



O modelo de infecção intradérmica por *Staphylococcus aureus*: uma alternativa para o entendimento do recrutamento de células para o sítio de infecção?

Intradermal infection model by *Staphylococcus aureus*: an alternative for understanding the recruitment of inflammatory cells into the infection site?

P.V.S., M.P.L., Galantini¹; Oliveira¹; J.R., Silva¹; I.V., Nunes¹; L.F.A.A., Ferreira¹; L.A.S., Pereira¹; L.M., Marques¹; T.B., Figueiredo¹; R.A.A., Silva^{1*}

¹ Laboratório de Histopatologia, Universidade Federal da Bahia, Campus AnísioTeixeira, 45000-000, Vitória da Conquista-Ba, Brazil.

*robson.amaro@gmail.com;

(Recebido em 19 de agosto de 2015; aceito em 10 de outubro de 2015)

Atualmente, o patógeno *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) vem se tornando objeto de vários estudos, devido às altas taxas de morbidade e mortalidade. No entanto, pouco se sabe sobre a reposta imune associada ao controle desta infecção. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da imunização intradérmica com MRSA e a resposta inflamatória no sítio de infecção. Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos A/J que foram imunizados com cepa de MRSA. Após o desafio, foram coletadas amostras do sangue, soro, linfonodo drenante e orelha para análises histopatológicas. A partir do esfregaço sanguíneo, foi observada neutrofilia nos grupos desafiados com MRSA. A análise histopatológica mostrou infiltrado inflamatório em todos os grupos estudados. Foi observado também que, a imunização intradérmica promove hiperplasia no linfonodo drenante, entretanto, não foram observadas diferenças nos perfis de citocinas pró-inflamatórias nos grupos estudados. Conclui-se que há uma predominância de neutrófilos no sítio de estudo e que a hiperplasia observada no linfonodo pode ser correlacionada com o aumento no número de linfócitos Th17, que poderiam contribuir para a diminuição da carga bacteriana neste órgão.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, imunização, neutrófilo.

Currently, the pathogen *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA) has become the subject of several studies, because of the high morbidity and mortality. However, little is known about the immune response associated with control of this infection. The objective of this study was to investigate the effect of intradermal immunization with MRSA and the inflammatory response at the site of infection. For the experiments, A / J mice were used and immunized with MRSA strain. After the challenge, blood samples, serum, draining lymph nodes and ear were collected for histopathological analysis. From the blood smears were observed higher neutrophil counts in challenged groups with MRSA. Histopathological analysis showed inflammatory infiltrate in all groups. It was also observed that intradermal immunization promotes hyperplasia in the draining lymph node, however, no differences were observed in the profiles of pro-inflammatory cytokines in both groups. It follows that there is a predominance of neutrophils in the lesion site and that the hyperplasia observed in lymph node may be correlated with the increase in the number of lymphocytes Th17, that could contribute to the reduction of bacterial load in this organ.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, immunization, neutrophil.

1. INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno humano associado com alta mortalidade e morbidade em um amplo espectro de infecções hospitalares e comunitárias [1]. Esta bactéria pode causar diversos agravos a saúde, que vão desde infecções de pele até doenças invasivas, como infecções de tecidos moles, pneumonias, osteomielite e sepse [2].

O *S. aureus* possui um arsenal de fatores de virulência que lhe permite escapar da resposta imune do hospedeiro e causar a doença clínica [3]. Estes compreendem proteínas de superfície celular (ex., proteína A), toxinas extracelulares (hemolisina alfa, beta e gama, enterotoxinas), enzimas (lipase, proteases, nucleases) e peptídeos (Modulinas Fenol Solúveis - PSMs), bem como, proteínas de superfície e da parede bacteriana (ex., Ácido Lipoteicóico - LTA) [4]. O *S. aureus* expressa diversos fatores concebidos especificamente para evadir a resposta imune do hospedeiro, incluindo uma capsula extracelular anti-opsonização, que o protege da ação de anticorpos e componentes da imunidade inata. Além disso, este patógeno produz proteínas inibidoras de quimioatraentes de neutrófilos e da cascata do complemento, proteínas de ligação a imunoglobulinas (proteína A staphylococal ou Spa) e enzimas que auxiliam na sobrevivência dentro do fagossomo de neutrófilos (superóxido dismutase) [5]. A maioria das cepas de *S. aureus* também produz diversas invasinas (tais como, hialuronidases e estafiloquinases) e/ou toxinas (enterotoxinas A e B, α toxina e leucocidina Pantón-Valentine) que promovem danos aos tecidos e desempenham um papel importante no choque séptico [6,7]. Estes componentes bacterianos e os produtos secretados afetam a patogênese da infecção por *S. aureus* e têm sido descritos como contribuidores para o desenvolvimento da doença [8].

É de particular interesse a cepa Meticilina-resistente de *S. aureus* (MRSA), que desde o início de 1990 aumentou dramaticamente e surgiu como uma das principais causas de infecções adquiridas nos hospitais [9]. Infecções causadas por cepas multirresistentes de *Staphylococcus* limitam as opções terapêuticas e estão associados com custos mais elevados do que as infecções causadas por cepas sensíveis [10].

O *S. aureus* provoca uma forte resposta inflamatória, resultando na migração de um grande número de neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção [11]. A maioria das cepas de *S. aureus* induz a produção da interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-12p70 em monócitos *in vitro*, e isso pode resultar em uma polarização da resposta imune para Th1 *in vivo* [12]. Essa resposta fagocítica de leucócitos polimorfonucleares nas infecções por *S. aureus* é um determinante crítico do resultado da infecção [13]. O recrutamento de neutrófilos e a formação de abscesso são uma característica das infecções por *S. aureus* e são necessários para a eliminação do patógeno [14].

