

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Sarah Antonieta de Oliveira Veríssimo

STAPHYLOCOCCUS AUREUS E STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES
ASSOCIADOS A VACAS LEITEIRAS: avaliação imunometabólica na relação
macrófago-bactéria em uma abordagem *in vitro*

BELO HORIZONTE

2022

Sarah Antonieta de Oliveira Veríssimo

STAPHYLOCOCCUS AUREUS E STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES
ASSOCIADOS A VACAS LEITEIRAS: avaliação imunometabólica na relação
macrófago-bactéria em uma abordagem *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

BELO HORIZONTE-MG

2022

V517s

Veríssimo, Sarah Antonieta de Oliveira, 1990 -
staphylococcus aureus e *staphylococcus chromogenes* associados a vacas leiteiras: avaliação imunometabólica na relação macrófago-bactéria em uma abordagem in vitro / Sarah Antonieta de Oliveira Veríssimo. -2022.

138 f. il

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Coorientadores: Fernando Nogueira de Souza

Eduardo Milton Ramos Sanchez

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Bibliografias: f. 131 a 137.

1. Bovino de leite - Teses - 2. Leite - Qualidade - Teses - 3. Bactérias produtoras de ácido láctico - Teses - I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho - II. Souza, Fernando Nogueira de - III. Sanchez, Eduardo Milton Ramos - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD - 664

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes - CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

SARAH ANTONIÊTA DE OLIVEIRA VERÍSSIMO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aprovado(a) em 29 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira - Orientador(a)

Dr.(a). Débora Cristina Sampaio de Assis

Dr.(a). Marcos Xavier Silva

Dr.(a). Alessandro de Sá Guimarães

Dr.(a). Luiza de Campos Reis



Documento assinado eletronicamente por **Monica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, Membro de comissão**, em 03/08/2022, às 08:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Xavier Silva, Professor do Magistério Superior**, em 07/08/2022, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandro de Sá Guimarães, Usuário Externo**, em 08/08/2022, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiza de Campos Reis, Usuária Externa**, em 09/08/2022, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Debora Cristina Sampaio de Assis, Professora do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1627614** e o código CRC **21E2D05F**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar em todos os momentos difíceis dessa caminhada.

Aos meus pais, Ronan e Magali, agradeço ao amor e suporte incondicional que me foi dado por toda minha vida.

À minha irmã Camila, obrigada por seu carinho e por sempre poder contar com sua amizade e colo.

Ao Leandro, que em todos esses anos juntos, sempre se fez tão companheiro e amoroso comigo. Obrigada por todo amor e apoio que você me deu, e que sem dúvidas, foram imprescindíveis para a conclusão desse trabalho.

A todos meus amigos e familiares, que de alguma forma, me ajudaram a chegar até aqui.

A minha orientadora, Profa. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, que desde a graduação é meu grande exemplo de profissionalismo e caráter. Sempre serei grata pela oportunidade de ter aprendido tanto com você. Muito obrigada por tanto carinho.

Ao meu coorientador, Prof. Marcelo Resende de Souza, obrigada pela parceria desde o mestrado e por sempre ser tão disponível e atencioso comigo ao longo da minha caminhada acadêmica. Sempre serei grata por toda sua ajuda.

Ao meu coorientador, Fernando Nogueira de Souza, por sempre ser tão presente e atencioso comigo, me ajudando em tudo que eu precisasse. Muito obrigada por todo apoio nesses anos juntos.

Ao meu coorientador, Eduardo Milton Ramos Sanchez, a Luiza Campos Reis e a Profa. Hiro Goto que me receberam no IMT-USP e sem os quais seria impossível a realização desse trabalho. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por toda ajuda nesses últimos anos.

À Profa. Soraia Diniz que me auxiliou com o delineamento estatístico e análise de dados. Muito obrigada pela atenção e disposição em me ajudar.

Ao José Augusto Ferronato e a Kamila Reis Santos por me por me auxiliarem em todas as fases do experimento que foram realizadas na FMVZ-USP. Foi um prazer conhecer vocês e muito obrigada por toda ajuda.

À Bernardina Amorin Uscata, que além de me auxiliar na realização de todo experimento, fez minhas idas a São Paulo mais leves com nossas conversas e risadas. Obrigada de coração, sem sua ajuda tudo seria ainda mais difícil. Saiba que pode sempre contar comigo.

À Escola de Veterinária da UFMG e todos seus membros, por estarem comigo durante toda minha caminhada acadêmica.

A FMVZ e IMT-USP por proporcionarem a realização desse projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro do projeto e à CAPES pela concessão da bolsa.

À banca examinadora, pelas sugestões e críticas.

“Quando a circunstância é boa, devemos desfrutá-la; quando não é favorável, devemos transformá-la e quando não pode ser transformada, devemos transformar a nós mesmos.”
(Viktor Frankl)

RESUMO

A mastite causa grandes impactos na saúde única devido aos prejuízos socioeconômicos, ambientais e problemas de saúde pública. Desse modo, aumentam-se os gastos em tratamentos, mão-de-obra, reduz-se a produção leiteira, além da perda precoce do animal e diminuição do preço pago pela qualidade do leite. O objetivo desse trabalho foi avaliar como distintos isolados de estafilococos associados a bovinos modulam o imunometabolismo de células macrófágicas da linhagem RAW 264.7 em uma infecção experimental *in vitro* e como essas induzem a expressão de PD-1 e PDL-1 numa relação macrófago-bactéria. Para tal usamos quatro isolados, dois de *S. aureus* (um de nicho extramamário – SN/spa t098; e um originário de infecção intramamária persistente – IM/spa t605) e dois de *S. chromogenes* (um obtido a partir do ápice do teto de uma novilha - TA; e outro originário de infecção intramamária persistente - IM). A produção de óxido nítrico (NO) foi mediada pela Reação de Griess e a expressão dos genes *iNOS*, *arginase*, *NLRP3*, *IL-1 β* , *IL-18*, *Bax*, *Bcl2*, *IDO* e *Cat-2B* foram avaliadas por qPCR. Além disso, a expressão do receptor de morte programada-1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1) e a viabilidade celular foram determinadas por citometria de fluxo. Os testes estatísticos usados foram Kruskal Wallis para os dados de qPCR, teste de Friedman para produção de NO e teste Duncan para os dados de citometria de fluxo. Verificou-se que os isolados de estafilococos modulam o imunometabolismo de células RAW 264.7 de formas distintas. A expressão relativa do gene *iNOS* foi maior durante a infecção por isolados distintos de estafilococos quando comparados com o controle, enquanto a expressão relativa do gene *arginase* foi maior do que o controle apenas com *S. aureus* com infecção de 180 min. A produção de NO foi inibida em macrófagos com infecção de *S. aureus* IM e esse composto foi degradado na infecção de *S. chromogenes* TA. Na infecção com todos os estafilococos foi observada ativação do inflamassoma, mas em nenhuma houve a expressão de mRNA de *IL-18*. A expressão do gene pró-apoptótico *Bax* foi maior por *S. chromogenes* IM com infecção de 90 min. Já para *Bcl2*, um gene anti-apoptótico, foi observada maior expressão desse gene em macrófagos infectados com *S. aureus* SN aos 180 min. Devido à baixa qualidade da curva de dissociação e altos valores de C_t na análise de qPCR, a expressão de *IDO* e *Cat-2B* não foi avaliada. Uma porcentagem maior de macrófagos que expressam PD-1 em células RAW 264.7 foi observada durante a infecção por estafilococos independentemente do isolado estudado, indicando mecanismos de evasão desses isolados. Em relação a PD-L1, apenas *S. aureus* IM levou à indução de um discreto aumento na porcentagem de macrófagos que expressam esse gene em relação ao controle (basal). O GMFI de PD-1 foi associado positivamente com a multiplicidade da infecção, enquanto não houve efeito sobre GMFI de PD-L1.

Palavras-chave: mastite, óxido nítrico, inflamação, inflamassoma, pontos de controle imunológicos.

ABSTRACT

Mastitis causes has a great one health concern with negative implications to socioeconomic, environmental and public health. As a result, treatments costs and labor time increase, while milk yield reduces in addition to the early culling and lower price paid for the milk quality. The study aimed to investigate how distinct bovine-associated staphylococci modulate the immunometabolism response of the macrophage RAW 264.7 cell line in experimental *in vitro* infection and how these induce the PD-1 and PDL-1 expression in a macrophage-bacteria relationship. Four isolates were used, two different *S. aureus* (one from an extramammary niche – SN/spa t098; and one originating from persistent intramammary infection – IM/spa t605) and two dissimilar from *S. chromogenes* (one obtained from the apex of the teat of a heifer - TA; and another one from persistent intramammary infection - IM). Here, the production of oxide nitric (NO) was measured by Griess reaction, and the expression of *iNOS*, *arginase*, *NLRP3*, *IL-1 β* , *IL-18*, *Bax*, *Bcl2*, *IDO* and *Cat-2B* genes were assessed by qPCR. Furthermore, the expression of programmed death receptor-1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) and cell viability was determined flow cytometry. The statistical tests used were Kruskal Wallis for qPCR data, Friedman test for NO production, and for flow cytometry data was used the Duncan test. We observed that the studied staphylococcal isolates modulate the immunometabolism of RAW 264.7 cells in different ways. The relative expression of the *iNOS* gene was higher during the infection by distinct staphylococci strains than control, while the relative expression of the *arginase* gene was higher only under *S. aureus* infection after 180 min. The NO production was inhibited in macrophages under *S. aureus* IM infection and this compound was degraded during *S. chromogenes* TA infection. In infection with all staphylococci, activation of the inflammasome was observed, but in none induce the expression of *IL-18* mRNA; The proapoptotic *Bax* gene expression was higher under *S. chromogenes* IM infection at 90 min. The highest expression of the anti-apoptotic *Bcl2* gene was observed in macrophages infected with *S. aureus* SN at 180 min. Due to the poor quality in the dissociation curve and high C_t values in the qPCR analysis, *IDO* and *Cat-2B* expression could not be assessed. A higher percentage of macrophages that expressed PD-1 in RAW 264.7 cells was observed during staphylococci infection independently of the studied strain than control, indicating critical mechanisms of evasion of these isolates. Regarding PD-L1, only *S. aureus* IM led to the induction of a slight increase in the percentage of macrophages that express PD-L1 relative to control (baseline). The GMFI of PD-1 was positively associated with the multiplicity of infection, while it has no effect on the GMFI of PD-L1.

Keywords: mastitis, nitric oxide, inflammation, inflammasome, immune checkpoints.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Diagrama de modelo molecular das vias de ativação de macrófagos M1 e M2	24
Figura 2	Tipos de sinalização para ativação de macrófagos M1	25
Figura 3	Tipos de sinalização para ativação de macrófagos M2	27
Figura 4	Vias metabólicas em macrófagos	30
Figura 5	Sinais metabólicos gerados em M1	33
Figura 6	Estrutura química da arginina	38
Figura 7	Metabolismo de arginina via <i>iNOS</i> ou arginase	40
Figura 8	Regeneração da arginina e anaplerose do ciclo de Krebs	44
Figura 9	Diferentes mecanismos da defesa imune inata	46
Figura 10	Infiltrado de neutrófilos no lúmen das glândulas mamárias (setas brancas). A - Infiltrado de neutrófilos devido a <i>S. chromogenes</i> de infecção mamária persistente; B - Infiltrado de neutrófilos devido a <i>S. chromogenes</i> de ápice do teto; C - Infiltrado de neutrófilos devido a <i>S. fleuretti</i> . Todas as imagens estão na mesma escala	52
Figura 11	Modulação da resposta do sistema imune humoral pela SpA	56
Figura 12	Representação esquemática das diferentes interações de antígenos e superantígenos com a molécula de MHC classe II na APC e no receptor de células T	58
Figura 13	Imunometabolismo de PD-1 e PD-L1 em macrófagos	62

Capítulo 2

Figura 1	Expressão relativa do gene <i>iNOS</i> em infecção experimental de células RAW 264.7 com <i>S. aureus</i> IM, <i>S. aureus</i> SN, <i>S. chromogenes</i> IM e <i>S. chromogenes</i> TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito do tempo de infecção na expressão relativa do gene <i>iNOS</i> . B - Comparação entre tempo e bactéria na expressão relativa do gene <i>iNOS</i> . $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de <i>swab</i> nasal; TA = isolado de ápice do teto	97
Figura 2	Expressão relativa do gene <i>arginase</i> em infecção experimental de células RAW 264.7 com <i>S. aureus</i> IM, <i>S. aureus</i> SN, <i>S. chromogenes</i> IM e <i>S. chromogenes</i> TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa de arginase. B - Comparação entre tempo e bactéria na expressão relativa de arginase. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de <i>swab</i> nasal; TA = isolado de ápice do teto	97

- Figura 3** Produção de óxido nítrico (NO) em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A – Efeito do tempo na produção de óxido nítrico. B – Efeito da bactéria na produção de NO. C – Efeito da interação entre bactéria e tempo na produção de NO. $P < 0,05$ e teste de Friedman. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto 98
- Figura 4** Expressão relativa do gene *NLRP3* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A – Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *NLRP3*. B – Efeito do tempo na expressão relativa do gene *NLRP3*. C – Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *NLRP3*. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto 99
- Figura 5** Expressão relativa do gene *IL-1 β* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *IL-1 β* . B - Efeito do tempo na expressão relativa do gene *IL-1 β* . C - Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *IL-1 β* . $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto 100
- Figura 6** Expressão relativa do gene *IL-18* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *IL-18*. B - Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *IL-18*. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto 101
- Figura 7** Expressão relativa do gene *Bax* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *Bax*. B - Efeito do tempo na expressão relativa do gene *Bax*. C - Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *Bax*. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto 102

Figura 8	Expressão relativa do gene <i>Bcl2</i> em infecção experimental de células RAW 264.7 com <i>S. aureus</i> IM, <i>S. aureus</i> SN, <i>S. chromogenes</i> IM e <i>S. chromogenes</i> TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa do gene <i>Bcl2</i> . B - Efeito do tempo na expressão relativa do gene <i>Bcl2</i> . C - Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene <i>Bcl2</i> . $P < 0,05$, ANOVA e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de <i>swab</i> nasal; TA = isolado de ápice do teto	103
-----------------	---	-----

Capítulo 3

Figura 1	A – Imagem de macrófagos sem infecção. B – Imagem de macrófagos com infecção com <i>S. aureus</i> SN com MOI 10	121
Figura 2	Porcentagem de macrófagos que expressam receptor de morte programada (PD-1) em infecção experimental de células RAW 264.7 com <i>S. aureus</i> IM, <i>S. aureus</i> SN, <i>S. chromogenes</i> IM e <i>S. chromogenes</i> TA, em dois tempos de infecção, 3h e 6h. A - Efeito da bactéria na porcentagem de macrófagos que expressam PD-1. B – Efeito do tempo na porcentagem de macrófagos que expressam PD-1. C – Efeito da interação da bactéria e do tempo na porcentagem de macrófagos que expressam PD-1. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de <i>swab</i> nasal; TA = isolado de ápice do teto	123
Figura 3	Intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) da expressão do receptor de morte programada (PD-1) em macrófagos em infecção experimental de células RAW 264.7 com <i>S. aureus</i> IM, <i>S. aureus</i> SN, <i>S. chromogenes</i> IM e <i>S. chromogenes</i> TA, em dois tempos de infecção, 3h e 6h. A - Efeito da bactéria na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-1. B - Efeito do MOI na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-1. C – Efeito do tempo na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-1. D – Efeito da interação da bactéria e do tempo na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-1. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de <i>swab</i> nasal; TA = isolado de ápice do teto.	124

Figura 4	Porcentagem de macrófagos que expressam o ligante do receptor de morte programada (PD-L1) em infecção experimental de células RAW 264.7 com <i>S. aureus</i> IM, <i>S. aureus</i> SN, <i>S. chromogenes</i> IM e <i>S. chromogenes</i> TA, em dois tempos de infecção, 3h e 6h. A - Efeito da bactéria na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1. B - Efeito do tempo na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1. C – Efeito do MOI na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1. D – Efeito da interação da bactéria e do MOI na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de <i>swab</i> nasal; TA = isolado de ápice do teto	125
Figura 5	Intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) da expressão do ligante do receptor de morte programada (PD-L1) em macrófagos em infecção experimental de células RAW 264.7 com <i>S. aureus</i> IM, <i>S. aureus</i> SN, <i>S. chromogenes</i> IM e <i>S. chromogenes</i> TA, em dois tempos de infecção, 3h e 6h. A - Efeito da bactéria na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-L1. B – Efeito do tempo na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PDL-1. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de <i>swab</i> nasal; TA = isolado de ápice do teto.	126
Figura 6	Médias \pm erro-padrão da viabilidade dos macrófagos em infecção de células RAW 264.7 com <i>S. aureus</i> IM, <i>S. aureus</i> SN, <i>S. chromogenes</i> IM e <i>S. chromogenes</i> TA. A – Efeito da bactéria na viabilidade dos macrófagos	127

LISTA DE QUADROS

Capítulo 2

Quadro 1	Sequência de iniciadores (<i>primers</i>) de amplificação, utilizados na qPCR	94
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AASS	Aspartano succinato
ACME	Elemento móvel catabólico de arginina
ADC	Arginina descarboxilase
ADI	Arginina deiminase
AG	Ácidos graxos
AGAT	Arginina:glicina aminotransferase
Arg	Arginina
AMP	Peptídeos antimicrobianos
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
ASL	Arginossuccinato liase
ASS1	Arginossuccinato sintase 1
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
BMDM	Macrófagos derivados de medula óssea
CARKL	<i>Carbohydrate kinase like</i>
CAT	Transportadores de aminoácidos
CCS	Contagem de células somáticas
cDNA	DNA complementar
CPT-1	Carnitina palmitol transferase 1
DGAT	Diacilglicerol O-acetiltransferase
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
ERK	Sinal extracelular regulado por quinase
ERN	Espécies reativas a oxigênio
ERO	Espécies reativas a oxigênio
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GMFI	Intensidade da fluorescência média geométrica
GPT	Transaminase glutâmico-pirúvica
HIF	Fatores induzíveis por hipóxia
HRE	Elementos de resposta a hipóxia
ICL	Isocitrato da enzima liase
IDH	Isocitrato desidrogenase
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível

