, v. 177, n. 4, p. 1013-1022, 1998.

WU, X.; XU, F. Dendritic cells during *Staphylococcus aureus* infection: subsets and roles. **J Transl Med**, v. 12, n. 1, p. 358, 2014.

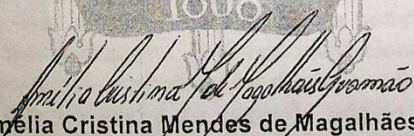
YAO, L.; LOWY, F. D.; BERMAN, J. W. Interleukin-8 gene expression in *Staphylococcus aureus*-infected endothelial cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 8, p. 3407-3409, 1996.



Vitória da Conquista, 04 de março de 2013

PARECER

O Projeto de pesquisa "O papel da imunização intradérmica com *Staphylococcus aureus* metilicina resistente na quimioatração de células para o sítio de infecção em modelo murino" de autoria do Professor Dr. Robson Amaro Augusto da Silva, do Instituto Multidisciplinar em Saúde, da Universidade Federal da Bahia está em consonância com a norma ética no uso de animais em experimentação. O projeto tem por objetivo avaliar o papel da imunização intradérmica com *Staphylococcus aureus* metilicina resistente na quimioatração de células para o sítio de infecção em modelo murino, caracterizar o infiltrado inflamatório, definir a carga bacteriana nos linfonodos drenantes, avaliar a resposta sistêmica e a expressão de quimiocinas. Neste encontra-se descrito o planejamento estatístico utilizado para o cálculo da quantidade de animais previstos, estando de acordo com outros experimentos encontrados na literatura. Com base no exposto e considerando que este projeto de pesquisa esta de acordo com os princípios éticos na experimentação de animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e regulamentados pela Lei nº 11.794, de 2008, emite-se parecer favorável à execução deste projeto. Este é o nosso parecer, salvo melhor juízo.


Profa Dra Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão
Coordenadora da CEUA-IMS-UFBA