Embora amplamente estudada, a imunidade protetora natural contra o *S. aureus* ainda é pouco compreendida [10,13]. Recentemente a importância das células T e das citocinas do sistema imune inato nas infecções por *S. aureus* têm sido objeto de estudo [15,16]. Foi observado que as células T desempenham um papel fundamental na prevenção da infecção por *S. aureus*, como demonstrado em modelos de infecções local e disseminada. Estes estudos estabelecem uma conexão entre células T e neutrófilos, em que a citocina IL-17 é importante para o recrutamento de neutrófilos, aumentando a quimiotaxia e atuando de forma sinérgica com o TLR2 para aumentar a atividade bactericida [17,18]. Além disso, a resposta Th17 pode ser importante na imunidade contra o *S. aureus* por se tratar de um patógeno intracelular [19] e a produção da IL-17 induz a resposta Th1 que é importante na abordagem contra tais microrganismos [20].

A imunopatogênese da infecção por *S. aureus* é dependente de uma complexa rede de interações envolvendo tanto o microrganismo quanto fatores do hospedeiro. A natureza das células que compõem o infiltrado inflamatório é de suma importância para determinar o curso da infecção. Diversos trabalhos demonstram que neutrófilos representam a maioria das células presentes nas lesões causadas por *S. aureus* [21, 22] sugerindo uma comunicação entre o sangue periférico e o sítio da lesão. O grau de ativação celular e as substâncias que são produzidas pelas diferentes populações de células que migram para o sítio da lesão favorecem o controle da infecção e também podem estar associadas com a patogênese da doença. No entanto, poucos

trabalhos avaliam a cooperação celular existente na resposta inflamatória contra o *S. aureus* e a cinética celular estabelecida entre o sítio infectado e o linfonodo drenante da lesão.

Diferentes modelos são utilizados para avaliação dos eventos envolvidos na resposta imune frente a infecções bacterianas. O modelo de imunização e infecção intradérmica mimetiza o que acontece durante uma infecção natural, por isso foi o escolhido no presente estudo. A derme e epiderme são ricas em células apresentadoras de antígenos, assim, o modelo de imunização e infecção intradérmica sugere uma entrega mais eficaz do antígeno, utilizando uma menor dose [23].

No presente estudo, investigamos o efeito da imunização intradérmica com *S. aureus* resistente a metilicina e a resposta no sítio de infecção com o intuito de determinar os eventos iniciais da resposta imune desenvolvida durante esta infecção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem A/J entre seis e oito semanas, mantidos no biotério da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira (IMS-CAT), em condições controladas de temperatura, tendo livre acesso à água e comida. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal da Bahia (IMS-CAT), Protocolo n° 001/2013.

2.2. Preparo da cepa bacteriana

Foi utilizada uma cepa virulenta de *Staphylococcus aureus* MRSA cedida pelo laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal da Bahia (IMS-CAT). As bactérias foram obtidas a partir de isolados clínicos de hospitais locais [24]. A cepa de MRSA foi cultivada em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*), as colônias foram diluídas em solução salina estéril e mensuradas em espectrofotômetro no comprimento de onda 660 nm para a obtenção de 10^8 bactérias/mL. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas até a obtenção de 10^3 bactérias/mL e subsequente inativação dessas por meio da incubação em bloco seco a 85°C por 30 minutos.

2.3. Imunização intradérmica com *S. aureus*

Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos que foram anestesiados intraperitonealmente com quetamina e xilazina, nas doses de 40mg/kg e 4mg/kg, respectivamente e imunizados por duas vezes com intervalo de 7 dias entre as imunizações. Um dos grupos recebeu no dia zero, o inóculo intradérmico na orelha direita 10^3 de bactéria inativadas pelo calor e ressuspensas em um volume de 10 µL de solução salina (*Heath Killed*) e o outro grupo recebeu solução salina estéril nas mesmas condições. A segunda imunização ocorreu 7 dias depois e procedeu da mesma maneira. Estes dois grupos foram ainda subdivididos para o desafio, que foi realizado na orelha esquerda um dia após a segunda imunização. Cada um dos grupos imunizados foi desafiado de duas formas: alguns animais receberam o inóculo intradérmico de 10 µL com 10^3 de bactérias vivas (1000 Unidades Formadoras de Colônia - UFC) e os outros animais receberam apenas solução salina. A eutanásia dos animais foi realizada após 24, 48 e 96 horas decorridas do desafio intradérmico através do aprofundamento da anestesia utilizando quetamina e xilazina, nas doses de 400mg/kg e 40mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal (Figura 1).



Figura 1- Esquema correspondente ao desenho experimental.

2.4. Determinação total e diferencial de leucócitos

Após a eutanásia dos animais, amostras de sangue foram coletadas, esfregaços sanguíneos foram confeccionados e corados com Panótico. A quantificação dos leucócitos totais foi realizada utilizando coloração com azul de Turck com posterior contagem em hemocítômetro. A análise dos esfregaços foi realizada por microscopia óptica por observadores de forma cega, utilizando critérios morfológicos.