IM	Infecção intramamária
IRF	Fatores reguladores de interferon
JAK	<i>Janus Kinase</i>
KG	Cetogluturato
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Lectina ligante de manose
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MDSC	Células supressoras derivadas de mieloides
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	MicroRNA
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOD	<i>NOD like receptor</i>
NOHA	N-hidroxi-L-arginina
NOS	Óxido nítrico sintase
ODC	Ornitina descarboxilase
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD	Proteína de morte celular programada
PDH	Piruvato desidrogenase
PDK	Piruvato desidrogenase quinase
PD-L	Ligante da proteína de morte celular programada
PG	Prostaglandina
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PPP	Via das pentoses-fosfato
PSM	Modulinas solúveis em fenol
qPCR	Reação em cadeia polimerase em tempo real
RET	Transporte de elétrons reverso
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sbi	Proteína de ligação a imunoglobulina
SDH	Succinato desidrogenase
SFB	Soro Fetal Bovino
SN	<i>Swab</i> nasal
SNA	<i>Staphylococcus não-aureus</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SpA	Proteína estafilocócica A
TA	Ápice do teto

TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TCR	Receptor de células T
TGF	Fator de transformação do crescimento
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TSST-1	Toxina 1 da síndrome do choque tóxico
UCP2	Proteína desacopladora 2

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
Capítulo 1: Vias metabólicas em macrófagos na resposta imune e modulação imunometabólica de <i>Staphylococcus</i> spp: Revisão Bibliográfica		22
1.	Vias metabólicas em macrófagos na resposta imune	23
1.2	Estímulos M1	24
1.3	Estímulos M2	26
1.4	Vias metabólicas em macrófagos	28
1.4.1	Glicólise	29
1.4.2	Vias das pentoses-fosfato (PPP)	31
1.4.3	Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou Ciclo de Krebs	31
1.4.3.1	Metabólitos: succinato, citrato e ácido itacônico	33
1.4.4	Cadeia de transporte de elétrons (CTE) e fosforilação oxidativa	35
1.4.5	Síntese de ácidos graxos e oxidação beta	36
1.5	Metabolismo de arginina no sistema imune	37
1.5.1	Arginina	37
1.5.2	Transporte de arginina	39
1.5.3	Metabolismo de arginina em macrófagos	40
1.5.3.1	Arginina e macrófagos M1	41
1.5.3.2	Arginina e macrófagos M2	42
1.5.4	Regeneração de arginina em células imunes	43
2.	Modulação imunometabólica de <i>Staphylococcus</i> spp.	45
2.1	Imunidade inata	45
2.1.1	Barreira epitelial	45
2.1.2	A importância do TLR (<i>Toll-like receptor-2</i>)	46
2.1.3	Ativação do inflamassoma e citocinas IL-18 e IL-1 β	47
2.1.4	Fagócitos e suas funções	49
2.1.4.1	Mastócitos	50
2.1.4.2	Macrófagos	50
2.1.4.3	Neutrófilos	51
2.1.4.4	Células dendríticas: indução de células dendríticas tolerantes	53
2.1.4.5	Células supressoras derivadas de mielóides (MDSC)	53
2.2	Imunidade adaptativa	54
2.2.1	Células B e anticorpos	54
2.2.2	Mecanismos de evasão da resposta humoral	55
2.2.3	Células T	57
2.2.3.1	Células Th1	58
2.2.3.2	Células Th2	59
2.2.3.3	Células Th3	60
2.2.3.4	Células T Reguladoras	61
2.3	PD-1 e seus ligantes	61
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Capítulo 2: Avaliação imunometabólica de macrófagos desafiados por distintos isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus chromogenes* associados a vacas leiteiras 89

1.	INTRODUÇÃO	90
2.	MATERIAL E MÉTODOS	91
2.1	Isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. e condições de crescimento	92
2.2	Cultivo de células RAW da linhagem 264.7	90
2.3	Desafio bacteriano com amostras de <i>Staphylococcus</i> spp.	93
2.4	Quantificação de mRNA de <i>IDO1</i> , <i>IL-1β</i> , <i>IL-18</i> , <i>NLRP3</i> , <i>Nos2</i> , <i>Arg-1</i> , <i>Cat-2B</i> , <i>Bax</i> e <i>Bcl2</i>	93
2.4.1	Purificação de RNA	93
2.4.2	Obtenção do cDNA	94
2.4.3	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	94
2.5	Dosagem de óxido nítrico	95
2.6	Análises estatísticas	96
3.	RESULTADOS	96
3.1	Expressão relativa dos genes <i>iNOS</i> , arginase e produção de NO	96
3.2	Expressão relativa dos genes <i>NLRP3</i> , <i>IL-1β</i> e <i>IL-18</i>	99
3.3	Expressão relativa dos genes <i>Bax</i> e <i>Bcl2</i>	101
3.4	Expressão relativa dos genes <i>IDO</i> e <i>Cat-2B</i>	103
4.	DISCUSSÃO	103
5.	CONCLUSÕES	108
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

Capítulo 3: Avaliação da expressão do receptor de morte programada-1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1) em macrófagos desafiados por distintos isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus chromogenes* associados a vacas leiteiras 116

1.	INTRODUÇÃO	117
2.	MATERIAL E MÉTODOS	118
2.1	Isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. e condições de crescimento	118
2.2	Cultivo de células RAW da linhagem 264.7	119
2.3	Desafio bacteriano com amostras de <i>Staphylococcus</i> spp.	120
2.4	Detecção de viabilidade celular e expressão de PD-1 e PD-L1	120
2.5	Análises estatísticas	122
3.	RESULTADOS	122
3.1	Porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 e intensidade da fluorescência média geométrica (GMFI) do PD-1	122
3.2	Porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1 e intensidade da fluorescência média geométrica (GMFI) do PD-L1	124
3.3	Viabilidade de macrófagos	126
4.	DISCUSSÃO	127
5.	CONCLUSÕES	130
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

1. INTRODUÇÃO

É de grande importância o conhecimento das doenças que acometem os rebanhos leiteiros, principalmente para monitorá-las e controlá-las adequadamente evitando-se prejuízos tanto nas fazendas quanto nos laticínios. Uma das doenças infecciosas mais comuns e dispendiosas na bovinocultura leiteira em todo o mundo é a inflamação na glândula mamária, denominada mastite (Barkema *et al.*, 2009).

A mastite causa grandes impactos na saúde única, como prejuízos socioeconômicos, ambientais e saúde pública. Devido a isso, aumentam-se os gastos em tratamentos, mão-de-obra, reduz-se a produção leiteira, além da perda precoce do animal e diminuição do preço pago pela qualidade do leite (Holland *et al.*, 2015). Ainda que tenha havido um grande progresso na compreensão das interações hospedeiro-patógeno, pelo emprego de novas práticas de manejo na fazenda e pelo desenvolvimento de novas ferramentas para o controle dessa doença, a mastite ainda é a doença mais comum e de maior impacto econômico da bovinocultura de leite (Ruegg, 2017; Aghamohammadi *et al.*, 2018).

A ocorrência da mastite relaciona-se a três diferentes fatores: ambiente, características inerentes ao animal e patógeno envolvido. A mastite pode ser de origem ambiental, quando os microrganismos não são adaptados ao animal e agem como oportunistas na glândula mamária, e também pode ter origem contagiosa, na qual os microrganismos são adaptados ao nicho mamário. Esses últimos são transmitidos a partir da própria glândula mamária infectada durante a ordenha pelos equipamentos e mãos do ordenhador (Jamali *et al.*, 2014). Embora a mastite possa ocorrer após trauma no úbere ou alguns distúrbios fisiológicos, na grande maioria das vezes, está relacionada a uma infecção bacteriana intramamária (Côté-Gravel e Malouin, 2019).

Devido a isso, com o aumento dos estudos moleculares, fica claro que para se diferenciar patógenos com perfil de mastite contagiosa e ambiental deve-se considerar o isolado e não a espécie do microrganismo (Souza *et al.*, 2019). Sabe-se que nos rebanhos do mundo inteiro circulam inúmeros isolados de *Staphylococcus aureus*, habitualmente responsáveis por casos de mastite subclínica, indicando perfil de mastite contagiosa (Sommerhäuser *et al.*, 2003; Ladeira *et al.*, 2019). Apesar disso, casos de mastite clínica têm sido prevalentemente causados por isolados de *S. aureus* distintos, ou seja, não relacionados à mastite subclínica (Ladeira *et al.*, 2019).

O gênero *Staphylococcus* é de grande importância para a saúde única e esse grupo se divide em *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus não aureus* (SNA). Devido à contaminação

humana, animal e ambiental, esses microrganismos são potencialmente encontrados em diversos hospedeiros e locais desde pastagens, glândulas mamárias, mãos, fossa nasal, entre outros (Prado *et al.*, 2015).

Staphylococcus aureus é considerado o patógeno mais importante relacionado à saúde da glândula mamária, sendo relatado em infecções clínicas e subclínicas (Lee *et al.*, 2012), e predomina em infecções sistêmicas em humanos (Harrison *et al.*, 2013). Fatores de virulência e a resistência aos antimicrobianos refletem na habilidade adaptativa que molda a capacidade dessa bactéria de causar padrões de doença em constante mudança, dificultando a formação da resposta imune gerada no hospedeiro (Tong *et al.*, 2015).

Sob outra perspectiva, *Staphylococcus* não-aureus (SNA), que era considerado um grupo homogêneo anteriormente – estafilococos coagulase-negativo, agora são os microrganismos mais frequentemente isolados em amostras de leite bovino, assepticamente coletadas em várias regiões do mundo (Condas *et al.*, 2017; Naqvi *et al.*, 2018; Nyman *et al.*, 2018). Além disso, esses microrganismos são conhecidos por infecções causadas em neonatos (Angelone *et al.*, 2006). Desse modo, esses patógenos estão ganhando grande importância, antes atribuída apenas ao *S. aureus*.

Diante disso, nas últimas décadas, uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que regulam a defesa inata e adaptativa contra esses patógenos tem sido investigada. Apesar de todos os esforços, é evidente a complexa interação das células imunes e os receptores para o desenvolvimento de uma resposta protetora direcionada pelo hospedeiro contra um patógeno específico e quais são os fatores determinantes na qualidade dessa resposta observada entre os indivíduos (Bagnoli *et al.*, 2018).

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

- Avaliar como distintos isolados de *Staphylococcus* spp. associados a vacas leiteiras modulam o imunometabolismo de células RAW 264.7 em uma infecção *in vitro* e como essas induzem a expressão do receptor de morte programada-1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1) numa relação macrófago-bactéria.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de genes, tais como *IDO1*, *IL-1 β* , *IL-18*, *NLRP3*, *iNOS*, *Arg1*, *Cat-2B*, *Bax* e *Bcl-2* por qPCR em uma infecção *in vitro* por dois isolados distintos de *Staphylococcus aureus* e dois isolados distintos de *Staphylococcus chromogenes* em células RAW da linhagem 264.7.
- Quantificar a produção de óxido nítrico induzida após a infecção *in vitro* por dois isolados distintos de *Staphylococcus aureus* e por dois isolados distintos de *Staphylococcus chromogenes* por células RAW da linhagem 264.7 pela Reação de Griess.
- Avaliar a indução da expressão de PD-1 e PD-L1 por citometria de fluxo em células RAW da linhagem 264.7 após infecção *in vitro* com dois isolados distintos de *Staphylococcus aureus* e dois isolados distintos de *Staphylococcus chromogenes*.

CAPÍTULO 1

**Vias metabólicas em macrófagos na resposta imune e modulação imunometabólica de
Staphylococcus spp.: Revisão Bibliográfica**

1. Vias metabólicas em macrófagos na resposta imune

Os macrófagos foram descritos pela primeira vez em 1908 por Elié Metchnikoff, biólogo de nacionalidade russa, que percebeu que larvas de estrelas-do-mar continham células que apresentavam papel importante na defesa contra microrganismos invasores. Essas células eram capazes de ingerir partículas estranhas, e esse processo foi denominado de fagocitose (Pacheco e Cardoso, 2012).

Com isso, a teoria de Metchnikoff foi nomeada de imunidade celular e foi comprovada quando ele introduziu um espinho de roseira numa larva e verificou que esse ficou rodeado de macrófagos (Pacheco e Cardoso, 2012). Inicialmente, essa teoria criou controvérsias na comunidade científica, mas, mais tarde foi aceita juntamente com a teoria da imunidade humoral, que tinha sido formulada, anos antes, por Paul Ehrlich. Assim, ambas as teorias se complementavam (Kaufmann, 2008).

Desde então, o macrófago é considerado uma célula de grande importância na resposta imune, uma vez que sua ativação influencia outros braços do sistema imune inato e adaptativo (Hao *et al.*, 2012). Essas células são caracterizadas por um fenótipo heterogêneo, devido a uma ampla distribuição tecidual e da diferenciação celular resultante das adaptações aos microambientes onde se localizam, além da resposta a muitos estímulos endógenos e exógenos (Gordon, 2007).

O conceito de ativação clássica e alternativa dos macrófagos, denominadas M1 e M2, para imitar a nomenclatura das células T *helper*, torna-se cada vez mais amplo. Existem muitas evidências de que inúmeros estímulos se combinam para determinar o fenótipo dessa célula. Os macrófagos M1 são gerados em resposta a estímulos como o interferon- γ (IFN- γ) e lipopolissacarídeos (LPS) e M2 são produzidos em respostas a interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13). Em geral, os macrófagos M1 são importantes nas infecções microbianas, produzindo óxido nítrico (NO) e citocinas inflamatórias. Por outro lado, o fenótipo M2 desempenha papel na regulação da inflamação e auxilia no reparo celular (Murray e Wynn, 2011).

Esses dois fenótipos de macrófagos também se diferem no seu metabolismo. O M1 se caracteriza por altos níveis de glicólise, fluxo pela via de pentoses-fosfato (PPP) e elevação de certos intermediários do ciclo de Krebs, incluindo succinato, citrato e ácido itacônico, além do aumento da síntese de ácidos graxos (Jha *et al.*, 2015). Em contraste, o metabolismo dos

macrófagos M2 compreende altos níveis de fosforilação oxidativa e oxidação de ácidos graxos (El Kasmi e Stenmark, 2015).

A definição de polaridade dos macrófagos em M1 e M2 surgiu antes da era genômica, quando alguns marcadores foram considerados para estabelecer diferenças e semelhanças nas respostas de macrófagos aos estímulos. Atualmente, o conhecimento da sinalização das citocinas, do papel dessas no desenvolvimento hematopoiético e análises proteômicas revelam quadro complexo para a ativação dessas células (Martinez e Gordon, 2014). Outros mecanismos como microRNAs (Etzrodt *et al.*, 2012; Swaminathan *et al.*, 2013) e RNAs (Santa *et al.*, 2010) também interferem na ativação de macrófagos. Um resumo dos tipos de ativação dos macrófagos pode ser entendido melhor na Figura 1.

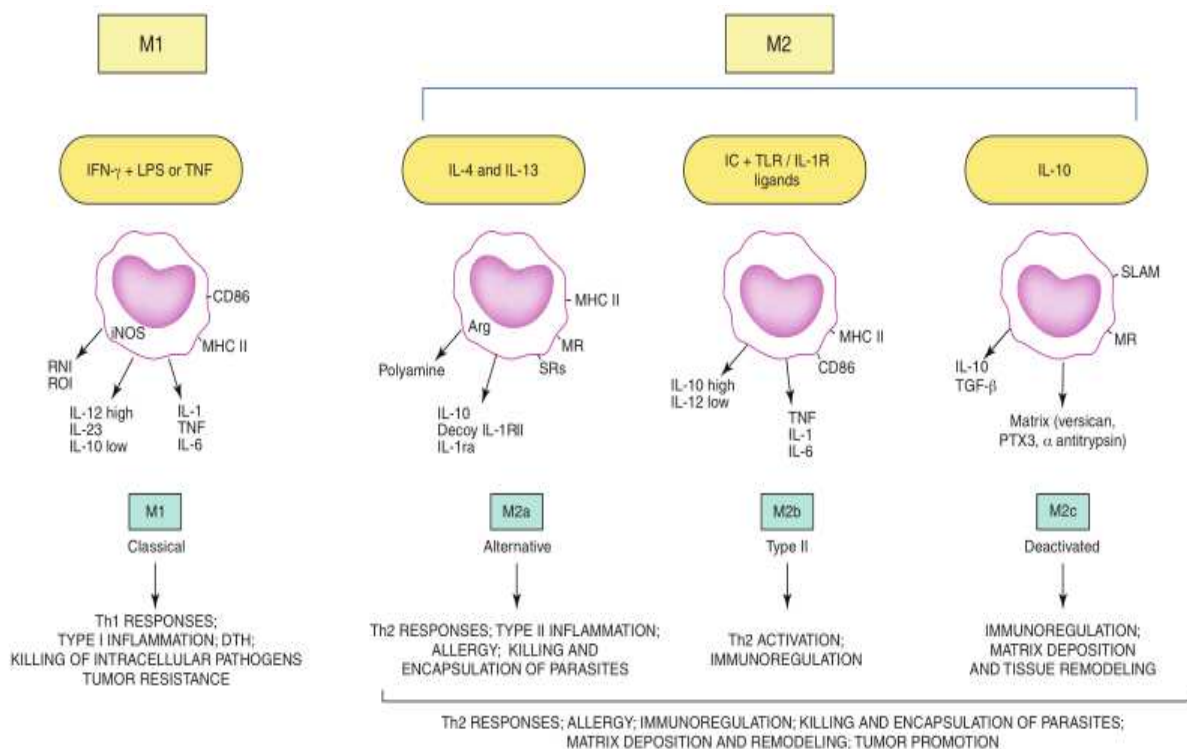


Figura 1. Diagrama de modelo molecular das vias de ativação de macrófagos M1 e M2.
Fonte: Mantovani *et al.* (2004)

1.2 Estímulos M1

Os estímulos M1 são agrupados de acordo com sua capacidade de induzir respostas inflamatórias e marcadores, mas sua fonte, função, receptores e vias de sinalização diferem

muito. O IFN- γ é a principal citocina associada a ativação de M1 e Th1 é o principal produto celular. Outras células como células *Natural Killer* (NK) e os próprios macrófagos também produzem essa citocina. Os receptores vinculados ao IFN- γ são os IFNGR-1 e IFNGR-2 que recrutam os adaptadores *Janus Kinase* (JAK 1 e JAK 2) e esses ativam o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1) e também os fatores reguladores de interferon (IRF), como IRF-1 e IRF-8 (Figura 2) (Hu e Ivashkiv, 2009).

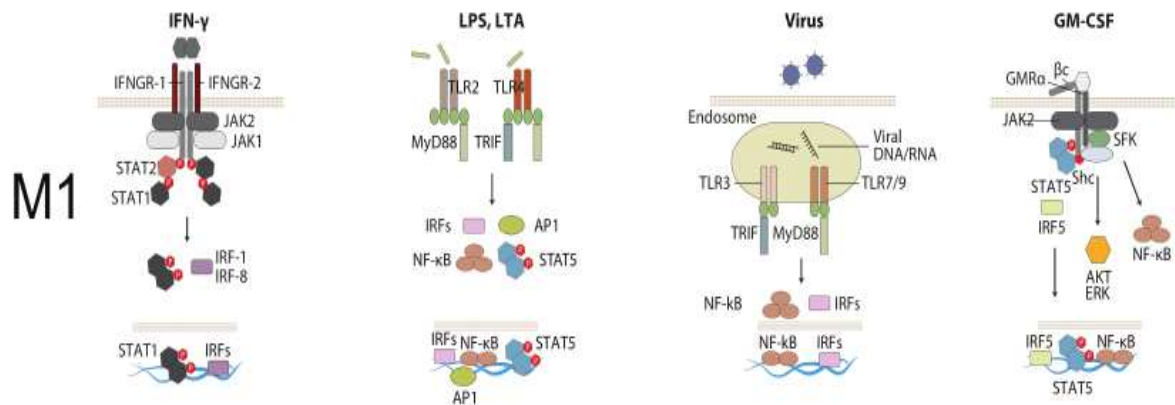


Figura 2. Tipos de sinalização para ativação de macrófagos M1.

Fonte: Martinez e Gordon (2014)

O IFN- γ controla a expressão gênica de receptores de citocinas (CSF2RB, receptor IL-15 α , IL2RA e IL6R), marcadores de ativação celular (CD36, CD38, CD39 e CD97) e células de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), ITG4, mucina 1 (MUC1), entre outros (Waddell *et al.*, 2010).

Em estudos realizados, foi mostrado que camundongos *knockout* para IFN- γ ou seus receptores se demonstraram viáveis e férteis e com números de macrófagos estacionários normais. No entanto, foi constatado que os macrófagos desses animais possuíam uma produção menor de antimicrobianos, levando esses camundongos a serem susceptíveis a infecções por *Mycobacterium bovis* e *Listeria monocytogenes* (Dalton *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993). Nos humanos com imunodeficiência de expressão do receptor de IFN- γ , notou-se uma deficiência imune grave, uma vez que houve aumento da susceptibilidade aos microrganismos, como micobactérias (Dorman e Holland, 2000).

Outro estímulo M1 é o LPS que é reconhecido por *Toll like receptor*, TLR4 e TLR2 (Figura 2), embora haja evidências que o LPS também possa ser reconhecido independentemente desses receptores específicos (Hangar *et al.*, 2013). Normalmente, a ativação de TLR4 induz ativação

da proteína MyD88 e molécula adaptadora associada a receptores *Toll-like* (MaL/Tirap) por fosforilação, e leva também uma sinalização celular para à produção e liberação de citocinas inflamatórias, como IFN- β , IL-12, Fator de Necrose Tumoral (TNF), IL-6, e IL-1 β . Esse receptor também é responsável pela ativação da produção de quimiocinas, moléculas apresentadoras de antígenos, como membros do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), moléculas coestimuladoras e peptidases de processamento de antígenos (Hu e Ivashkiv, 2009). Casanova *et al.* (2008) demonstraram que camundongos com mutações genéticas na família TLR possuem maior susceptibilidade a infecções por micobactérias, pneumococos, meningococos e maiores chances de desenvolver bacteremia.

Já o estímulo M1 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) é produzido por uma variedade de células, como macrófagos e células do parênquima. O receptor de GM-CSF recruta JAK 2, que conduz a ativação do STAT5, da quinase regulada por sinal extracelular (ERK), bem como a translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B e IRF5 (Figura 2) e isso desencadeia a expressão de genes (Krausgruber *et al.*, 2011). O GM-CSF melhora a apresentação de antígenos, a fagocitose mediada por complemento e anticorpo, capacidade antimicrobiana e quimiotaxia de leucócitos. O GM-CSF induz monócitos e macrófagos a produzir citocinas como IL-6, IL-8, G-CSF, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), TNF e IL-1 β , mas em menores quantidades do que LPS, por exemplo (Lehtonen *et al.*, 2007). Dirksen *et al.* (1998) relataram que humanos com mutações no receptor de GM-CSF, especialmente na cadeia β comum, apresentaram falhas na ação de macrófagos alveolares.

Além disso, existem outros estímulos M1 que compartilham propriedades pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 β e IL-6. Esse fato traz heterogeneidade a esse grupo que também compreendem produtos bacterianos e determinadas linhagens de citocinas (Martinez e Gordon, 2014).

1.3 Estímulos M2

A ativação M2 compreende diferentes tipos de estímulos, que foram demonstrados inicialmente a partir de estimulação com IL-4 ou IL-13, e isso ocorreu, principalmente, devido a capacidade dessas interleucinas de antagonizar respostas inflamatórias e marcadores. Essas são produzidas pelas células Th2, eosinófilos, basófilos ou macrófagos e são reconhecidas por três pares de receptores diferentes. IL-4Ra1 pode emparelhar com a cadeia gama comum, permitindo a

ligação com IL-4 e a cadeia IL13Ra1 ativa a ligação com IL-4 ou IL-13. A ligação nos receptores de IL-4 ativa JAK 1 e JAK 3. Essa ativação é denominada M2a (Figura 3) (Martinez e Gordon, 2014).

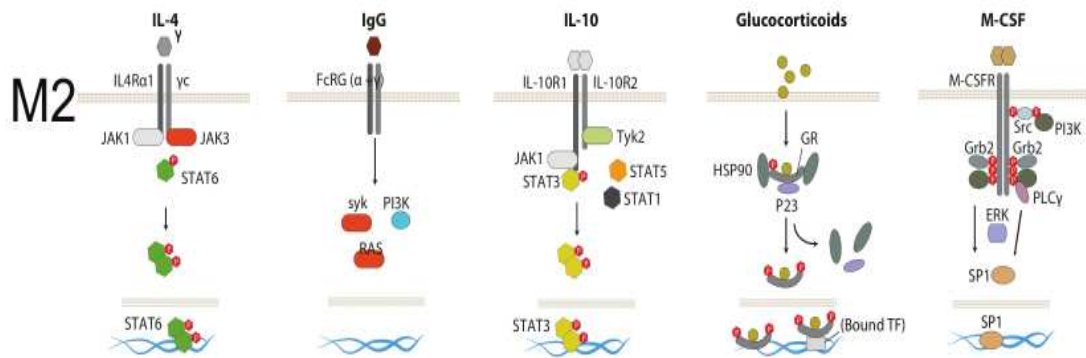


Figura 3. Tipos de sinalização para ativação de macrófagos M2.
Fonte: Martinez e Gordon (2014)

Nesse contexto, sabe-se que a IL-4 induz a fusão de macrófagos e diminui a fagocitose. Em camundongos *knockout* para essa interleucina o número de macrófagos maturados são normais, mas esses animais demonstraram problemas na resposta imune contra nematódeos e algumas infecções virais (van Dyken e Locksley, 2013). Já nos seres humanos, polimorfismos no IL-4R tem sido associada ao desenvolvimento de asma e atopia (Ford *et al.*, 2009).

Outra categoria de estímulo é o M2b, que é o único exemplo de *crossstalk* com as células B. O IgG é reconhecido pelo Fc γ , família de receptores que inclui Fc γ RI ativador (CD64), Fc γ RIIA inibitório (CD32), Fc γ RIIIA ativador (CD16a) e Fc γ RIIIB (CD16b). O CD32 parece ser crucial para a ativação do M2b em macrófagos humanos. Esses macrófagos são distintos dos macrófagos ativados por IL-4 e seus perfis de expressão se sobrepõem apenas parcialmente (Sorini *et al.*, 2006).

Estímulos com glucocorticóides e IL-10 estão incluídos na categoria M2c, embora representem um tipo muito diferente de estímulo. Os glucocorticóides ativos são lipofílicos e difundem através da membrana para ligar o receptor de glucocorticóides α (GCR α) (Figura 3) levando à translocação do complexo (Ehrchen *et al.*, 2007). Ratos com deficiência de GCR não sobrevivem por muito tempo após o nascimento, por insuficiência respiratória e pelo aumento da susceptibilidade à septicemia (Kleiman *et al.*, 2012). Bray e Cotton (2003) demonstraram que humanos com polimorfismos nesse receptor apresentam distúrbios inflamatórios e autoimunes.

Desse modo, a IL-10 se liga aos receptores IL10R1 e IL10R2 (Figura 3). Reações de autofosforilação do receptor levam à ativação do fator de transcrição STAT3 e isso irá mediar a inibição de citocinas pró-inflamatórias. A IL-10 é produzida praticamente por todos os leucócitos, e nos macrófagos é desencadeada em resposta a ativação de TLRs, glucocorticóides e lectina do tipo C, como por exemplo a *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN) (codificada pelo gene CD209). É importante também ressaltar que a IL-10 é um potente inibidor das células Th1 (Park-Min *et al.*, 2005).

O M-CSF também é considerado outro tipo de estímulo M2. O receptor de fator 1 estimulador de colônias em macrófagos (M-CSFR) é um receptor de tirosina quinase (Figura 3), e a ligação entre eles leva à ativação de Sinal Extracelular Regulado por Quinase (ERK), fosfolipase C, fosfatidilinositol 3-quinases, entre outros fatores. A resposta transcricional ao M-CSF inclui genes transitórios com excesso de representação dos genes do ciclo celular, como por exemplo, ciclinas A2, B1, D1 e E1 (Martinez *et al.*, 2006). Camundongos mutantes para M-CSF mostraram níveis reduzidos de monócitos e macrófagos. Já em humanos, essas mutações resultaram em síndrome mielodisplásicas, leucemia mieloide aguda e leucoencefalopatia difusa hereditária (Rademarkers *et al.*, 2012).

1.4 Vias metabólicas em macrófagos

Em geral, macrófagos M1 são importantes em infecções bacterianas e são considerados mais inflamatórios. Desse modo, foi demonstrado que essas células produzem citocinas inflamatórias e óxido nítrico (NO) (Murray e Wynn, 2011). Macrófagos M2, por outro lado, desempenham um papel na regulação da inflamação e no processo de reparo celular. Esses fenótipos de macrófagos também se diferem no seu metabolismo celular (Pearce e Pearce, 2013).

Dessa forma, o metabolismo nos macrófagos M1 é caracterizado por altos níveis de glicólise e fluxo pela via PPP e elevação em certos intermediários do ciclo de Krebs, incluindo succinato, citrato e ácido itacônico, aumentando também a síntese de ácidos graxos (Viola *et al.*, 2019). Esses metabólitos atuam como sinais para alterar a função celular M1 (Jha *et al.*, 2015). Em contraste, os metabólitos dos macrófagos M2 compreendem altos níveis de oxidação de ácidos graxos e fosforilação oxidativa (El Kasmi e Stenmark, 2015).

1.4.1 Glicólise

A regulação positiva da glicólise nos macrófagos ativados foi observada várias décadas atrás (Alonso e Nungester, 1956; Oren *et al.*, 1963), mas foi apenas anos depois, que os mecanismos que controlam o processo e as funções dessa mudança metabólica nos macrófagos foram evidenciados. Um aumento agudo da taxa de glicólise está intimamente associado a um fenótipo inflamatório em macrófagos. Foi demonstrado que a administração de 2-desoxiglucose (2-DG), uma molécula que não pode sofrer glicólise, bloqueia muitos aspectos do processo inflamatório M1, incluindo fagocitose mediada por opsonina (Pavlou *et al.*, 2017), secreção de citocinas pró-inflamatórias e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas a nitrogênio (ERN) (Freemerman *et al.*, 2014).

Em contrapartida, macrófagos ativados alternativamente (M2), empregam fosforilação oxidativa ao invés de glicólise como fonte principal de ATP. O rápido aumento da captação de glicose por M1 é facilitada pela regulação positiva do transportador de glicose 1 (GLUT1) (Figura 4) (Freemerman *et al.*, 2014). Pode parecer contraintuitivo que macrófagos ativados utilizem a glicólise como principal fonte de energia, uma vez que a fosforilação oxidativa gera 36 moléculas de ATP e a glicólise produza apenas duas moléculas. No entanto, a glicólise além de conferir vantagem em termos de velocidade com que pode ser regulada, também fornece intermediários biossintéticos para serem usados na via PPP (Figura 4), entre outros processos que são extremamente importantes para ativação clássica de macrófagos e suas funções efetoras (O'Neill *et al.*, 2016).

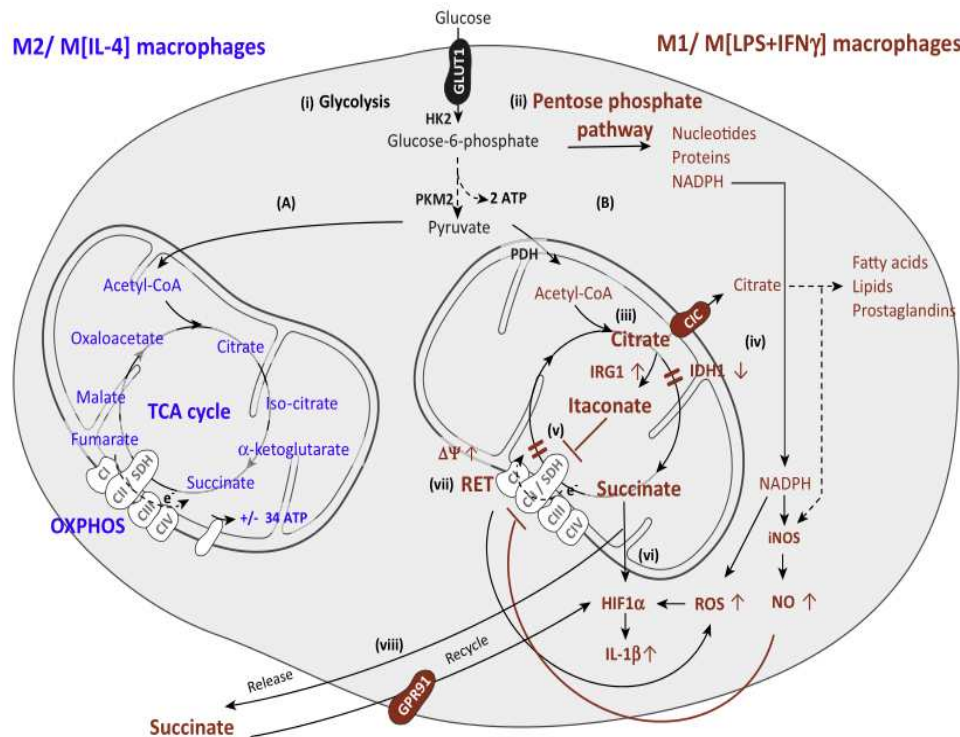


Figura 4. Vias metabólicas em macrófagos.
Fonte: Van den Bossche *et al.* (2017)

Van den Bossche *et al.* (2015) determinaram características metabólicas de macrófagos M1 e M2 em camundongos, no qual em M1 se utiliza predominantemente glicólise para gerar ATP e em M2, fosforilação oxidativa. Dessa forma, foi observado que LPS e outros estímulos pró-inflamatórios aumentam a glicólise em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs), mas estímulos anti-inflamatórios, como IL-10 suprimem essa via metabólica (Ip *et al.*, 2017).

Sabe-se que a glicólise elevada associada à inflamação em macrófagos é fortemente dependente de fatores induzíveis por hipóxia (HIF-1 α). Blouin *et al.* (2004) foram os primeiros a mostrar que a estimulação de macrófagos com LPS aumentou os níveis da proteína HIF-1 α levando a um complexo HIF-1 que se liga a Elementos de Resposta Hipóxica (HREs). Nesse sentido, HIF-1 α também foi identificado por desempenhar remodelamento epigenética das células mieloides em respostas a estímulos como o β -glucano (Cheng *et al.*, 2014). Samba *et al.* (2016) relataram que a reprogramação glicolítica do HIF-1 α dos macrófagos desempenharam papel significativo nos macrófagos que migram para os tecidos. HIF-1 α também induz a transcrição da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Tannahill *et al.*, 2013).

Contudo, Tavakoli *et al.* (2017) constataram que o M-CSF, que está associado a polarização de macrófagos M2, ocasionou uma expressão de transportadores de glicose, maior taxa de

produção de lactato e maior expressão de várias enzimas glicolíticas em macrófagos, comparado ao fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos, que normalmente está associado ao fenótipo do tipo M1. À medida que surgem estudos como esse, fica demonstrado que a glicólise também pode desempenhar papel importante nos macrófagos M2.

1.4.2 Via das pentoses-fosfato (PPP)

A glicose-6-fosfato da glicólise supre a PPP anabólica, que não apenas gera pentoses e ribose-5-fosfato para produção de ácido nucléico, mas também serve como principal fonte de NADPH que fornece o poder redutor necessário para uma série de reações sintéticas e anabolizantes no citosol celular (Diskin e Palsson-McDermott, 2018).