2.5. Determinação de citocinas

A produção de IL-1 β e TNF- α e IFN- γ do soro dos animais foi avaliada pelo método ELISA sanduíche utilizando o kit ELISA Ready- SET-GO[®] (Bioscience). A curva padrão e os valores de citocinas de cada amostra foram calculados seguindo o protocolo proposto pelo fabricante.

2.6. Análise morfométrica do número de células inflamatórias no infiltrado da orelha

Amostras das orelhas foram coletadas após os tempos pré-definidos nos pontos de eutanásia dos animais e foram imediatamente fixadas em formol à 10% e então processadas e hidratadas, onde os órgãos foram embebidos em parafina e cortados (5 μ m) em micrótomo. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina e avaliadas por microscopia óptica.

2.7. Obtenção e processamento do linfonodo drenante

Os linfonodos retromaxilares dos camundongos foram removidos assepticamente e triturados em meio RPMI. O macerado foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. A quantificação do número total de células dos linfonodos foi realizada por contagem em câmara de Neubauer.

2.8. Tratamento estatístico

As diferenças entre os grupos propostos foram analisadas usando One-way ANOVA seguido pelo teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism[®] (versão 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes para valores com $p < 0,05$ em um intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS

3.1. Histopatologia revela infiltrado inflamatório presente na orelha dos animais imunizados e desafiados com *S. aureus*

O número de células inflamatórias foi determinado por meio da avaliação histopatológica das orelhas onde foi realizado o desafio intradérmico. A Figura 2 mostra que nos grupos desafiados com *S. aureus* foi observada a maior contagem de células inflamatórias no tecido intradérmico. Os grupos imunizados apresentaram diferenças na intensidade do infiltrado inflamatório, onde foi observado que o número de células inflamatórias é maior no grupo desafiado com *S. aureus*. De maneira semelhante, os grupos não imunizados, porém desafiados

com *S. aureus* apresentou maior contagem de células inflamatórias que os animais desafiados apenas com salina.

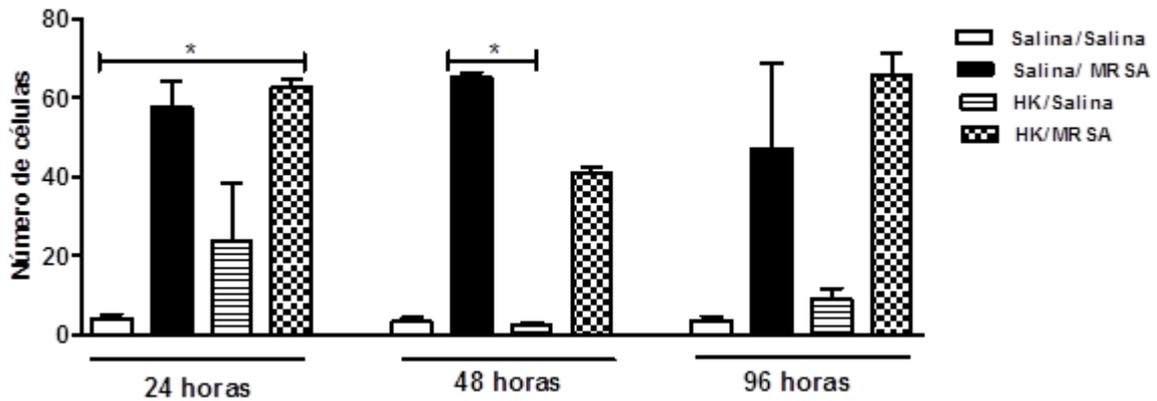


Figura 2- Avaliação do infiltrado inflamatório presente na orelha dos animais imunizados e desafiados. Foi observado maior infiltrado inflamatório nos grupos controles (salina) e desafiados com *S. aureus* MRSA e imunizados (HK) e desafiados com *S. aureus* MRSA em comparação com os respectivos controles (Salina/Salina e HK/salina) $n=6-8$ animais por grupo. Experimentos realizados em duplicata. * $p < 0,05$ entre os grupos Salina/Salina vs HK/MRSA e Salina/MRSA vs HK/Salina.

3.2. Imunização intradérmica induz hiperplasia do linfonodo drenante da lesão

Os linfonodos retromaxilares esquerdos dos animais imunizados e desafiados foram removidos e macerados para que fossem determinados os números totais de células. Foi observado que a imunização intradérmica promoveu o aumento do número de células nos linfonodos drenantes das lesões 24 e 48 horas após o desafio com a cepa de MRSA (Figura 3).