Hangar *et al.* (2013) demonstraram que a PPP foi regulada positivamente em macrófagos M1. Assim, é provável que o NADPH seja de grande importância para os macrófagos, uma vez que a enzima NADPH oxidase catalisa a reação com espécies reativas de oxigênio e NO, sendo importantes na fase da resolução da inflamação (Ray *et al.*, 2012). Sabe-se também que é provável que a produção de nucleotídeos é essencial para macrófagos ativados. Embora tenham baixa taxa de proliferação, os nucleotídeos também são necessários para miRNAs, que são envolvidos na regulação dos genes (O'Neill *et al.*, 2016).

Por outro lado, os macrófagos M2 parecem suprimir a PPP. Demonstrou-se que a regulação da PPP nessas células está sob controle da proteína *carbohydrate kinase-like* (CARKL). Essa proteína é regulada positivamente em respostas a IL-4 e suprimida em resposta a LPS, resultando na inibição da PPP em macrófagos ativados alternativamente. Isso acontece porque como a CARKL é regulada negativamente em M1, ela se torna importante para o redirecionamento da glicose para a glicólise e PPP, aumentando, então, a ação pró-inflamatória dos macrófagos (Haschemi *et al.*, 2012).

1.4.3 Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou Ciclo de Krebs

Quando o oxigênio está disponível, a glicólise se torna o primeiro estágio do catabolismo da glicose. Uma vez que piruvato e lactato são gerados, outros três processos metabólicos que ocorrem nas mitocôndrias tornam-se responsáveis por gerar mais 36 moléculas de ATP por molécula de glicose. O piruvato é oxidado por uma série de reações denominadas TCA ou ciclo de Krebs (Diskin e Palsson-McDermott, 2018).

Além do aumento do fluxo glicolítico e redução do consumo de oxigênio em macrófagos inflamatórios, também há mudanças significativas no TCA. Como a glicólise, os principais intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico servem como fatores nas vias biossintéticas. O citrato desempenha papel importante, alimentando não apenas a síntese de ácidos graxos e a acetilação de histonas, mas também atua como precursor do itaconato, um dos metabólitos mais induzidos em macrófagos ativados por LPS (Diskin e Palsson-McDermott, 2018).

Dessa forma, os macrófagos em repouso e os macrófagos M2 utilizam ciclo de Krebs intacto em conjunto com a fosforilação oxidativa para gerar ATP (Jha *et al.*, 2015). O piruvato gerado em M1 é convertido em acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH) e posteriormente é convertido em citrato. A atividade da PDH foi encontrada intacta em macrófagos M1, embora o HIF-1 α possa potencialmente induzir piruvato desidrogenase quinase (PDK-1), um inibidor da PDH (Meiser *et al.*, 2016). Quando macrófagos são estimulados com LPS ou outro sinal inflamatório, o TCA é interrompido em pontos distintos do ciclo. Portanto, o acúmulo de certos metabólitos, como succinato, citrato e ácido itacônico ocorre em macrófagos M1 (Jha *et al.*, 2015).

Nesse contexto, é visto que duas quebras ocorrem no ciclo de Krebs de macrófagos polarizados por M1. A primeira ocorre na enzima isocitrato desidrogenase (IDH), resultando no aumento dos níveis de citrato e itaconato. O citrato aumenta a síntese de ácidos graxos para prostaglandinas (PG) e produção de óxido nítrico (NO), enquanto o itaconato tem função antibacteriana. O segundo intervalo ocorre na enzima succinato desidrogenase (SDH) com subsequentes níveis aumentados de succinato (Van den Bossche *et al.*, 2017). Esse último estabiliza o fator de transcrição do fator induzível por hipóxia (HIF-1 α), que liga o promotor IL-1 β , aumentando a produção dessa interleucina. O succinato elevado em M1 tem relação com os níveis de glutamina, que também é aumentada em resposta a LPS via α -cetoglutarato (α -KG); esse aminoácido auxilia na função fagocítica e citotóxica do macrófago. O aumento do fluxo pela derivação de aspartato arginosuccinato (AASS) reestabelece o ciclo de Krebs, aumentando ainda mais o nível de citrato e alimentando o ciclo de ureia, que contribui para a produção de NO (Figura 5) (Mills e O'Neill, 2016).

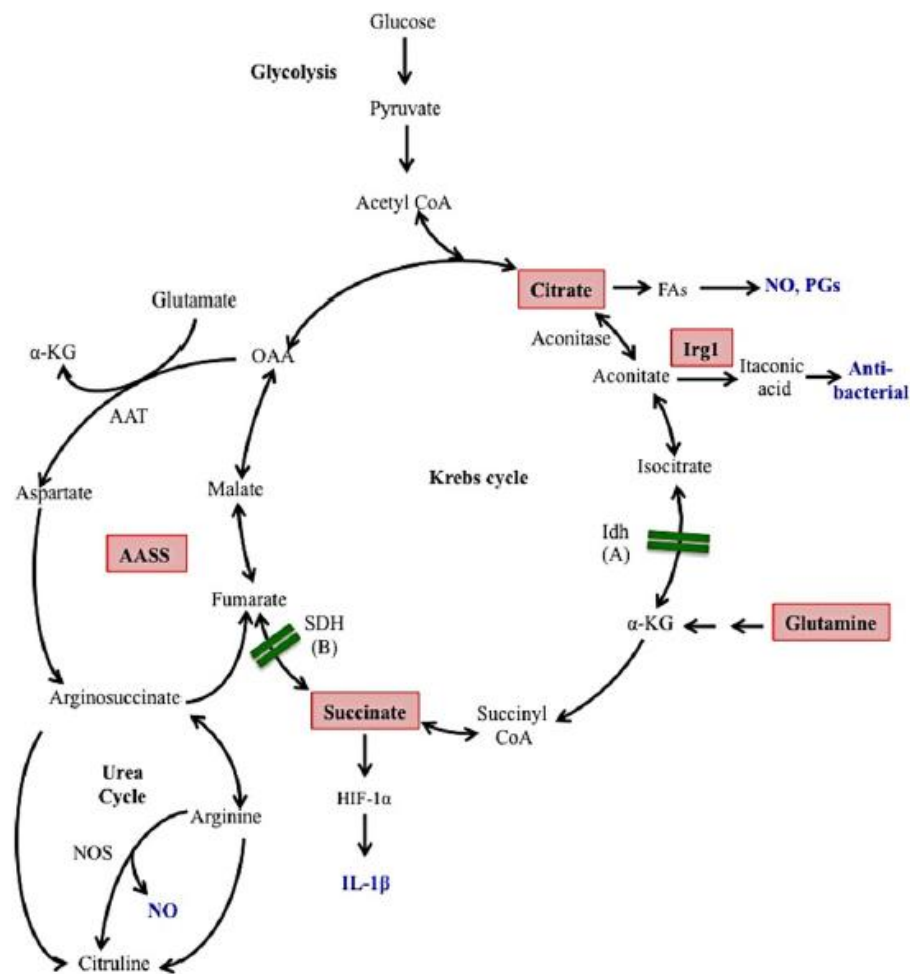


Figura 5. Sinais metabólicos gerados em M1.
Fonte: Mills e O'Neill (2016)

1.4.3.1 Metabólitos: succinato, citrato e ácido itacônico

O ciclo de Krebs cataboliza o acetil-CoA gerado na glicólise por uma série de reações enzimáticas. Dessa forma, o citrato é convertido em isocitrato por aconitase, sendo que o aconitato é o produto intermediário. O IDH produz α -KG desse isocitrato, mais tarde no ciclo, o succinato é oxidado para fumarato pela enzima SDH. Demonstrou-se que os macrófagos polarizados em M1 realizam fosforilação oxidativa em um ciclo de Krebs “quebrado” (Figura 5) (Mills e O'Neill, 2016).

O AASS conecta o ciclo de Krebs ao ciclo de ureia, uma via envolvida na produção de NO. Jha *et al.* (2015) relataram que a inibição da enzima AASS diminuiu a produção de NO e expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ambos marcadores característicos de M1, o que demonstra a importância funcional desta via alternativa ou clássica.

Dessa forma, também foi demonstrado que falhas na atuação da AASS inibem a produção da IL-6. É provável também que essa enzima estimule o ciclo de Krebs para elevar os níveis de citrato e subsequente biossíntese de ácidos graxos, produção de ERO e inflamação. É importante salientar que, no entanto, o ciclo de ureia em M1 pode não ser funcional nos estágios iniciais na infecção. Foi sugerido, então, que a explosão inicial de produção de NO em M1 provenha da arginina extracelular, que é importada após exposição. Quando os níveis de arginina extracelulares estão esgotados, a citrulina é importada e convertida em arginina para garantir a produção de NO mais tarde na infecção. Esse experimento foi realizado em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos (Qualls *et al.*, 2012).

Outro metabólito importante é o citrato, que assim como o succinato, também possui propriedades pró-inflamatórias. O citrato é necessário para biossíntese de ácidos graxos e uma vez no citosol, é clivado pela citrato-liase em acetil-CoA e oxaloacetato, precursores para NO e ERO. A síntese de ácidos graxos também promove a produção de prostaglandinas, que são as principais impulsionadoras da inflamação, iniciando uma série de vias de sinalização após a ligação com os seus receptores (Ricciotti e FitzGerald, 2011).

O transportador de citrato mitocondrial é o responsável pelo transporte de citrato das mitocôndrias para o citosol. A expressão desse transportador foi aumentada em macrófagos após estimulação com LPS e esse também foi necessário para a indução de NO, ERO e prostaglandinas em macrófagos M1 (Infantino *et al.*, 2011).

O ácido itacônico tem sua síntese aumentada em macrófagos polarizados por M1 (Jha *et al.*, 2015). Um estudo em macrófagos de camundongos e de humanos identificaram que o ácido itacônico possui atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *Salmonella enterica* e *Mycobacterium tuberculosis* (Michelucci *et al.*, 2013). O ácido itacônico também demonstrou inibir o isocitrato da enzima liase (ICL), um componente da derivação de glioxilato, que é uma via metabólica essencial para a sobrevivência de bactérias como *Escherichia coli* e *Yersinia pestis*, agente causador da peste bubônica. Esses resultados demonstram a importância do desvio de glioxilato para a proliferação bacteriana persistente (Hillier e Charnetzky, 1981).

Hall *et al.* (2013) realizaram um estudo em peixe-zebra e demonstraram a função de ERO no papel protetor do Irg1 durante a infecção bacteriana por *Salmonella* sp. O esgotamento do Irg1 na linhagem de macrófagos reduziu a produção de ERO e a subsequente atividade bactericida em resposta a esse tipo de infecção e isso pode ser resgatado após super expressão de Irg1.

1.4.4 Cadeia de transporte de elétrons (CTE) e fosforilação oxidativa

Os macrófagos classicamente ativados produzem ATP via glicólise; porém, os macrófagos ativados alternativamente utilizam fosforilação oxidativa. Então, sabe-se que macrófagos M2 mantêm a transferência direta de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons e geram ATP via ATP sintase (Jha *et al.*, 2015). Vats *et al.* (2006), ao tratarem macrófagos com IL-4, demonstraram que houve regulação positiva para fosforilação oxidativa via fator de transição STAT6 e PPAR γ coativador-1 β (PGC-1 β). Esse mesmo grupo de estudo ao analisar a super expressão de PGC-1 β nos macrófagos derivados de medula óssea, observou características de ativação alternativa, como redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, oxidação de ácidos graxos e atividade da arginase. Esse efeito também foi conseguido com IL-10 (Ip *et al.*, 2017) e IL-25 (Feng *et al.*, 2017).

Contudo, nos macrófagos M1, a fosforilação oxidativa é diminuída e a cadeia de transporte de elétrons torna-se desregulada (Jha *et al.*, 2015). Os macrófagos pró-inflamatórios modificam a CTE, de modo que sua função primária seja a produção de espécies reativas a oxigênio. Está bem estabelecido que a ERO é vital para macrófagos M1, mas é importante ressaltar o papel da ERO mitocondrial (mROS). West *et al.* (2011) demonstraram que vários receptores TLR sinalizam pela proteína TRAF6, pela via alternativa que se associa ao complexo I do CTE para promover a produção de mROS e o recrutamento de mitocôndrias para os fagossomos. Foi corroborado também que a perturbação dessa via de sinalização comprometeu a morte bacteriana por macrófagos.

Dessa forma, outras evidências para a importância de mROS em macrófagos surgem com o papel que a proteína desacopladora 2 (UCP2) parece desempenhar. A UCP2 está localizada na membrana mitocondrial interna e é altamente expressa em macrófagos juntamente com outras células imunes. Acredita-se que essa proteína reduza os níveis de ERO em macrófagos por meio do desacoplamento da fosforilação oxidativa. Camundongos *knockout* para UCP2 tiveram ERO elevadas em comparação com o controle (Arsenijevic *et al.*, 2000). Como esperado, verificou-se que a IL-10 exerce efeito oposto sobre o mROS comparando com o LPS e outros antagonistas do TLR, pois o tratamento de macrófagos com IL-10 promoveu a redução de espécies reativas a oxigênio pela indução da mitofagia (Ip *et al.*, 2017).

Fernandes-Aguera *et al.* (2015) destacaram que o mROS em macrófagos pró-inflamatórios podem ser gerados em cadeia de transporte de elétrons reversa (RET). A primeira evidência de RET que deu origem ao mROS ocorreu na detecção de oxigênio. Chouchani *et al.* (2014)

demonstraram que o impulso para a produção de mROS em lesões de reperfusão ocorrem devido ao acúmulo de succinato e atividade elevada da enzima SDH. Papéis definidos têm surgido para complexos de cadeia de transporte de elétrons I e II na produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos M1 através de estudos de inibidores desse processo, como Kelly *et al.* (2015) que usaram metformina e rotenona para inibir o complexo I em macrófagos derivados de medula óssea tratados com LPS e teve como resultado a redução significativa da produção de mROS e IL-1 β e o aumento de IL-10.

1.4.6 Síntese de ácidos graxos e oxidação beta

De forma geral, a síntese de ácidos graxos está intimamente ligada com a função efetora pró-inflamatória de macrófagos, uma vez que há o aumento de citrato e ácidos graxos em macrófagos ativados por LPS (Hangar *et al.*, 2013). Feingold *et al.* (2012) demonstraram que carbonos derivados de glicose gerados por uma taxa aumentada de glicólise em macrófagos M1 foram incorporados preferencialmente em ácidos e esteróis. Além disso, macrófagos associados a aterosclerose exibem um aumento no acúmulo de triglicerídeos e ésteres de colesterol que podem contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias crônicas (Funk *et al.*, 1993).

Convém ressaltar que o acúmulo de ácidos graxos é devido ao aumento da síntese, acoplado também ao aumento robusto de várias das principais enzimas envolvidas na síntese lipídica de glicerol, como a transaminase glutâmico-pirúvica 3 (GPT3), lipina-1 e diacilglicerol O-aciltransferase 2 (DGAT2). Juntamente com o aumento da síntese de AG, é visto que os macrófagos estimulados por LPS possuem uma diminuição da oxidação desses ácidos, ligada a expressão suprimida de Carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) (Feingold *et al.*, 2012).

A diferenciação de monócitos está ligada a uma regulação positiva de genes, que é estimulada por M-CSF, e é necessária para a síntese de ácidos graxos. Uma proteína chamada FAMIN é a responsável por regular a lipogênese em macrófagos M1, e essa proteína foi identificada por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), e esses foram associados a doenças inflamatórias e foram considerados essenciais para a produção de citocinas pró-inflamatórias e ERO, bem como a ativação do inflamassoma (Cader *et al.*, 2016).

Da mesma forma que a síntese de ácidos graxos está relacionada a macrófagos pró-inflamatórios, a oxidação beta é sinônimo de macrófagos anti-inflamatórios. A lipólise libera ácidos graxos livres, que são absorvidos pelo macrófago por receptores *scavenger*, como o

CD36, alimentando assim a fosforilação oxidativa mitocondrial. Nos macrófagos estimulados por IL-4, essa troca metabólica é amplamente mediada por STAT6 e PGC-1 β (Vats *et al.*, 2006).

Os macrófagos ativados alternativamente possuem expressões aumentadas de CPT1, CD36 e acetil-coenzima de cadeia média. O malonil-CoA do Ciclo de Krebs regula a oxidação de ácidos graxos vinculando-se a CPT1 (Huang *et al.*, 2014). Promover o aumento da expressão de CPT1 em macrófagos do tecido adiposo humano levou a uma redução das respostas inflamatórias e menor dano da ERO dos macrófagos (Malandrino *et al.*, 2015). A atividade da NADPH oxidase 4 (NOX4) regula a atividade de CPT1A e a oxidação de ácidos graxos. Então, ao interferir nessa via por inibição genética ou farmacológica, a ativação do NLRP3 foi suprimida, levando também a redução da secreção de IL-1 β e IL-18 (Moon *et al.*, 2015).

1.5 Metabolismo de arginina no sistema imune

1.5.1 Arginina

O metabolismo de aminoácidos desempenha papel importante em muitos processos do sistema imune. A primeira evidência de que o metabolismo de aminoácidos pode regular a função efetiva dos macrófagos veio com a descoberta de que macrófagos bloqueiam o crescimento do tumor pelo consumo de arginina levando a produção de óxido nítrico (Currie, 1978).

Nesse contexto, L-arginina (L-arg) (Figura 6) é um aminoácido catiônico dibásico que participa de várias vias metabólicas. Esse possui quatro átomos de nitrogênio por molécula e devido a essa característica estrutural é o principal carreador de nitrogênio em humanos e animais, apresentando importante função na síntese proteica e no metabolismo intermediário de nitrogênio ao participar do ciclo de ureia (Tapiero *et al.*, 2012).

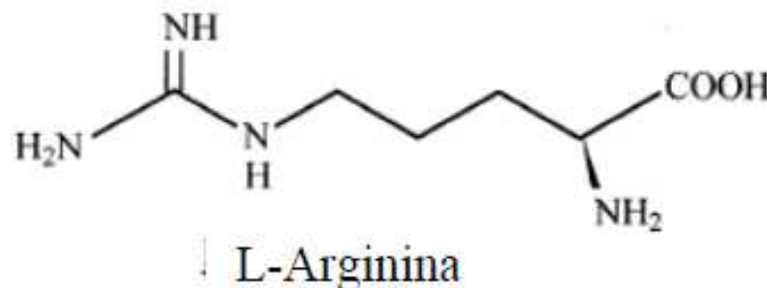


Figura 6: Estrutura química da arginina.

A arginina foi isolada pela primeira vez em 1886 e identificada como componente de proteínas animais em 1895 (Wu e Morris, 1998). Já o papel da arginina na fisiologia metabólica foi demonstrado pela primeira vez em 1932, quando Krebs e Henseleit descobriram o ciclo da ureia. Em 1981, Windmueller e Spaeth (1981) relataram que o intestino delgado é a principal fonte de citrulina para a síntese de arginina pelos rins. Em 1987, foi demonstrado que a arginina é o precursor para síntese de citrulina e nitrito em macrófagos (Hibbs *et al.*, 1987).

Assim, as três principais fontes de L-arg são a ingestão, a produção endógena via L-citrulina e reciclagem, ou seja, com a recuperação das proteínas degradadas. Em condições patológicas (sangramento, sepse, trauma, câncer ou inflamação crônica), as fontes endógenas de L-arg são insuficientes para as necessidades metabólicas (Morris, 2016).

Nesse contexto, esse aminoácido é considerado semi-essencial ou aminoácido condicionalmente essencial, que em condições estressantes deve ser fornecido na dieta. A maior parte da síntese endógena de L-arg é realizada nos túbulos proximais, no qual a L-citrulina circulante proveniente dos enterócitos é captada pelos rins. É importante ressaltar que além da síntese renal, a L-citrulina é convertida em L-arg em quase todas as células, incluindo adipócitos, células endoteliais, macrófagos e neurônios (Brosnan e Brosnan, 2004).

Em células de mamíferos, o transporte de L-arg ocorre através da membrana plasmática e é mediado por pelo menos oito transportadores. A absorção da arginina ocorre principalmente por meio de transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT-1, CAT-2A, CAT-2B, CAT-3, entre outros) (Werner *et al.*, 2019).

Esse aminoácido é metabolizado em células animais por quatro grupos de enzimas, algumas das quais existem em várias isoformas, que são a arginase, óxido nítrico sintase (NOS), arginina descarboxilase (ADC) e arginina-glicina amidinotransferase (AGAT). Essas enzimas são naturalmente reguladas e expressas de uma maneira específica para cada tipo de célula e o metabolismo de arginina abrange como metabólitos NO, ureia, ornitina, citrulina, creatina, agmatina, glutamato e a família de poliaminas (Wu e Morris, 1998).

Além desses, a arginina deiminase (ADI), que hidrolisa L-arg em L-citrulina e amônia é expressa por algumas bactérias (Lindgren *et al.*, 2014). Essas enzimas são codificadas por elemento móvel catabólico de arginina (ACME) que foi detectado em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Diep *et al.*, 2006). A arginina metabolizada por enzimas codificadas por ACME permite que essas bactérias sobrevivam em ambientes ácidos, incluindo a pele humana e atuam interrompendo o metabolismo da arginina do hospedeiro, contribuindo,

por exemplo, para o sucesso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Thurlow *et al.*, 2013).

1.5.2 Transporte de arginina

O transporte transmembranas de arginina é um componente essencial do metabolismo celular de arginina. Os aminoácidos não passam por membranas bicamadas lipídicas livremente e são transportadas por meio de proteínas (Rath *et al.*, 2014). Esses transportadores apresentam diferentes características e especificidades com base nas suas propriedades físico-químicas. Arginina, assim como outros aminoácidos catiônicos, são preferencialmente transportados através de membros da família do gene SLC7 (Fotiadis *et al.*, 2013).

Desse modo, a subfamília de transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT1-3, ou seja, SLC7A1-3) reconhece exclusivamente os aminoácidos catiônicos. Esses são os principais transportadores para a absorção de arginina nas células, no qual esse aminoácido é usado para a síntese de proteína e vias metabólicas. O CAT-1 é expresso constitutivamente na maioria dos tecidos, com exceção do fígado, enquanto CAT-2B é induzível por citocinas. Já o CAT-2A é predominantemente expresso no fígado, enquanto CAT-3 é expresso durante o desenvolvimento embrionário, mas amplamente restrito ao sistema nervoso central e ao timo em adultos (Closs *et al.*, 2004).

Yeramian *et al.* (2006) demonstraram que a indução de CAT-2 foi possível em macrófagos após a estimulação de citocinas Th1 e Th2. Em células dendríticas de camundongos, o estímulo para a indução de CAT-2 foi feito por ácido retinóico (Chang *et al.*, 2013) e na micróglia por IFN- γ e LPS (Kawahara *et al.*, 2001). Nicholson *et al.* (2001) relataram que a produção sustentada de NO em macrófagos de camundongos também é baseada na expressão de CAT-2 e consequentemente na captação de arginina.

Nesse contexto, foi relatado que em células mielóides de camundongos, o aumento da importação de arginina via CAT-2 é acoplado à indução das enzimas catabolizantes desse aminoácido, como arg-1 e NOS (Kawara *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2013). Assim, percebe-se que os transportadores de aminoácidos não estão apenas envolvidos na necessidade de fornecimento de nutrientes, mas estão, também, intrinsecamente envolvidos em redes metabólicas complexas que influenciam e sinalizam nessas vias (Taylor, 2009).

1.5.3 Metabolismo de arginina em macrófagos

A ativação de macrófagos é uma área complexa de pesquisa porque não há meios diretos para definir com precisão como os macrófagos são estimulados individualmente em microambientes imunológicos complexos. *In vivo*, a ativação dessas células envolve pelo menos três vias entrelaçadas que irão estabelecer o estado final da ativação: vias de desenvolvimento que levam os monócitos a se tornarem macrófagos dentro dos tecidos, sinais do microambiente tecidual que variam entre órgãos e ambientes inflamatórios e a influência de citocinas polarizadas por outras moléculas (Murray e Wynn, 2011).

A polarização experimental dos macrófagos derivados de medula abrange um reflexo limitado do que acontece *in vivo*, já que as condições de cultura são artificiais ou não conseguem replicar o microambiente do tecido. No entanto, um modelo dualístico (M1 e M2) (Figura 7) se estabeleceu baseado na avaliação *in vitro* das diferentes expressões de proteínas que os macrófagos polarizados são capazes de expressar (Mills *et al.*, 2000).

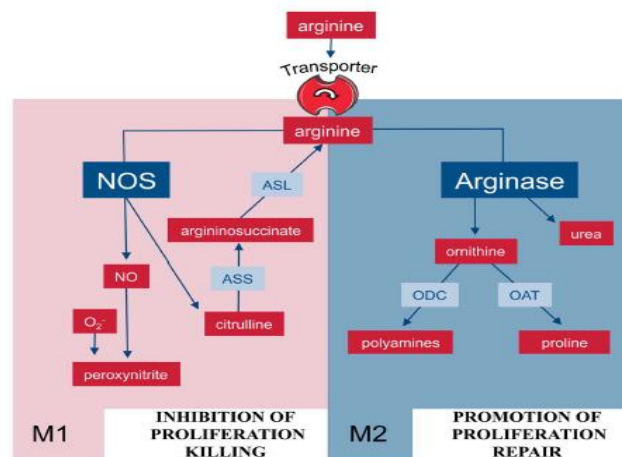


Figura 7: Metabolismo de arginina via iNOS ou arginase.

Fonte: Rath *et al.* (2014)

Mattila *et al.* (2013) descreveram que na tuberculose humana, a distribuição de macrófagos M1 e M2 é espacialmente organizada dentro dos granulomas; macrófagos M1 podem ser encontrados preferencialmente no interior, mais próximos das micobactérias viáveis, enquanto uma maior frequência de macrófagos M2 é detectável nas margens externas, onde predomina a cicatrização no granuloma. Esse resultado demonstra como o microambiente interfere na predominância de polarização dessas células.

1.5.3.1 Arginina e macrófagos M1

Uma função chave dos macrófagos do tipo M1 é a produção de óxido nítrico a partir da arginina e do oxigênio catalisado por iNOS. O NO é diretamente tóxico para muitos microrganismos, especialmente para os patógenos intracelulares, além das suas funções sinalizadoras e regulatórias (Bogdan, 2001). Após a ativação por IFN- γ e derivados microbianos, como o LPS, os macrófagos M1 em sistema experimental fechado *in vitro*, importam arginina por transportadores e isso sugere que essas células não conservam esse aminoácido, uma vez que foram estimuladas a produzir NO (Everts *et al.*, 2012).

Todas as enzimas NOS são proteínas homodiméricas grandes com dois domínios funcionais. Ambos, nNOS (NOS neuronal) e eNOS (NOS endotelial) são enzimas expressas constitutivamente e dependente de cálcio em sua atividade. Em contraste, iNOS é regulado via transcrição induzível e sintetiza NO independente de cálcio. Mais proeminentemente conhecido como via microbicida e efetora inflamatória em macrófagos (McMicking *et al.*, 1997), a atividade iNOS também foi demonstrada em uma variedade de outras células, como hepatócitos (Geller *et al.*, 1993) e epitélio pulmonar (Asano *et al.*, 1994).

Sabe-se que o destino da maioria dos macrófagos com propriedades inflamatórias é a apoptose, levando a uma grande citotoxicidade de NO para os tecidos do hospedeiro que resulta na necessidade de moderar a produção do óxido nítrico. Arginases são os principais meios que os macrófagos usam para suprimir a produção de NO, quando a via de ativação para iNOS também está ativada. Arg-1 e iNOS, quando expressos na mesma célula, competem entre si pela arginina (Modolell *et al.*, 1995).

Nesse contexto, um estudo com macrófagos infectados por micobactérias que estariam classificados como M1 devido a PAMPs ligantes de TLR e outros receptores, acabam induzindo também a expressão de Arg-1 (e provavelmente Arg-2), mas por uma via completamente independente de STAT6. Em vez disso, a sinalização de TLR induz as citocinas IL-6, G-CSF e IL-10, que sinalizam por uma via autócrina-parácrina, ativando, então, STAT3 para regular Arg-1 (Qualls *et al.*, 2010).

Dessa forma, se faz necessário entender que os macrófagos M1 coexpressam iNOS e Arg-1, demonstrando um conceito oposto ao modelo dualístico de que macrófagos expressam iNOS ou Arg-1 (Mills, 2001). Em uma infecção experimental com *Mycobacterium tuberculosis* a deleção de Arg-1 em macrófagos leva a um aumento da produção de NO, resultando em maior controle do microrganismo pelo hospedeiro (El Kasmi *et al.*, 2008). Dessa forma, Arg-1 e,

provavelmente Arg-2, também regulam a saída de NO, uma vez que podem bloquear a tradução do mRNA de iNOS, controlando a produção dessa enzima por macrófagos (Lee *et al.*, 2003).

Em infecções polarizadas para M1, a expressão de Arg-1 possui papel chave de imunorregulação na proliferação de células T. Em infecções de micobactérias em camundongos com deficiência de iNOS foi relatada indução de uma reação granulomatosa limitada ao pulmão. No entanto, na ausência de iNOS, a expressão de Arg-1 foi aumentada nos macrófagos do granuloma, levantando a questão da função dessa enzima nesse cenário, uma vez que não era necessário moderar a produção de NO (Reece *et al.*, 2010). Então, para se obter essa resposta, foi realizado um experimento complementar com camundongos com supressão de iNOS e Arg-1 e o resultado foi letal devido a uma reação imunopatológica associada a células T no pulmão, levando a conclusão da importância de Arg-1 na supressão de proliferação de células T (Duque-Correa *et al.*, 2014).

1.5.3.2 Arginina e macrófagos M2

Nas infecções dominadas por macrófagos M2, a arginase conduz a via alternativa da arginina nessas células com o objetivo de catalisar a hidrólise desse aminoácido em ornitina e ureia, e com pouca ou nenhuma produção de NO. Esse tipo de célula tem alta expressão de Arg-1, mas expressões insignificantes de iNOS, que é regulada por IFN- γ . A deleção de Arg-1 é letal, uma vez que essa enzima tem papel essencial no ciclo da ureia. A deleção da outra isoforma da arginase, a Arg-2, tem efeito fenotípico mais limitado (Shi *et al.*, 2001). A influência de Arg-2 no metabolismo de arginina ainda não foi totalmente explorada, contudo, sabe-se que essa enzima inibe a produção de NO em infecções por *Helicobacter pylori* (Gobert *et al.*, 2001).

A expressão de Arg-1 em condições M2 é controlada por muitos fatores, mas o eixo principal é mediado por IL-4 e IL-13, que ativam o fator de transcrição STAT6 e esse se liga a um potenciador no *locus* Arg-1 e coopera com outros fatores de transcrição, aumentando em 100 vezes a expressão dessa enzima (Lang *et al.*, 2002). Outra causa que aumenta a expressão de Arg-1 são os fatores de transcrição, como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) que, provavelmente, são um meio central para macrófagos residentes em tecidos polarizarem em M2, como os que residem no tecido adiposo, que usa essa via para equilibrar o nível de inflamação que acontece nesses locais (Nguyen *et al.*, 2011).

Nesse cenário, a ornitina é uma das substâncias resultantes do metabolismo de arginina e serve como substrato para ornitina descarboxilase (ODC), enzima importante para a presença de poliaminas. Essas são pequenas moléculas policatiônicas que regulam uma infinidade de processos celulares, como replicação de DNA, tradução de proteínas, crescimento celular e diferenciação (Pegg, 2009). Já a ornitina, em si, é importante nos processos de remodelagem tecidual, uma vez que estudos demonstraram o aumento dessa enzima em situações como doença pulmonar fibrótica (Kitowska *et al.*, 2009) e asma alérgica (Maarsingh *et al.*, 2011).

Barron *et al.* (2013), ao usarem camundongos com macrófagos deficientes de Arg-1, relataram que essa enzima tem efeitos específicos no controle de proliferação de células T. Por exemplo, esses camundongos, ao serem infectados com *Schistosoma mansoni*, tiveram resposta inflamatória imunopatológica letal associada a células T (Herbet *et al.*, 2010). Outro achado importante desse modelo foi que os efeitos de Arg-1 para suprimir a proliferação de células T estão restritos ao fígado, uma vez que isso não ocorreu no parênquima pulmonar (Barron *et al.*, 2013).

Outra consequência relevante da expressão de arginase no macrófago é a redução da arginina extracelular. Há especulações de que macrófagos M2 sejam mais eficientes na utilização de arginina extracelular, uma vez que não possuem um mecanismo reconstitutivo intracelular para reciclagem de arginina em oposição a macrófagos M1, por exemplo, que podem usar a via de resgate citrulina-NO (Rath *et al.*, 2014).

1.5.4 Regeneração de arginina em células imunes

As células T ativadas e as células mieloides importam quantidades substanciais de arginina para sustentar o crescimento ou para a produção de NO e ornitina. Mas, algumas células do sistema imune demonstraram que não são auxotróficas em relação a arginina. Pelo fornecimento da citrulina como substrato e da atividade progressiva da arginossuccinato sintase (ASS1), arginossuccinato liase (ASL) e da Arg-1, a arginina é regenerada e, então, consumida para produzir NO e citrulina em macrófagos M1 (Figura 8). A sinalização da ASS1 é regulada por TLR (Qualls *et al.*, 2012).

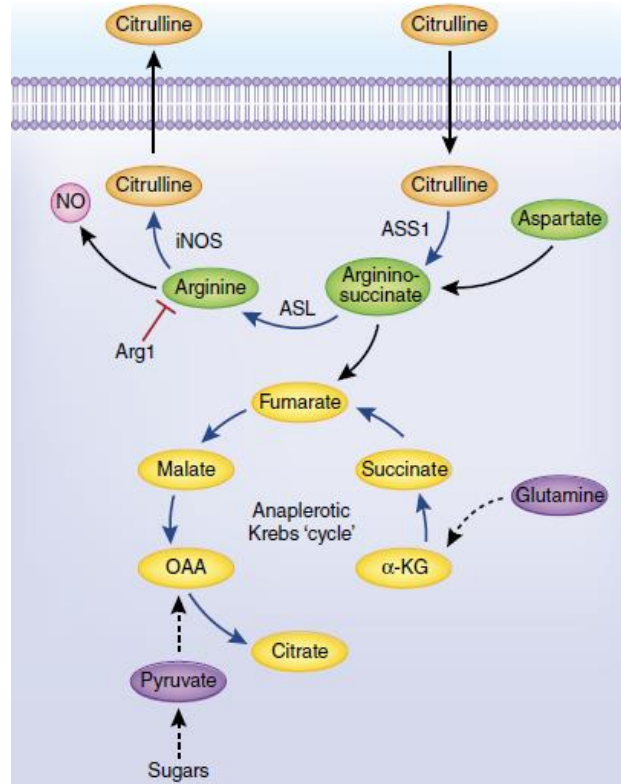


Figura 8: Regeneração da arginina e anaplerose do ciclo de Krebs.

Fonte: Murray (2016)

Qualls *et al.* (2012) demonstraram o motivo dos macrófagos importarem a arginina extracelular se conseguem produzi-las. Para isso, foi desenvolvido um experimento com o objetivo de rastrear os átomos pesados do metabolismo de arginina em macrófagos M1 e o resultado foi que a citrulina era exportada para o meio extracelular. Então, foi relatado que quando a arginina do meio se torna limitada, essas células têm a capacidade de importar citrulina para sustentar a produção de NO.

Nesse contexto, um estudo manipulou a quantidade de arginina e citrulina no meio e demonstraram que quando os macrófagos M1 produzem NO a partir de citrulina usando a via de regeneração da arginina, a Arg-1 não é capaz de bloquear a produção de óxido nítrico (Rapovy *et al.*, 2015). Esse dado corrobora com o fato de que macrófagos ativado compartimentam o metabolismo da arginina de alguma forma, possivelmente por meio da partição subcelular das enzimas principais (Murray, 2016).