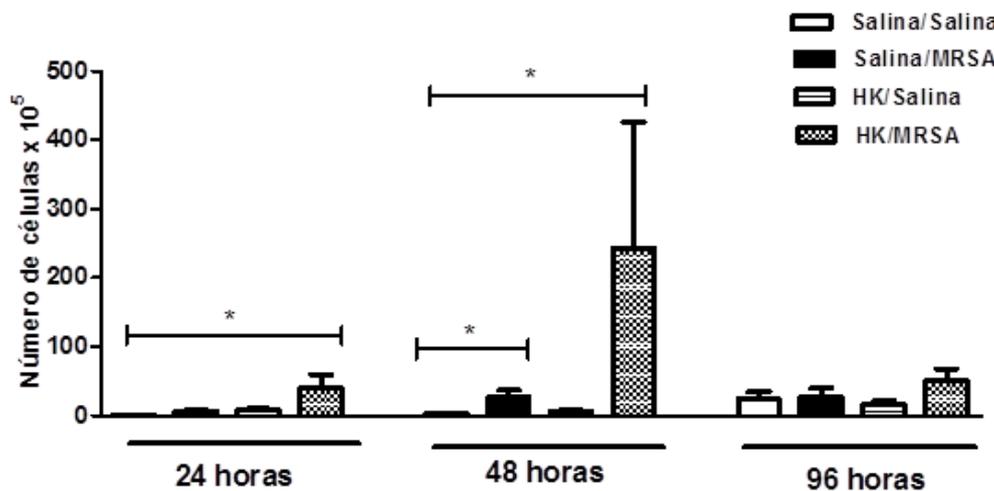


Figura 3 - Contagem total do número de células do linfonodo drenante da lesão. Foi observado um aumento no número de células do linfonodo drenante nos grupos controle e desafiados com *S. aureus* MRSA (Salina/MRSA) e no grupo imunizado e desafiado com *S. aureus* MRSA (HK/MRSA), nos tempos de 24 e 48 horas. $n=6-8$ animais por grupo. Experimentos realizados em duplicata. * $p < 0,05$.

3.3. Imunização intradérmica não induz diferenças sistêmicas no número total de leucócitos no sangue periférico em animais desafiados

O sangue dos animais dos diferentes grupos foi coletado objetivando avaliar se a imunização poderia ter efeitos sistêmicos. Foi observado que a imunização intradérmica não foi capaz de

induzir um aumento significativo no número total de leucócitos em nenhum dos grupos avaliados (Figura 4).

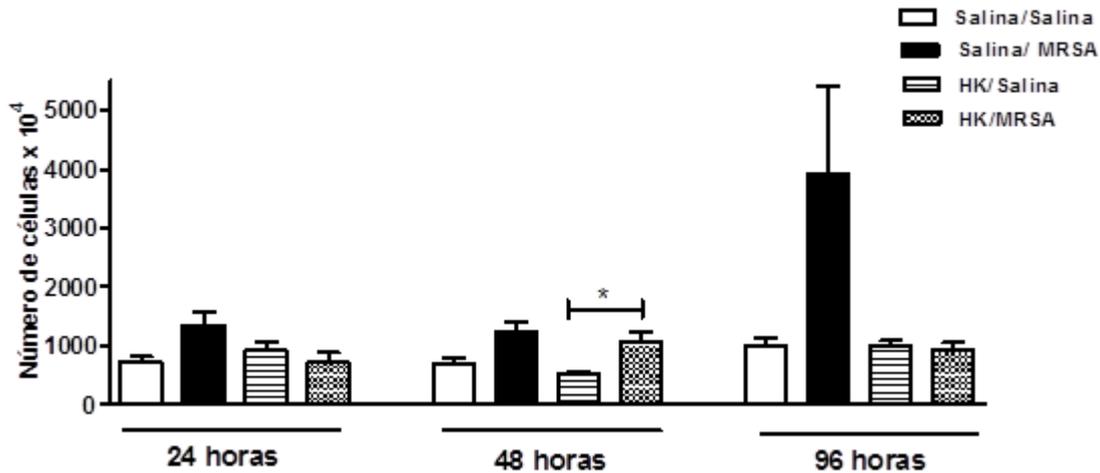


Figura 4- Contagem total de leucócitos no sangue periférico. A imunização intradérmica não induziu aumento no número total de leucócitos nos grupos analisados. $n= 6-8$ animais por grupo. Experimentos realizados em duplicata. * $p<0,05$.

3.4. Animais imunizados mostram neutrofilia quando desafiados

A partir da análise de esfregaços sanguíneos foi observado que o desafio com MRSA induziu neutrofilia (Figura 5). Após 96 horas do desafio houve diferença no número de neutrófilos entre os grupos salina/salina e salina/MRSA, onde o grupo desafiado por *S. aureus* apresentou maior contagem de neutrófilos. O grupo salina/salina e HK/salina o número de neutrófilos se apresentou variável. Noventa e seis horas após o desafio também foi observada neutrofilia no grupo HK/MRSA, no entanto, o grupo não imunizado (salina/MRSA) apresentou contagem superior de neutrófilos.

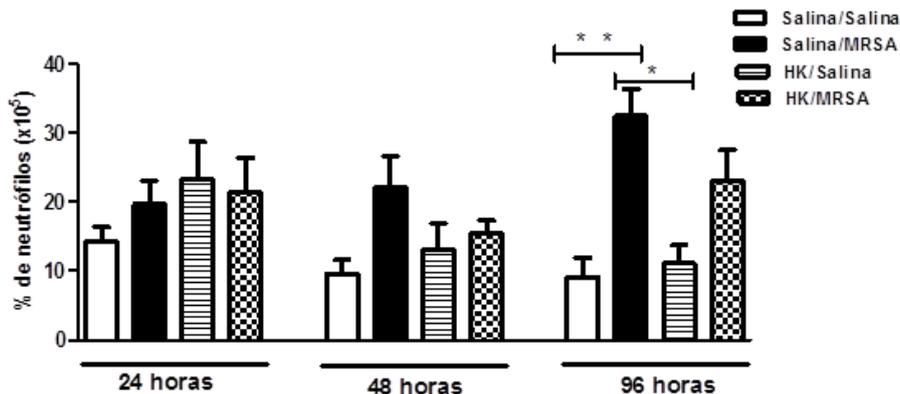


Figura 5- Porcentagem de neutrófilos na corrente sanguínea. O desafio com *S.aureus* MRSA induz neutrofilia, como observado nos grupos Salina/MRSA e HK/MRSA, nos tempos de 48 e 96 horas. $n= 6-8$ animais por grupo. Experimentos realizados em duplicata. * $p<0,05$.