Uma reviravolta na história da regeneração da arginina envolve a maneira como os macrófagos M1 alteram o ciclo de Krebs. Jha *et al.* (2015) demonstraram que o rastreamento de glutamina e glicose mostrou que macrófagos M1 usam o ciclo de Krebs interrompido no ponto em que o citrato é convertido em α -cetoglutarato. Uma vez ativados, essas células usam reações de

anaplerose para alimentar metabólitos nesse ciclo segmentado, entre eles o fumarato que é gerado a partir da ação de ASL que quebra arginosuccinato em fumarato e arginina. Uma limitação deste estudo foi a utilização de um único ponto no tempo e o não reconhecimento de que a citrulina é exportada e depois reimportada, aumentando a complexidade e dinamismo do sistema (Murray, 2016).

2. Modulação imunometabólica de *Staphylococcus* spp.

2.1 Imunidade inata

2.1.1 Barreira epitelial

As bactérias, como *Staphylococcus* spp., ao entrarem em contato com superfícies epiteliais (Figura 9.A1) (pele e/ou mucosa) são identificadas por receptores específicos que reconhecem componentes microbianos derivados da parede celular. Alguns desses elementos são o ácido teicoico, ácido lipoteicoico, lipoproteínas e lipopolissacarídeo. É visto também que a IgA pré-formada localizada na mucosa consegue neutralizar as toxinas bacterianas, como toxina alfa e beta hemolisina, presentes no *S. aureus* (Verkaik *et al.* 2009).

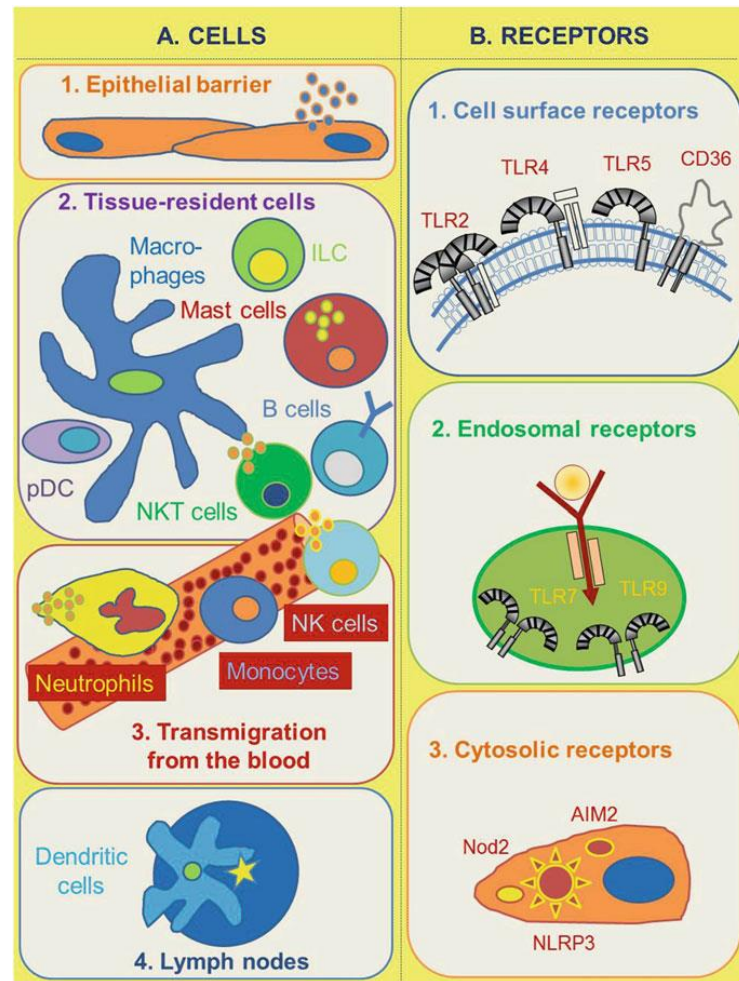


Figura 9: Diferentes mecanismos da defesa imune inata.
Fonte: Bagnoli *et al.* (2018)

2.1.2 A importância do TLR2 (*Toll-like receptor-2*)

O receptor de superfície mais importante no reconhecimento epitelial de bactérias Gram-positivo, como *S. aureus* e *S. epidermidis*, é o TLR2 (Figura 9.B1). Em estudos *in vivo* foi demonstrado que camundongos sem esse receptor (genes *myd88* e *irak4*) são altamente susceptíveis a infecções por *S. aureus*. Na infecção por esse patógeno, esses camundongos apresentam respostas reduzidas às citocinas e maior carga bacteriana no organismo (Kielian *et al.*, 2005; Yimin Kohanawa *et al.*, 2013).

Nesse contexto, sabe-se que *S. aureus* expressa mais de 50 lipoproteínas de superfície (Niguyen *et al.*, 2015). A maturação dessas envolve várias etapas de modificação pós-traducional, sendo a mais importante a transferência de um grupo cilglicerol pela fosfatil glicerol diacilglicerol transferase, sendo essa modificação essencial para o reconhecimento via TLR2 (Kurokawa *et al.*, 2011). A ativação do TLR2 nos queratinócitos leva à liberação de peptídeos antimicrobianos

(AMP), como dermaseptina e AP24, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atraem neutrófilos (Wanke *et al.*, 2011). A importância desse receptor é bem demonstrada quando se conclui que pacientes com dermatite atópica e baixa resposta a ativação dos TLR2 são mais susceptíveis a colonização da pele por *S. aureus* (Niebuhr *et al.*, 2011).

Entretanto, a detecção via TLR2 não consegue distinguir entre bactérias viáveis e não viáveis e está sujeita à variação de intensidade, por exemplo, alterando-se devido ao estado proliferativo e também metabólico (Hilmi *et al.*, 2014). No entanto, o reconhecimento desse receptor exerce efeito estimulador em muitas células imunes não sendo o único responsável pela remoção ou contenção bacteriana de *S. aureus* aderentes nas superfícies epiteliais (El-Helou *et al.*, 2011).

Com isso, notou-se que o papel central do TLR2 é dividido em dois pilares: primeiro, a indução de AMP que irá degradar células bacterianas, diminuindo então, a necessidade do recrutamento de fagócitos. Em segundo lugar, esse receptor exerce importante papel de *priming* nas células epiteliais e do sistema imune, preparando-as para reconhecer a invasão dos patógenos pelos sensores intracelulares que induz a eliminação por lise bacteriana intracelular em fagócitos ou a morte das células epiteliais infectadas (Wolf *et al.*, 2011).

Nesse sentido, sugeriu-se que o eritema que afeta alguns recém-nascidos reflete uma resposta imune inata causada por *Staphylococcus* não-*aureus* que penetra através dos folículos pilosos. Esse fenômeno é mediado por IL-6, que são produzidos em demasiada quantidade após serem estimulados por TLR2 (Angelone *et al.*, 2006).

Todos esses acontecimentos preparam as bases para a polarização da resposta das células T e dessas, as mais importantes em infecções por *S. aureus* são as Th3 (Miller e Cho, 2011). Então, devido a tudo isso se destaca o papel desse importante receptor no reconhecimento desse patógeno em diferentes sítios de atuação, acrescentando também os efeitos desses nos fagócitos (Skabytska *et al.*, 2014).

2.1.3 Ativação do inflamassoma e citocinas IL-18 e IL-1 β

A resposta imune inata do hospedeiro executa papel importante na defesa do organismo. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são capazes de reconhecer diversos componentes microbianos (Sharma e Kanneganti, 2016). Após a invasão de células epiteliais, a detecção dos patógenos é garantida pelos PRRs, como o TLR. Dentro dessa classe, temos também o receptor do tipo NOD, e o reconhecimento de *Staphylococcus* spp. pode ocorrer via

peptidoglicano que se ligará a esse receptor. Diferentemente do TLR, o receptor tipo NOD não está ligado à membrana, mas atua como sensores intracelulares para patógenos. O NOD1 detecta ácido meso-diaminopimérico, presente no peptidoglicano de bactérias, já o NOD2 (Figura 9.B3) reconhece o dipeptídeo muramil, presente na parede celular bacteriana (Hruz *et al.*, 2009). A produção de toxina- α por *S. aureus* facilita o reconhecimento do NOD2, promovendo o acesso ao citosol através da formação de poros na membrana plasmática. Destaca-se também que a atuação de TLR2 representa importante estímulo para NOD2 reconhecer o peptidoglicano (Schaffler *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a ativação do inflamassoma desempenha papel importante na proteção contra *S. aureus* (Cho *et al.*, 2012; Maher *et al.*, 2013), principalmente com o objetivo de obter uma resposta inata eficaz, ajudando a controlar a carga bacteriana e moldar a natureza e magnitude da resposta imune adaptativa (Evavold e Kagan, 2018). Já a ativação do inflamassoma não regulada, entretanto, pode resultar numa resposta imune inata exacerbada, que levará a danos no tecido do hospedeiro (Kebaier *et al.*, 2012).

Assim, devido ao engajamento do PRRs, *S. aureus* induz a ativação do inflamossoma. Esses complexos moleculares mediam a ativação da caspase-1, que desencadeia a liberação de IL-1 β e IL-18, importantes citocinas pró-inflamatórias. Assim como a ativação do TLR2, a ativação do inflamassoma depende da resposta imune inata contra o patógeno, uma vez que é necessário a presença de ATP para a indução de fluxo de potássio intracelular (Arlehamn *et al.*, 2010). *Staphylococcus aureus* estabelece esse gradiente intracelular de potássio quando está expressando genes de toxinas formadoras de poros, como a α -hemolisina. Por outro lado, a ausência dessas toxinas promove a persistência intracelular e sobrevivência desse patógeno por indução de autofagia, com a neutralização da ativação de NLRP3 (Figura 9.B3), caspase-1 e piroptose (Soong *et al.*, 2015; Accarias *et al.*, 2015). Labrousse *et al.* (2014) demonstraram em modelos com camundongos de infecções por *S. aureus* que o recrutamento de neutrófilos e a depuração da pneumonia estavam associados aos níveis de IL-1 β .

Desse modo, em estudo sobre infecção intramamária experimental com *Staphylococcus* não *aureus*, *S. epidermidis* e *S. simulans*, observou-se resposta local de citocinas após a infecção. A resposta imune inata local foi significativamente maior no *S. simulans*, com níveis mais elevados de IL-1 β e IL-18. Não foi observada resposta imune diferente em infecções eliminadas espontaneamente ou persistentes (Simojoki *et al.*, 2011).

Curiosamente, um experimento vinculou inflamassomas a respostas protetoras de células T, pois propôs que as células T $\gamma\delta$ são necessárias para o recrutamento de neutrófilos no local da infecção, e essas células têm sua produção dependente de NLRP3/ IL-1 β , deixando a necessidade de mais estudos relevantes sobre o assunto (Maher *et al.*, 2013).

2.1.4 Fagócitos e suas funções

A fagocitose é essencial para eliminar microrganismos invasores e é necessária para a ativação de células de resposta imune adaptativa via apresentação de antígeno por MHC II. Esse processo é iniciado pelo reconhecimento celular das PAMPs e opsoninas. Uma opsonina importante é a MBL, uma vez que essa contribui para o reconhecimento bacteriano e faz mediação das células imunes inata. Dessa forma, foi demonstrado que camundongos com deficiência de MBL, após injeção intraperitoneal de *S. aureus*, tiveram maior mortalidade do que o grupo controle (Ip *et al.*, 2008).

Nesse contexto, a degradação das bactérias no fagolisossomo facilita o reconhecimento do peptidoglicano via receptores NOD, e devido a isso, ocorre a ativação do inflamassoma que estimula a caspase-1 que ativa os precursores de IL-1 β e IL-18 (Sokolovska *et al.*, 2013). Ademais, a função da fagocitose na defesa celular contra *Staphylococcus* spp., em que cada fagócito tem o seu papel, acontece pelos receptores que mediam o reconhecimento e liberação desse patógeno e são tipicamente expressos por esses componentes do sistema imune. Um exemplo refere-se ao fato de camundongos sem CD36, um receptor de macrófagos, monócitos, células epiteliais e endoteliais serem altamente suscetíveis a infecções por *S. aureus* (Blanchet *et al.*, 2014).

Contudo, sabe-se que *S. aureus* pode sobreviver dentro dos fagócitos (Prajnsnar *et al.*, 2012), levando a uma fuga do sistema imune e disseminação desse patógeno. Apesar disso, os macrófagos e outras células fagocitam e degradam eficientemente essa bactéria, com apenas uma pequena proporção sobrevivendo e potencialmente podendo levar a disseminação de *S. aureus* em todo hospedeiro (Pollitt *et al.*, 2018).

2.1.4.1 Mastócitos

A função dos mastócitos (Figura 9.A3) é de sentinela na pele e mucosa. Essas células atuam para eliminar patógenos devido a espécies reativas a oxigênio (ERO) intracelular e AMP. O mastócito ainda tem uma capacidade de liberar grânulos citoplasmáticos que armazenam mediadores vasoativos e estimuladores imunológicos pré-formados. Tratando-se de infecções por bactérias, os mastócitos estão ligados principalmente a infecções respiratórias (Hayes *et al.*, 2015).

O papel dessa sentinela na defesa contra *S. aureus* é auxiliar na eliminação desse patógeno com citocinas pró-inflamatórias e AMP. A degranulação é induzida pela toxina δ desse patógeno e está ligado a reações alérgicas e dermatite. No entanto, estudos demonstraram que o *S. aureus* consegue fugir dessa defesa do organismo pela via integrina $\alpha_5\beta_1$ (Abel *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2015).

2.1.4.2 Macrófagos

Macrófagos (Figura 9.A2) são fagócitos que residem no tecido ou se desenvolvem a partir de monócitos, tendo como principal função a eliminação de patógenos invasores e apresentação do antígeno as células T na periferia e nos órgãos linfáticos.

Novamente, o TLR2 desempenha papel central na liberação de mediadores solúveis contra patógenos, por exemplo, em macrófagos, as lipoproteínas de *Staphylococcus spp.* induzem citocinas pró-inflamatórias e ERO (Nguyen *et al.*, 2015).

Dessa forma, a importância da defesa imune por macrófagos para *S. aureus* foi demonstrada em um estudo com camundongos com pneumonia pós influenza em que a resistência bacteriana foi atingida devido aos neutrófilos mediados pelo GM-CSF e macrófagos alveolares induzidos a produzir ERO (Subramaniam *et al.*, 2014). Surewaard *et al.* (2016) também demonstraram que camundongos sem macrófagos tiveram maior mortalidade por sepse devido a *S. aureus*.

Birjandi *et al.* (2011) relataram ligação e captação das células de *S. aureus* por macrófagos da zona marginal do baço. Foi demonstrado *in vivo* que macrófagos dessa localização foram o elemento central na remoção dessa bactéria da corrente sanguínea. Com isso, nota-se que a polarização dos macrófagos é altamente dependente do microambiente em que esse se encontra, pois TLR2, GM-CSF e receptores Fc γ , que fazem uma ligação entre as respostas imunes humoral e celular, afetam a função desse macrófago (Martinez e Gordon, 2014).

Ademais, a patogenicidade de alguns isolados de *S. aureus* também está ligada à sua capacidade de produzir *arginase*, e esse mecanismo modula o sistema imunológico pelo consumo da arginina do hospedeiro, resultando em quantidade de substrato reduzida para *iNOS* (Lahiri e Chakravorty, 2010). Arabi *et al.* (2015) relataram que ao examinar o efeito do selênio sobre a atividade bactericida dos macrófagos contra *S. aureus*, observaram que a concentração de 5 ng/mL de selênio já reduziu significativamente a atividade da arginase bacteriana e a dose de 20 ng/mL induziu a diminuição do crescimento bacteriano e aumento significativo na atividade fagocítica dos macrófagos.

O elemento móvel catabólico de arginina (ACME) é a maior região genômica que distingue a linhagem USA300 de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) de outras linhagens de *S. aureus*. Um fator evolutivo importante que leva a esses isolados de MRSA serem mais virulentas é a aquisição do gene *speG*, que permite que essas bactérias evitem a toxicidade de poliaminas (por exemplo, espermidina e espermina). A tolerância a poliaminas provavelmente deu ao MRSA múltiplas vantagens de aptidão, incluindo a formação de biofilmes mais robustos, maior aderência aos tecidos do hospedeiro e resistência a antibióticos (Planet *et al.*, 2013).

2.1.4.3 Neutrófilos

Os neutrófilos (Figura 9.A3) são os fagócitos de grande importância na defesa contra *Staphylococcus* spp. Esses ainda participam da formação de abscesso, o qual envolve também as toxinas derivadas desses patógenos. Sabe-se também da capacidade desses fagócitos de realizar a necroptose, uma forma específica de necrose celular (Greenlee-Wacker *et al.*, 2015). Entretanto, muitas vezes, especificamente *S. aureus* consegue escapar da fagocitose e da lise celular pelos neutrófilos devido aos inúmeros fatores de virulência que possui (Greenlee-Wacker *et al.*, 2014).

Mesmo com esses fatores de virulência, os neutrófilos são essenciais para a imunidade inata contra *S. aureus*. Kohler *et al.* (2011) evidenciaram isso ao observarem que camundongos com depleção desse fagócito possuem menor defesa contra *S. aureus*. A causa de septicemias derivadas desse patógeno foi atribuída principalmente à deficiência no recrutamento de neutrófilos. Evidenciaram-se, também, maiores níveis de defensinas, como HNP1-3, que são expressas por neutrófilos, mesmo essas sendo produzidas também em diferentes tipos de fagócitos.

De acordo com Breyne *et al.* (2015) em infecções experimentais em camundongos, após 24h e 48h da inoculação, as amostras de *Staphylococcus* não-*aureus*, *S. chromogenes* e *S. fleuretti*, continham influxo de células imunes, prioritariamente, neutrófilos. Esse mesmo estudo demonstrou que a indução da expressão ou produção de IL-6 e IL-1 β por *S. aureus* é significativamente maior do que nas estirpes de NAS. Um outro achado desses mesmos autores é o fato de as duas estirpes de *S. chromogenes* (uma de infecção intramamária persistente e outra do ápice do teto) apresentaram distribuição dispersa de neutrófilos no lúmen das glândulas mamárias em contraste com o *S. fleuretti* que apresentou neutrófilos densamente compactados (Figura 10).