3.5. Imunização intradérmica por MRSA não altera o perfil de citocinas pró-inflamatórias no soro de animais desafiados

As concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias foram comparadas entre os grupos experimentais para avaliar a influência da imunização na indução da produção de moléculas pró-inflamatórias. Vinte e quatro, 48 e 96 horas após o desafio o soro foi utilizado para a dosagem de citocinas. Como mostrado na Figura 6, as concentrações de IL-1 β não mostraram

diferenças significantes, mantendo o mesmo padrão de concentração sérica dos animais em todos os grupos. Um comportamento semelhante foi observado para as produções de TNF- α e IFN- γ .

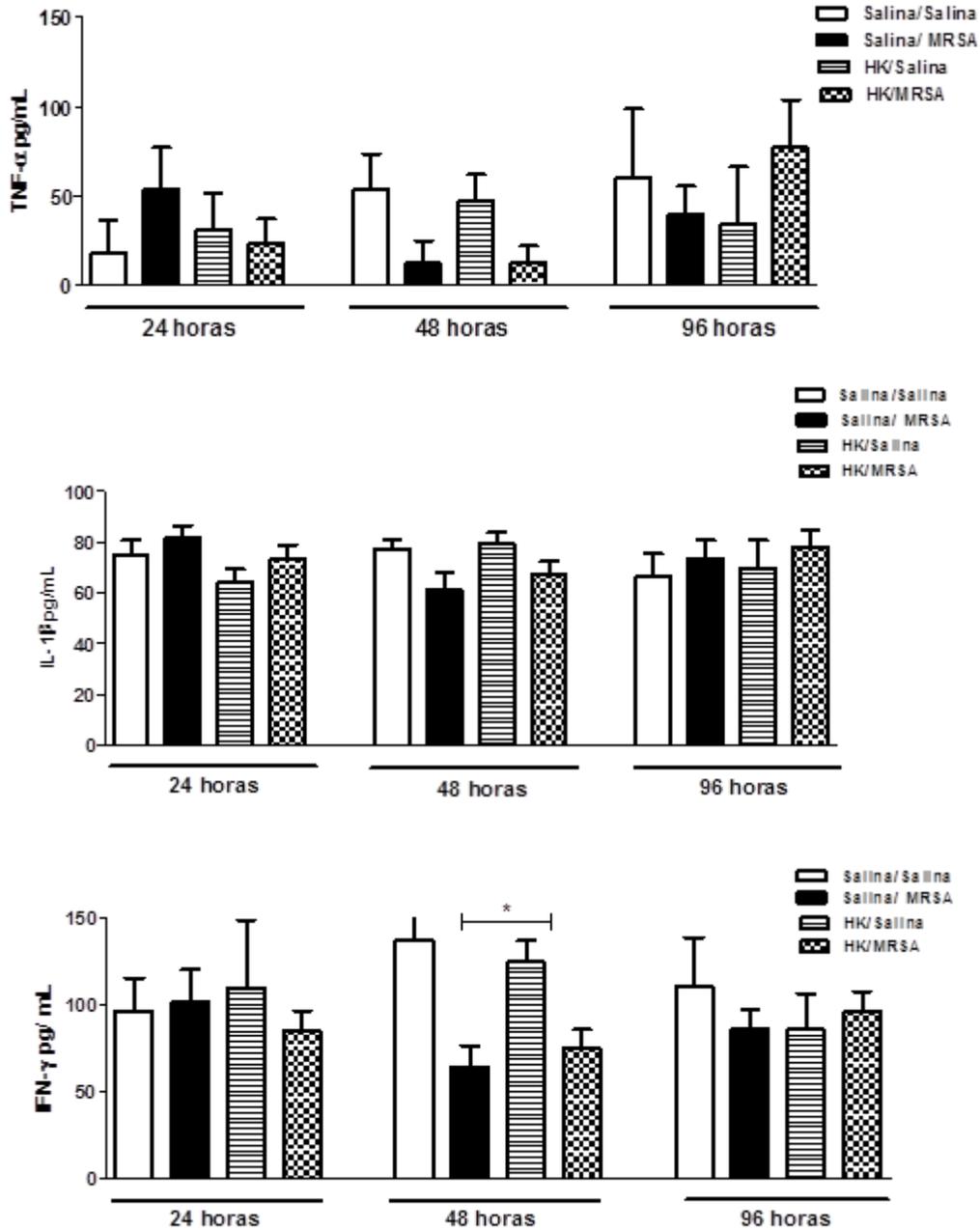


Figura 6 - Perfil de citocinas no soro. A imunização não alterou a produção de citocinas nos grupos analisados. A. Gráfico representativo da dosagem de IL-1 β . B. Gráfico representativo da dosagem de TNF- α . C. Gráfico representativo da dosagem de IFN- γ . Experimentos realizados em duplicata. * $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Infeções por *S. aureus* estão cada vez mais comuns em indivíduos saudáveis e fora do ambiente hospitalar [2]. Com o objetivo de entender as interações entre as células no sítio inflamatório causado pela infecção por *S. aureus* o presente estudo investigou o efeito da imunização intradérmica com MRSA e a resposta no sítio de infecção.

No nosso estudo, após as imunizações, as lesões foram caracterizadas por intenso infiltrado inflamatório e foi observado que os animais desafiados com MRSA, imunizados ou não, apresentaram maior contagem de células inflamatórias na orelha (Figura 2). O principal tipo celular encontrado no sítio da infecção foi o neutrófilo (dados não mostrados). Neste caso, o infiltrado localizado de neutrófilos sugere que estas células desempenham um papel importante no controle da infecção. Para demonstrar que estes polimorfonucleares desempenham um papel importante na depuração bacteriana em infecções causadas por *S. aureus*, Prabhakara et al., (2013) [25], mostrou que a depleção destes leucócitos *in vivo* leva a extensas áreas de necrose no sítio da infecção (orelha), aumentando a gravidade da lesão, o que não é observado em animais não neutropênicos. Além disso, a taxa de sobrevivência pós-infecção é menor nos em animais que tiveram os neutrófilos depletados. Um outro estudo de Molne et al., (2003) [21], mostrou em um modelo de dermatite estafilocócica em que os animais que tiveram os granulócitos depletados desenvolveram ulcerações que não tendiam para a cura, enquanto que os animais com número normal de neutrófilos exibiam lesões cutâneas pequenas e transitórias. A infecção cutânea nestes animais neutropênicos era mais extensa, com úlceras profundas, necrosantes e persistentes.

É sabido que os neutrófilos são leucócitos componentes da resposta imune inata e, portanto, seu papel nos processos tardios da imunidade adaptativa ainda está sob investigação. Diversos trabalhos mostram que além do recrutamento de neutrófilos, há evidências de que as células T desempenham um papel crítico nas infecções de pele causadas por *S. aureus* [26]. O estudo de McLoughlin et al., (2006) [16] mostrou que camundongos deficientes de células T $\alpha\beta$ tinham defeitos na formação de abscessos com neutrófilos após o desafio subcutâneo com *S. aureus*, em comparação com os animais selvagens. Outro estudo de Molne et al., (2003) [21], mostrou que camundongos deficientes de células T $\gamma\delta$ apresentaram lesões cutâneas com contagem bacteriana substancialmente mais elevada que animais selvagens após um desafio intradérmico com *S. aureus*. Alguns trabalhos têm sugerido a presença e função dos linfócitos Th17 em infecções por *S. aureus*, uma vez que, a IL-17 está também associada ao recrutamento de neutrófilos. Cho et al., (2010) [27] mostrou em um modelo de infecção cutânea com *S. aureus* que animais deficientes em células T $\gamma\delta$ apresentavam maiores lesões de pele com altas contagens bacterianas e um recrutamento de neutrófilos prejudicado em comparação com animais selvagens. Este recrutamento foi correlacionado com a necessidade de IL-17. Além disso, mostraram que animais deficientes de células T $\gamma\delta$ inoculados com *S. aureus* quando tratados com IL-17 recombinante apresentavam uma redução no tamanho da lesão e nas contagens bacterianas. Demonstrando que a IL-17 poderia restaurar a imunidade comprometida dos animais.

A hiperplasia do linfonodo drenante dos sítios de infecção foi observada principalmente após 48 horas do desafio com MRSA (Figura 3). Esta hiperplasia ocorre provavelmente pelo aumento de diferentes populações de células imunes. Prabhakara et al., (2013) [25] mostrou após a infecção por *S. aureus* há um aumento de células B, células TCD4+, células TCD8+, células dendríticas, células *natural killer* e polimorfonucleares no linfonodo drenante da lesão. Os resultados mostram que a imunização prévia de animais ao *S. aureus* inativado tem provavelmente um efeito protetor em resposta a um desafio posterior com a bactéria viva e virulenta. Diversos trabalhos avaliam a resposta no linfonodo após protocolos de imunizações. Iborra et al., (2005) [28], utilizando modelos murinos de desafio para leishmaniose cutânea mostrou que após imunizações com plasmídeos codificantes de antígenos de leishmania e posterior desafio com parasitas vivos (*Leishmania major*) havia uma redução da carga parasitária no linfonodo em comparação com animais não imunizados. Além disso, o trabalho correlacionou este dado com a produção de IFN- γ , mostrando que as células do linfonodo dos animais imunizados quando reestimuladas com promastigotas de *L. major* produziam uma maior quantidade de IFN- γ em comparação com as células de animais não imunizados.

Portanto, neste modelo a reduzida patologia cutânea apresentada pelos animais foi correlacionada com a redução do número de parasitas na orelha e no linfonodo, configurando uma proteção parcial. Já o trabalho de Da Silva et al., (2011) [29] que utiliza protocolos de imunizações no contexto da leishmaniose visceral e desafio com *L. chagasi* não mostrou diferenças na carga parasitária e nos níveis de citocinas no linfonodo drenante dos animais imunizados e desafiados. No entanto, no sítio de infecção (orelha) foi observado uma redução da carga parasitária. No presente trabalho, foi avaliada apenas a contagem total de células no linfonodo dos diferentes grupos, porém, outras avaliações seriam interessantes e contribuiriam para a elucidação das interações entre células no sítio inflamatório e órgãos linfóides secundários.

A fim de avaliar o efeito sistêmico da imunização foi realizada a contagem total de células no sangue periférico e foi visto que apenas o grupo salina/MRSA apresentou uma tendência a aumentar a sua contagem leucocitária 96 horas após o desafio. A baixa carga bacteriana administrada no desafio pode estar correlacionada com este achado. Estudos com modelos murinos para leishmaniose visceral, por exemplo, mostram que doses mais baixas de protozoários são mais eficazes em induzir imunidade. Animais expostos a baixas doses tornam-se resistentes e aqueles que recebem doses elevadas apresentam infecções progressivas [30].