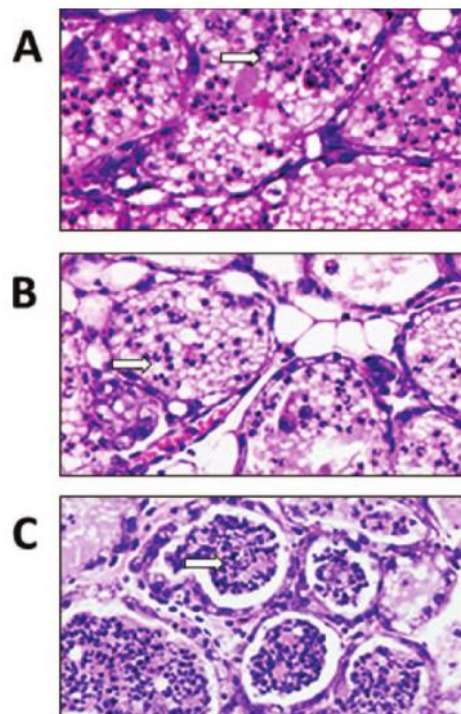


Figura 10: Infiltrado de neutrófilos no lúmen das glândulas mamárias (setas brancas). A - Infiltrado de neutrófilos devido a *S. chromogenes* de infecção mamária persistente; B - Infiltrado de neutrófilos devido a *S. chromogenes* de ápice do teto; C - Infiltrado de neutrófilos devido a *S. fleuretti*. Todas as imagens estão na mesma escala.

Fonte: Breyne *et al.* (2015)

Assim, percebeu-se que a defesa imunológica de primeira linha frente a esses patógenos e mecanismos compensatórios como a liberação de peptídeos antimicrobianos são dependentes dos neutrófilos. Kamenyeva *et al.* (2015) propõem que na infecção por *S. aureus*, esses fagócitos interagem com as células B, assim aumentando a resposta imune adaptativa contra a bactéria.

2.1.4.4 Células dendríticas: indução de células dendríticas tolerantes

As células dendríticas (Figura 9.A4) são as células apresentadoras de antígenos mais importantes envolvidas na estimulação de respostas de células T. Na periferia, essas células estão em estágio imaturo de diferenciação e possuem alto poder de fagocitose. Após encontrar os patógenos, essas são estimuladas e desenvolvem características de maturação devido a apresentação a moléculas MHC II. Também geram a regulação positiva de moléculas estimuladoras e secreção de citocinas e a partir de então as células dendríticas começam a migrar para os linfonodos drenantes (Merad *et al.*, 2013).

Além do seu importante papel na indução de respostas imunes específicas ao antígeno, há evidências de que as células dendríticas podem induzir tolerância imunológica e prevenir, inibir ou modular respostas efetoras por células T (Steinman *et al.*, 2003). Peshel e Otto (2013) relataram que as modulinas solúveis em fenol (PSM) estafilocócicas modulam a atuação de células dendríticas em relação ao TLR2, levando a um fenótipo tolerogênico. Dessa forma, o tratamento dessas células com PSM estafilocócica reduziu a capacidade de ativar células T e inibiu a diferenciação de Th1 (Schereiner *et al.*, 2013). Com isso, ficou evidenciado que a indução de células dendríticas por PSM é um fator de virulência usado por *S. aureus* para subverter a resposta imune.

2.1.4.5 Células supressoras derivadas de mieloides (MDSC)

As células supressoras derivadas de mieloides representam um grupo heterogêneo de células imaturas que exercem uma função imunossupressora, inibindo as respostas das células T (Gabrilovich, 2017). Os mecanismos usados para suprimir as respostas das células T incluem, entre outras coisas, a regulação positiva de fatores como arginase-1 (Arg-1) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Youn e Gabrielovich, 2010).

Devido a isso, notou-se que os patógenos desenvolveram mecanismos para sequestrar MDSC, com o objetivo de inibir a proteção das células T e promover a persistência no hospedeiro (Dai *et al.*, 2015). Heim *et al.* (2014) demonstraram que essas células foram o principal infiltrado encontrado em infecções ortopédicas por *S. aureus*. Devido a isso, houve inibição da proliferação de células T e produção de citocinas; logo, houve um atraso na resolução da infecção.

Tebartz *et al.* (2015) relataram altas taxas de MDSC com atividade imunossupressora em estudo com camundongos portadores de abscessos por *S. aureus*. Essas células levaram a um impacto negativo no controle da infecção, uma vez que promovem a sobrevivência da bactéria. Devido a todos os fatores citados, estima-se que as células supressoras derivadas de mieloides podem ser um alvo interessante de estudos terapêuticos para melhorar a resposta do organismo frente a infecções crônicas de *S. aureus*.

2.2 Imunidade adaptativa

A resposta imune contra *Staphylococcus* spp. envolve a ativação do sistema imunológico inato e do adaptativo. O sistema imune inato é a linha de frente da defesa do organismo, e esse é rapidamente ativado por vias que detectam padrões moleculares associados a patógenos, sendo que o resultado disso é a mobilização de células fagocíticas. A resposta adaptativa é ativada mais tarde, durante o curso da infecção, dependendo da ação das células apresentadoras de antígenos (APCs), influenciadas pelas citocinas geradas pela resposta inata (Bagnoli *et al.*, 2018). Dessa forma, o sistema imunológico adaptativo é capaz de aumentar a afinidade dos receptores de antígeno disponíveis com o antígeno alvo. Por fim, isso permite uma resposta imune mais rápida e seletiva, resultando em melhor proteção (Paul, 2013).

Todavia, a alta prevalência de infecções recorrentes por *S. aureus* sugere que a resposta de memória adaptativa não é completamente eficaz. Isso se deve ao fato de que existe uma grande heterogeneidade nos padrões de expressões antigênicas nessa espécie, visível mesmo em isolados derivados da mesma cepa. Ainda assim é importante o estudo dessa resposta imune, pois ela pode colaborar na identificação de fatores de risco, estratégias terapêuticas e vacinas (Bagnoli *et al.*, 2018).

2.2.1 Células B e anticorpos

As células B são em primeira instância, produtoras de imunoglobulinas (anticorpos). No entanto, essas possuem funções adicionais como apresentação de antígeno, produção de citocina e opsonização de patógenos para otimizar a fagocitose e a depuração (Fillatreau, 2013). Os anticorpos são as moléculas efetoras humorais do sistema imune adaptativo, sendo assim, os anticorpos neutralizantes se ligam a toxinas ou outros fatores de virulência liberadas por

Staphylococcus spp., interferindo nos seus efeitos ao organismo (Berube e Bubeck Wardenburg, 2013).

Desse modo, os anticorpos aderem à superfície bacteriana no qual o IgM e a maioria das subclasses de IgG acionam a via clássica da cascata do sistema complemento. *Staphylococcus aureus* é amplamente resistente à lise celular pelo complexo do complemento, mas fragmentos desse complemento, principalmente o C3b, se liga a superfície bacteriana para facilitar o reconhecimento e a captação por fagócitos. Esse último e o C5b possuem atividade quimiotática, já que recrutam células imunes adicionais a partir da corrente sanguínea para o local da invasão bacteriana (Zipfel e Skerka, 2014).

Nesse contexto, é visto que a aparente falta de ação dos anticorpos contra esse patógeno levanta a argumentação de que esse tipo de defesa não confere proteção contra infecções por *S. aureus*. Camundongos deficientes em células B não tiveram problemas na resolução de infecções com essa bactéria (Schmaler *et al.*, 2011). No entanto, outro trabalho demonstrou que infecções cutâneas primárias desse patógeno podem induzir proteção mediada contra infecções futuras em certas linhagens de camundongos (Montgomery *et al.*, 2014).

Adhikari *et al.* (2012) mediram anticorpos séricos para uma série de toxinas estafilocócicas e correlacionaram baixos títulos de anticorpos com maior risco de desenvolvimento de sepse. Um outro estudo relatou grandes quantidades de anticorpos anti-estafilocócicos em indivíduos portadores sem histórico de infecções. Esse resultado pode explicar o fato de que infecções observadas em portadores possuem uma melhor recuperação, mesmo considerando o risco aumentado de infecção dessas pessoas (Wertheim *et al.*, 2005).

2.2.2 Mecanismos de evasão da resposta humoral

Staphylococcus aureus desenvolveu mecanismos de evasão que combatem os anticorpos produzidos pelas células B. Em particular, os fatores de virulência proteína estafilocócica A (SpA) e a proteína de ligação a imunoglobulina (Sbi) (Smith *et al.*, 2011). SpA é uma proteína de superfície que se liga ao receptor Fc γ R do receptor de IgG de mamíferos, altera a função dessa e interfere na ativação do complemento e opsonofagocitose. Além de atuar dessa forma, a SpA interfere na sobrevivência das células B e inibe o desenvolvimento de respostas de anticorpos contra outros antígenos estafilocócicos em modelos com camundongos e em seres humanos (Pauli *et al.*, 2014).

Assim, a SpA quando ligada ao receptor de IgG impede a ligação dos receptores nas células apresentadoras de antígenos evitando uma absorção eficiente de antígenos bacterianos e levando o patógeno a escapar da captação mediada por FcγR. Como essa proteína é altamente abundante na parede celular de *Staphylococcus* spp. pode também ser lançada como molécula solúvel formando complexos com IgG, levando, então, a um escudo de imunoglobulina (Figura 11) (Broker *et al.*, 2014).

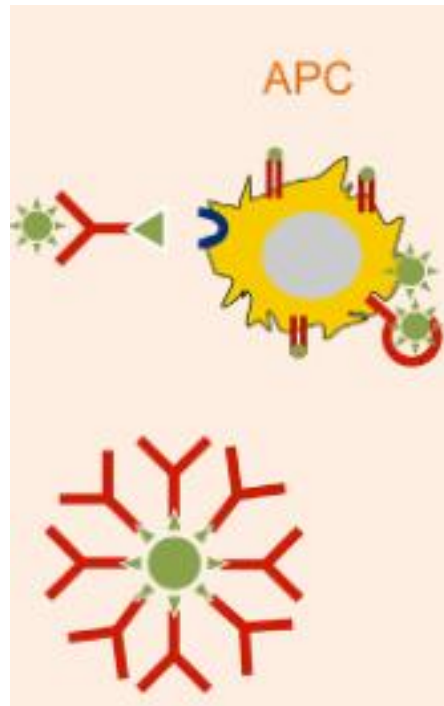


Figura 11. Modulação da resposta do sistema imune humoral pela SpA.
Fonte: Broker *et al.* (2014)

Ao contrário do SpA, a expressão da proteína Sbi na superfície celular é baixa, mas aumenta na presença de IgG, sugerindo um mecanismo altamente eficiente. Assim como o SpA, essa proteína também pode atuar tanto como ancorado na parede celular quanto secretado, como molécula solúvel (Smith *et al.*, 2011).

Além desses mecanismos, *S. aureus* também consegue abandonar seu nicho como patógeno extracelular e evitar a resposta imune como organismo intracelular facultativo. Por exemplo, ele consegue resistir a fagocitose e se manter dentro dos neutrófilos (Voyich *et al.*, 2005), ou persistir nas células epiteliais permitindo que esses evitem o tratamento antimicrobiano, promovendo o desenvolvimento da doença e a recorrência de infecções (Tuchscherr *et al.*, 2011).

2.2.3 Células T

As células T têm como função, reconhecer peptídeos derivados de antígeno, além de se diferenciarem com o objetivo de exercerem distintas funções. A maioria das células T é composta por T CD4⁺, que será discutida mais adiante, e CD8⁺. A principal função do CD8⁺ é eliminar patógenos intracelulares pela morte citolítica da célula hospedeira infectada, só que no caso do *S. aureus* que é, majoritariamente extracelular, ainda não foi identificado uma função clara dessa célula no combate a essa bactéria (Murphy *et al.*, 2014). Egawa *et al.* (2021) demonstraram que *S. aureus* chega aos linfonodos de drenagem (LD) por fluxo linfático imediatamente após a inoculação intradérmica experimental. Lá, essa bactéria induz a proliferação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ pela ativação de células dendríticas residentes nos LD.

Nesse contexto, sabe-se que as células apresentadoras de antígenos fagocitam e processam as principais MHC, que por sua vez interagem com os receptores do linfócito T (Mantegazza *et al.*, 2013). Dessa forma, a carga peptídica antigênica nas moléculas MHC-II geralmente ocorre em compartimentos da via endocítica. No processo de apresentação específica do antígeno, apenas uma fração muito pequena das células T (< 0,01%) é ativado inicialmente. Por outro lado, os superantígenos se ligam diretamente à molécula de MHC-II e ao receptor de células T extracelularmente sem ser processado e esses são capazes de ignorar os mecanismos do antígeno convencional, podendo ativar até 20% da população das células T (Figura 12) (Llewelyn e Cohen, 2002).

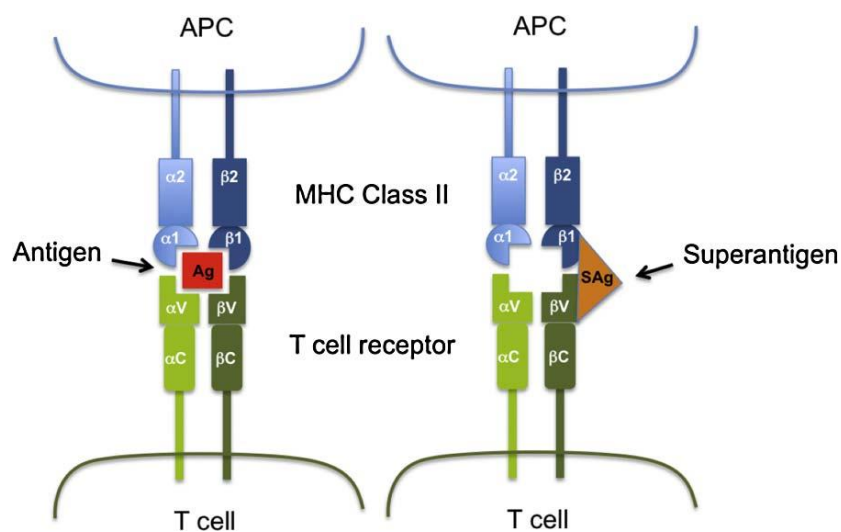


Figura 12. Representação esquemática das diferentes interações de antígenos e superantígenos com a molécula de MHC classe II na APC e no receptor de células T.
Fonte: Goldmann e Medina (2017)

Ainda sobre esse cenário, sabe-se que os mais importantes superantígenos produzidos por *Staphylococcus* são Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), enterotoxina estafilocócica B e C (Argudin *et al.*, 2010). Essas toxinas desencadeiam sintomas graves nos hospedeiros devido à “tempestade” de citocinas liberadas por células T estimuladas pelos superantígenos (Fraser, 2011).

Contudo, tem sido relatado que as células T CD4⁺ não são essenciais para a proteção de *S. aureus* em camundongos. Além disso, esse patógeno aparece ocasionalmente como causa de infecções em avaliações de humanos com deficiência de células T, embora seja complexo avaliar a contribuição dessas células no combate de *Staphylococcus* spp. (Schmaler *et al.*, 2011).

2.2.3.1 Células Th1

As células T CD4⁺ ao serem estimuladas por IL-12 levam a geração de um subgrupo denominado Th1. Apesar de serem capazes de produzir diversas citocinas inflamatórias, incluindo IL-2, TNF α e GM-CSF, essas células são definidas pela secreção do IFN- γ (Raphael *et al.*, 2014). Entre suas funções, o IFN- γ ativa células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos para promover a morte de patógenos intracelulares.

Guillen *et al.* (2002) relataram papel protetor da resposta do Th1 em infecções por *S. aureus*, pois a produção de TNF α e IFN γ nesses camundongos infectados resultaram em maior eliminação bacteriana e menor mortalidade em comparação com o grupo controle. Contudo, as células Th1 e a produção de IFN γ foram associadas por promover o recrutamento de neutrófilos mediado por quimiocina e isso resultou em aumento paradoxal da carga bacteriana, potencialmente, devido a capacidade de *S. aureus* persistirem em neutrófilos (McLoughlin *et al.*, 2008).

Dessa forma, as células Th1 parecem contribuir para a proteção induzida pela vacinação contra infecção por *S. aureus*, pois a produção de IFN γ foi necessária para o suporte contra a infecção sistêmica subsequente após vacinação com a proteína derivada de Als3p (proteína de *Candida* sp.) (Lin *et al.*, 2009). No entanto, em outro estudo, a proteção após a vacinação com células irradiadas contra infecção cutânea não foi associada a uma resposta do IFN γ e além disso, aumentou a mortalidade em camundongos vacinados após o desafio (Gaidamakova *et al.*, 2012).

Em resumo, ainda há controvérsias sobre a proteção de Th1 contra infecções de *S. aureus*, mostrando que esse suporte depende de fatores como via de infecção, carga do organismo, nível de indução, entre outros (Bagnoli *et al.*, 2018).

2.2.3.2 Células Th2

As células Th2 são formadas a partir da ativação das células T CD4⁺ pela presença de IL-4. Essas células desempenham papel importante na defesa do hospedeiro contra agentes extracelulares (Allen e Sutherland, 2014). A desregulação dessas células contribui para doenças alérgicas e atópicas (Raphael *et al.*, 2014).

A dermatite atópica é um distúrbio inflamatório cutâneo que se caracteriza pela expressão exacerbada de citocinas Th2. A colonização da pele por *S. aureus* é praticamente sempre presente em processos de dermatite atópica (Boguniewicz e Leung, 2011). As células Th2 podem não apenas induzir aspectos dessa doença e da susceptibilidade estafilocócica, mas a colonização por esse patógeno pode promover ainda mais esse ambiente propício para Th2, uma vez que componentes da parede celular bacteriana já demonstraram que induzem a resposta de Th2 (Matsui e Nishikawa, 2012).