Foi observado que nos grupos desafiados com *S. aureus* as células predominantemente recrutadas para o sítio de desafio são neutrófilos. O grupo não imunizado e posteriormente desafiado com MRSA apresentou as maiores porcentagens de neutrófilos, 15% após 24 horas do desafio, 22% após 48 horas e 35% após 96 horas. Além disso, o grupo imunizado e desafiado com MRSA também apresentou um aumento de neutrófilos circulantes, variando de 20-22% nos diferentes tempos. Este recrutamento deve-se a agentes quimiotáticos que no caso dos neutrófilos são principalmente a IL-8 (CXCL8), GRO- α (CXCL1), proteína quimiotática de granulócitos 2 (GCP2, CXCL6) e leucotrienos B₄ (LTB₄) que se ligam a receptores específicos na superfície dos neutrófilos [31].

No presente trabalho não houve diferenças significativas nas concentrações séricas das citocinas avaliadas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) entre os grupos imunizados ou controles. As dosagens foram realizadas a partir do soro dos animais e este fato pode estar correlacionado com a baixa detecção destas moléculas. Dosagens destas citocinas no sítio inflamatório ou no linfonodo drenante da lesão poderiam revelar uma atuação melhor dessas moléculas. Infecções por bactérias gram positivas, tal como as causadas por *S. aureus*, são capazes de produzir uma resposta sistêmica de citocinas. No entanto, o pico sistêmico de resposta da produção de citocinas em infecções por gram-positivas ocorre de 50-75 horas após o desafio, enquanto que em infecções por gram-negativas o pico ocorre de 1-5 horas após a infecção [32]. Embora as citocinas apresentem cinéticas de produção diferentes. A produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta aos produtos bacterianos é crucial na resposta imune inata e adaptativa das infecções. Diversos componentes bacterianos são importantes para a iniciação da resposta imune e podem desencadear a produção de citocinas. Os receptores semelhantes ao Toll do tipo 2, por exemplo, se ligam ao LPS e tem a capacidade de induzir a síntese de citocinas [33]. O peptidoglicano presente na parede do *S. aureus* também tem sido mostrado como estimulador da produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (TNF-, IL-1, IL-6 e IL-8) em monócitos e macrófagos [34, 35, 36, 37]. Alguns trabalhos mostram, que ausência da sinalização via citocinas agrava as infecções. Já foi mostrado, por exemplo, que camundongos deficientes para o receptor de IL-1 desenvolvem lesões com alta contagem bacteriana em infecções causadas por *S. aureus* quando comparados com animais selvagens [2].

5. CONCLUSÃO

Foi observado que o modelo de imunização intradérmica é uma alternativa para o entendimento dos eventos patológicos envolvidos na infecção com *S. aureus*. Em resumo, há uma inflamação local, onde a população celular compõe-se principalmente de neutrófilos. Sabe-se que estes leucócitos fazem parte da imunidade inata e agem somente nos primeiros momentos da infecção. Neste caso, qualquer efeito protetor observado posteriormente poderia estar

relacionado a uma imunidade adaptativa e neste caso pode envolver os linfócitos Th17. A hiperplasia observada no linfonodo pode ser correlacionada com o aumento no número destes linfócitos, que induzem o recrutamento de neutrófilos e conseqüentemente poderiam contribuir para a diminuição da carga bacteriana neste órgão. Este processo é essencial para as interações de cooperação celular e geração de imunidade. Dessa forma, a imunização e infecção intradérmica constituem um interessante modelo para o estudo das células recrutadas para o sítio inflamatório, cooperando para o entendimento da patologia causada por *S.aureus*, e para o desenvolvimento futuro de terapias e medidas imunoproláticas.

6. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

-
1. McCaig LF, McDonald LC, Mandal S, Jernigan DB. Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. Emerg. Infect. Dis. 2006 Nov;12(11):1715-1723, doi:10.3201/eid1211.060190.
 2. Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 1998 Ago 339(8):520-532, doi: 10.1056/NEJM199808203390806.
 3. Tong, S.Y.C.; Chen, L.F.; Fowler, V.G.Jr. Colonization, Pathogenicity, Host Susceptibility and Therapeutics for *Staphylococcus aureus*: What is the Clinical Relevance? Semin. Immunopathol. 2012 Mar 34(2):185-200, doi: 10.1007/s00281-011-0300-x.
 4. Gordon, R.J.; Lowy, F.D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin. Infect. Dis. 2008 Jun 11(46) suppl.5: S350-S359, doi:10.1086/533591.
 5. Foster, T.J. Immune evasion by staphylococci. Nat. Rev. Microbiol. 2005 Dez 3(12):948-958.
 6. Pinchuk, I.V.; Beswick, E.J.; Reyes, V.E. Staphylococcal enterotoxins. Toxins (Basel). 2010 Ago 2(8):2177-2197, doi:10.1016/S0168-1605(00)00377-9
 7. Otto, M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Annu. Rev. Microbiol. 2010 Out 64:143-62, doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134309.
 8. Woodin, A.M. Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. 1960 Abr 75(1):158-165.
 9. Chambers, H.F. Community-associated MRSA-resistance and virulence converge. N. Engl. J. Med. 2005 Abr 352(14):1485-1487, doi: 10.1056/NEJMe058023.
 10. Otto, M. Targeted immunotherapy for staphylococcal infections: focus on anti-MSCRAMM antibodies. BioDrugs. 2008 22(1):27-36.
 11. Molne, L.; Verdrengh, M.; Tarkowski, A. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 2000 Nov 68(11):6162-6167.
 12. Megyeri K, Mándi Y, Degré M, Rosztóczy I. Induction of cytokine production by different Staphylococcal strains. Cytokine. 2002 Ago 19(4):206-212, doi:10.1006/cyto.2002.0876.
 13. Lee, J.C. The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 1996 Abr 4(4):162-166, doi:10.1016/0966-842X(96)10021-4.
 14. Verdrengh, M.; Tarkowski, A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 1997 Jul 65(7): 2517-2521.
 15. Sasaki S¹, Nishikawa S, Miura T, Mizuki M, Yamada K, Madarame H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakane A. Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. Infect. Immun. 2000 Mai 68(5): 2424-30.
 16. McLoughlin RM, Solinga RM, Rich J, Zaleski KJ, Cocchiario JL, Risley A, Tzianabos AO, Lee JC. CD4+ T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* wound infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Jul 103(27):10408-10413, doi: 10.1073/pnas.0508961103.
 17. Iwakura, Y. et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. Immunol. Rev. 2008 Dez 226(1):57-79, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00699.x.
 18. Minegishi Y¹, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Karasuyama H. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. J. Exp. Med. 2009 Jun 206(6):1291-301, doi: 10.1084/jem.20082767.

19. Tuchscherer L¹, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, Löffler B. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol. Med.* 2011 Jan 3(3):129-41, doi: 10.1002/emmm.201000115.
20. Lin Y¹, Ritchie S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, Gugliani L, Alcorn JF, Strawbridge H, Park SM, Onishi R, Nyugen N, Walter MJ, Pociask D, Randall TD, Gaffen SL, Iwakura Y, Kolls JK, Khader SA. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity.* 2009 Nov 31(5):799-810, doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.025.
21. Mölne L, Corthay A, Holmdahl R, Tarkowski A. Role of gamma/delta T cell receptor-expressing lymphocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin. Exp. Immunol.* 2003 May 132(2):209-215.
22. Miller LS, Pietras EM, Uricchio LH, Hirano K, Rao S, Lin H, O'Connell RM, Iwakura Y, Cheung AL, Cheng G, Modlin RL. Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J. Immunol.* 2007 Nov 179(10):6933-6942.
23. Lambert PH, Laurent PE. Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine.* 2008 Jun 19;26(26):3197-208, doi: 10.1016/j.vaccine.2008.03.095.
24. Campos GB¹, Souza SG, Lob O TN, Da Silva DC, Sousa DS, Oliveira PS, Santos VM, Amorim AT, Farias SV, Cruz MP, Yatsuda R, Marques LM. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. *New Microbiol.* 2012 Abr 35(2):183-190.
25. Prabhakara R, Foreman O, De Pascalis R, Lee GM, Plaut RD, Kim SY, Stibitz S, Elkins KL, Merkel TJ. Epicutaneous Model of Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Skin Infections. *Infect. Immun.* 2013 Abr 81(4):1306-1315, doi: 10.1128/IAI.01304-12
26. Mathews WC, Caperna JC, Barber RE, Torriani FJ, Miller LG, May S, McCutchan JA. Incidence of and risk factors for clinically significant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a cohort of HIV-infected adults. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005 Oct 40(2):155-160.
27. Cho JS¹, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, Monroe HR, Magorien JE, Blauvelt A, Kolls JK, Cheung AL, Cheng G, Modlin RL, Miller LS. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.* 2010 May 120(5):1762-1773, doi: 10.1172/JCI40891.
28. Iborra S, Carrión J, Anderson C, Alonso C, Sacks D, Soto M. Vaccination with the *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 Protein plus CpG Oligodeoxynucleotides Induces Protection against Cutaneous Leishmaniasis in C57BL/6 Mice but Does Not Prevent Progressive Disease in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 2005 Sep 73(9): 5842-5852, doi: 10.1128/IAI.73.9.5842-5852.2005.
29. da Silva RA¹, Tavares NM, Costa D, Pitombo M, Barbosa L, Fukutani K, Miranda JC, de Oliveira CI, Valenzuela JG, Barral A, Soto M, Barral-Netto M, Brodskyn C. DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2011 Dec;120(3):185-90, doi: 10.1016/j.actatropica.2011.08.007.
30. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable cell mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science.* 1992 Jul 257(5069):539-542.
31. Krakauer, T. Interleukin-8 production by human monocytic cells in response to staphylococcal exotoxins is direct and independent of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J. Infect. Dis.* 1998 Ago 178(2):573-577, doi: 10.1086/517477.
32. Opal, S.M.; J. Cohen. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit. Care Med.* 1999 Ago 27(8):1608-1616.
33. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive responses. *Nature Immunol.* 2002 Nov 3(11):1033-1040.
34. Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* 1994 Jul 62(7):2715-2721,
35. Mattsson E, Verhage L, Roloff J, Fleer A, Verhoef J, van Dijk H. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1993 Jul 62(7):281-287, doi: 10.1111/j.1574-695X.1993.tb00409.x.
36. Timmerman CP, Mattsson E, Martinez-Martinez L, De Graaf L, Van Strijp JA, Verbrugh HA, Verhoef J, Fleer A. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect. Immun.* 1993 Oct 61(10):4167-4172.

37. Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA. *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to *Escherichia coli*. *J. Clin. Investig.* 1991 Jun 87(6):1925–1935, doi: 10.1172/JCI115218.
-