Dessa maneira, parece claro que as respostas Th2 contribuem para um ciclo vicioso de inflamação e susceptibilidade de *S. aureus* na pele de portadores de dermatite atópica. No entanto, os efeitos de Th2 podem desempenhar um papel no equilíbrio adequado entre respostas inflamatórias e anti-inflamatórias, especialmente em infecções crônicas (Bagnoli *et al.*, 2018).

2.2.3.3 Células Th3

As células Th3 também são um subconjunto de T CD4⁺, essas são definidas pela expressão do receptor Ror γ t e secreção de citocinas, como IL-17^a, IL-17F e IL-22. Esses elementos atuam, principalmente, nas células epiteliais com o objetivo de melhorar a função de barreira, propriedades antimicrobianas e recrutamento de neutrófilos (Liang *et al.*, 2006).

As células Th3, também conhecidas como imunidade tipo 3, tem como uma das funções o controle de infecções por bactérias extracelulares piogênicas nas barreiras epiteliais. Como, na maioria das vezes, a mastite é causada por estafilococos, estreptococos e coliformes, isso irá

resultar em inflamação neutrofílica, então também pode-se esperar a mobilização de células Th3 na glândula mamária (Rainard *et al.*, 2020).

Pela primeira vez, Ishigame *et al.* (2009) publicaram um exemplo do papel protetor das células Th3 contra *S. aureus* já que em um experimento, camundongos deficientes em IL-17A e IL-17F desenvolveram espontaneamente infecções por esse patógeno. Complementando o que foi dito anteriormente, autores em outro estudo observaram que a indução de IL-17A demonstrou papel importante no controle de *S. aureus* e no tamanho dos abscessos após inoculação subcutânea (Cho *et al.*, 2010).

Percebe-se a importância das células Th3 para a imunidade humana, devido ao fato de portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana conviverem com a depleção dessas células e terem a chance aumentada de infecção por *Staphylococcus* spp. (Hidron *et al.*, 2010). Pacientes com dermatite atópica também apresentam citocinas da via IL-17 diminuídas contribuindo potencialmente para o desenvolvimento dos estafilococos (Guttman-Yassky *et al.*, 2008).

Nesse contexto, foi estudado o papel das células Th3 em um modelo de pneumonia por MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina). Os autores demonstraram que após a depleção de células T CD4⁺, que são indutoras de IL-17, ocorreu diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6. Esse resultado levou a uma melhor resolução da infecção, sugerindo, então, uma instabilidade entre imunidade protetora e imunopatologia (Parker *et al.*, 2015).

Portanto, a IL-17 de fontes inatas ou adaptativas desempenha um papel importante contra *S. aureus*. Indução das células Th3 por vacinação pode melhorar a proteção contra bacteremia (Bagnoli *et al.*, 2015). Essas células parecem ser peças-chave em potencial na imunidade contra esse patógeno, no entanto, a contribuição exata no desenvolvimento de doenças autoimunes deve ser mais investigada (Bagnoli *et al.*, 2018).

2.2.3.4 Células T Reguladoras

As células T reguladoras (T reg) são mediadas por citocinas e possuem funções imunossupressoras que neutralizam as respostas inflamatórias com o objetivo de manter a homeostase imunológica do organismo (Bagnoli *et al.*, 2018).

Desse modo, é característico que *S. aureus* se beneficie amplamente dos seus fatores de virulência, como o fato dele estimular células imunes. Inicialmente esse patógeno promove

inflamação mediada por células T induzidas pelos superantígenos, mas posteriormente promove um estágio de tolerância imune via morte celular induzida de células T reguladoras (Broker *et al.*, 2014).

Tebartz *et al.* (2015) relataram que *S. aureus* pode explorar essas funções imunossupressoras e induzir respostas T reg que irão contribuir, juntamente com outros mecanismos, para diminuir a resposta das células T durante modelos de infecção persistente. Em outro estudo, o aumento do número de T reg contribuíram para a desregulação imune e aumentaram a prevalência de *S. aureus* em pacientes com dermatite atópica (Ou *et al.*, 2004). Mais estudos serão necessários para a total compreensão da modulação da infecção de *Staphylococcus* spp. no papel de T reg (Bagnoli *et al.*, 2018).

2.3 PD-1 e seus ligantes

As moléculas de sinalização que são expressas na superfície de células imunes são divididas em coestimuladoras e cossupressoras. As coestimuladoras promovem a ativação de células T transmitindo sinais positivos, já as moléculas cossupressoras, são também conhecidas como *checkpoints*, pois tem como objetivo transmitir sinais negativos, levando a ausência de resposta, tolerância ou apoptose de células T (Chen e Flies, 2013) (Figura 13).

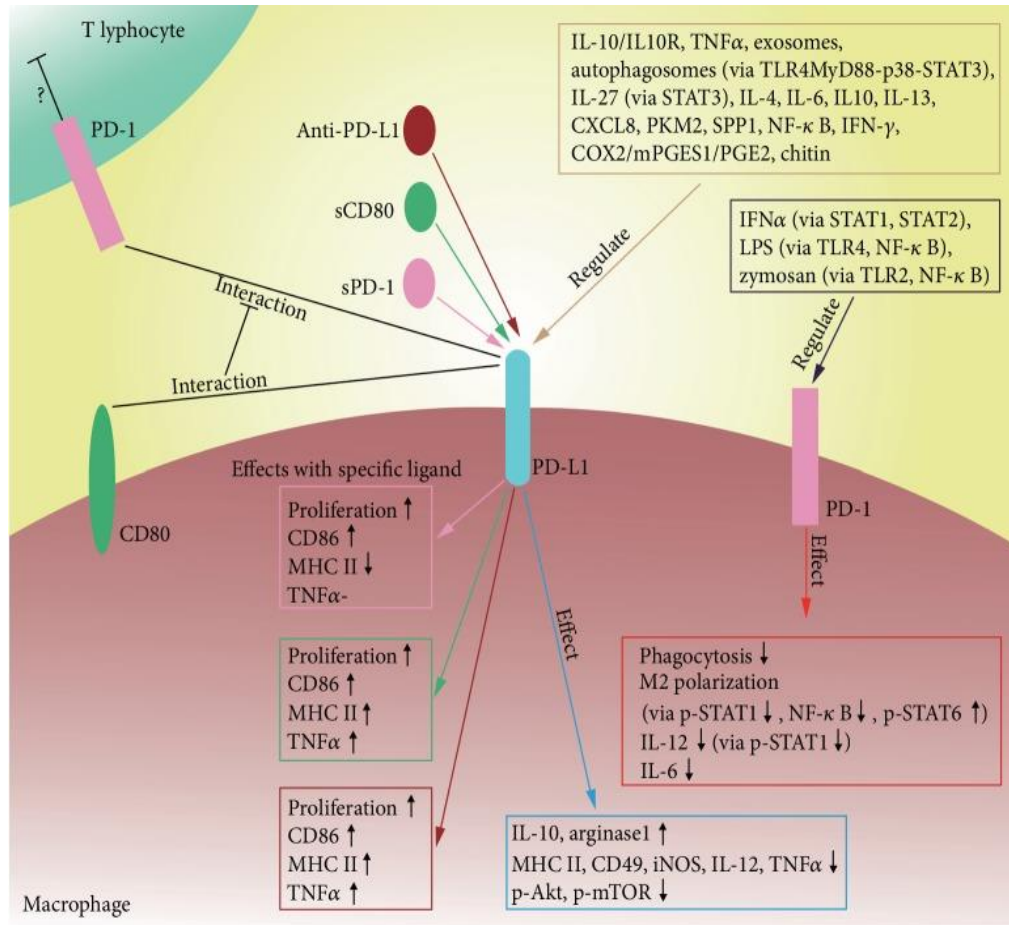


Figura 13: Imunometabolismo de PD-1 e PD-L1 em macrófagos.

Fonte: Lu *et al.* (2019)

Nesse contexto, sabe-se que a proteína de morte celular programada 1 (PD-1), também conhecida como CD279, foi inicialmente identificada como uma molécula cossupressora na superfície dos linfócitos T ativado, células B, células dendríticas e macrófagos. Com isso, interações entre PD-1 e seus ligantes, como PD-L1 (CD274) e PDL-2 (CD273), suprimem a ação de células T (Lu *et al.*, 2019). Também foi demonstrado que PD-L1 é amplamente localizado em células hematopoiéticas, incluindo células T, células B, células dendríticas e macrófagos, enquanto PD-L2 é expresso em mastócitos, macrófagos e células dendríticas (Sun *et al.*, 2018).

Terrazas *et al.* (2005) relataram que a combinação de PD-1 com PD-L1 em células T podem causar disfunções nessas células e apresentaram também uma função semelhante em macrófagos. No entanto, foi demonstrado que PD-L1, expresso em macrófagos associados a tumores, não inibem a resposta das células T (Singhal *et al.*, 2019). Desse modo Hartley *et al.* (2018) demonstraram que macrófagos com expressão de PD-L1 tornaram-se maiores e mais ativos e tiveram seus mecanismos de sobrevivência e proliferação aumentados após o

tratamento com anticorpos contra PD-L1. Esse resultado indicou um papel regulador de PD-L1 na proliferação e ativação de macrófagos.

Sendo assim, PD-1 é normalmente regulado positivamente na superfície dos linfócitos T ativados para limitar a magnitude da ativação celular. No entanto, alta carga de antígenos e inflamação prolongada, como em sepse por exemplo, induz a regulação positiva sustentada de PD-1 e PD-L1, levando ao comprometimento das respostas inatas e adaptativas. A interação de PD-1 com PD-L1 pode induzir a exaustão de células T, que é caracterizada pela perda das funções dessas células, diminuição da proliferação e morte celular apoptótica (Wherry e Kurachi, 2015; Boomer *et al.*, 2011).

Com isso, Patil *et al.* (2017) demonstraram que ao submeter camundongos a queimaduras por escalda seguido de infecções com *P. aeruginosa* e *S. aureus* houve aumento significativo de PD-L1 nas células juntamente com uma diminuição do número e função de células T. Esses pesquisadores também relataram que ao entrarem com tratamento com anticorpos anti-PD-L1 houve melhora da depuração bacteriana e redução de lesão nos órgãos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, J.; GOLDMANN, O.; ZIEGLER, C.; HOLTJE, C.; SMELTZER, M. S.; CHEUNG, A. L.; BRUHN, D.; ROHDE, M.; MEDINA, E. *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *Journal of Innate Immunity*, v. 3, n. 5, p. 495-507, 2011.

ACCARIAS, S.; LUGO-VILLARINO, G.; NEYROLLES, O.; BOULLIER, S.; TABOURET, G. Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice. *European Journal of Immunology*, v. 45, n. 3, p. 794-806, 2015.

ADHIKARI, R. P.; AJAO, A. O.; AMAN, M. J.; KARAUZUM, H.; SARWAR, J.; LYDECKER, A. D.; JOHNSON, J. K.; NGUYEN, C.; CHEN, W. H.; ROGHMANN, M. C. Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *S. aureus* infections. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 6, p. 915-923, 2012.

AGHAMOHAMMADI, M. D.; HAINE, D. F.; KELTON, H. W.; BARKEMA, H.; HOGEVEEN, G. P.; DUFOUR, S. Herd-level mastitis associated costs on Canadian dairy farms. *Frontier in Veterinary Science*, v. 5, n. 100, 2018.

ALLEN, J. E.; SUTHERLAND, T. E. Host protective roles of type 2 immunity: parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Seminars Immunology*, v. 26, n. 4, p. 329-340, 2014.

ALONSO, D.; NUNGESTOR, W. J. Comparative study of host resistance of guinea pigs and rats. V. The effect of pneumococcal products on glycolysis and oxygen uptake by polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 99, n. 2, p. 174-181, 1956.

ANGELONE, D. F.; WESSELS, M. R.; COUGHLIN, M. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo. *Pediatric Research*, v. 60, p. 205-209, 2006.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

ARIBI, M.; MEIZIANE, W.; HABI, S.; BOULATIKA, Y.; MARCHANDIN, H.; AYMERIC, J. L. Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* are enhanced in vivo by selenium supplementation in a dose-dependent manner. *Plos One*, v. 10, n. 9, 2015.

ARLEHAMN, C. S.; PETRILLI, V.; GROSS, O.; TSCHOPP, J.; EVANS, T. J. The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 14, p. 10508-10518, 2010.

ARSENIJEVIC, D.; ONUMA, H.; PECTUEUR, C.; RAIMBAULT, S.; MANNING, B. S.; MIROUX, B. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature Genetics*, v. 26, n. 4, p. 435-439, 2000.

ASANO, K.; CHEE, C. B.; GASTON, B.; LILLY, C. M.; GERARD, C.; DRAZEN, J. M.; STAMLER, J. S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, V. 91, P. 10089-10093, 1994.

BAGNOLI, F.; FONTANA, M. R.; SOLDANI, E.; MISHRA, R. P.; FIASCHI, L.; CARTOCCI, E.; NARDI-DEL, V.; NOSARI, S.; DE FALCO, M. G.; MARCHI, S.;

- MARIOTTI, P.; BACCONI, M.; TORRE, A.; BAUDNER, B.; GREGORIO, E.; RAPPUOLI, R.; GRANDI, G. Vaccine composition formulated with a novel TLR7-dependent adjuvant induces high and broad protection against *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 12, p. 3680-3685, 2015.
- BAGNOLI, F.; RAPPUOLI, R.; GRANDI, G. *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*, ed. 1, Springer, 2018.
- BARHEMA H.W.; GREEN. M. J.; BRADLEY.A.J.; ZADOKS.R.N. Invited review: the role contagious disease in udder health, *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 4717-4729, 2009.
- BARRON, L.; SMITH, A. M.; EL KASMI, K. C.; QUALLS, J. E.; HUANG, X.; CHEEVER, A.; BORTHWICK, L. A.; WILSON, M. S.; MURRAY, J. P.; WYNN, T. A. Role of Arginase 1 from myeloid cells in the Th2-dominated lung inflammation. *Plos One*, v. 8, 2013.
- BERUBE, B. J.; BUBECK WANDERNBURG, J. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*, v. 5, p. 1140-1166, 2013.
- BIRJANDI, S. Z.; IPPOLITO, J. A.; RAMADORAI, A. K.; WITTE, A. K. Alterations in marginal zone macrophages and marginal zone B cells in old mice. *Journal of Immunology*, v. 186, n. 6, p. 3441-3451, 2011.
- BLANCHET, C.; JOUVION, G.; FITTING, C.; CAVAILLON, J. M.; ADIB-CONQUY. Protective or deleterious role of scavenger receptors SR-A and CD36 on host resistance to *Staphylococcus aureus* depends on the site of infection. *Plos One*, v. 9, n. 1, 2014.
- BLOUIN, C. C.; PAGE, E. L.; SOUCY, G. M.; RICHARD, D. E. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood*, v. 103, n. 3, p. 1124-1130, 2004.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, p. 907-916, 2001.
- BOGUNIEWICZ, M.; LEUNG, D. Y. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunological Reviews*, v. 242, n. 1, p. 233-246, 2011.
- BOOMER, J. S.; TO, K.; CHANG, K. C. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Journal of the American Medical Association*, v. 306, p. 2594-2605, 2011.

- BRAY, P. J.; COTTON, R. G. H. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Human Mutation*, v. 21, p. 557-568, 2003.
- BREYNE, K.; DE VILEGHER, S.; DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; MEYER, E. Technical note: A pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 2, 2015.
- BROKER, B. M.; HOLTFRETER, S.; BEKEREDJIAN-DING, I. Immune control of *Staphylococcus aureus* - Regulation and counter-regulation of the adaptive immune response. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 304, p. 204-214, 2014.
- BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. Renal arginine metabolism. *Journal of Nutrition*, v. 134, p. 2791-2795, 2004.
- CADER, M. Z. BOROVIK, K.; ZHANG, Q.; ASSADI, G.; KEMPSTER, S. L.; SEWELL, G. W. C13 orf 31 (FAMIN) is a central regulator of immunometabolic function. *Nature Immunology*, v. 17, n. 9, p. 1046-1056, 2016.
- CASANOVA, J.; ABEL, L.; QUINTANA-MURCI, L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual Review of Immunology*, v. 29, p. 447-491, 2011.
- CHANG, J.; THANGAMANI, S.; KIM, M. H.; ULRICH, B.; MORIS, S. M.; KIM, C. H. Retinoic acid promotes the development of Arg1-expressing dendritic cells for the regulation of T-cell differentiation. *European Journal of Immunology*, v. 43, p. 967-968, 2013.
- CHENG, S. C.; QUINTIN, J.; CRAMER, R. A.; SHEPARDSON, K. M.; SAEED, S.; KUMAR, V. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, v. 345, 2014.
- CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, p. 227-242, 2013.
- CHO, J. S.; GUO, Y.; RAMOS, R. I.; HEBRONI, F.; PLAISIER, S. B.; XUAN, C.; GRANICK, J. L.; MATSUSHIMA, H.; TAKASHIMA, A.; IWAKURA, Y.; CHUENG, 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 Pathogens*, v. 8, n. 11, 2012.

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.; CHEUG, A. L.; CHENG, G.; MODLIN, R. L.; MILLER, L. S. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 5, p. 1762-1773, 2010.

CHOUCHANI, E. T.; PELL, V. R.; GAUDE, E.; AKSENTIJEVIC, D.; SUNDIER, S. Y.; ROBB, E. L. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, n. 515, p. 431-435, 2014.

CLOSS, E. I.; SIMON, A.; VEKONY, N.; ROTMANN, A. Plasma membrane transporters for Arginine. *Journal of Nutrition*, v. 134, p. 275-279, 2004.

CONDAS, L.A.Z.; DE BUCK, J.; NOBREGA, D.B.; CARSON, D.A.; ROY, J.P.; KEEFE, G.P.; DEVRIES, T.J.; MIDDLETON, J.R.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H.W. Distribution of non-aureus staphylococci species in udder quarters with low and high somatic cell count, and clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.100, p.5613-5627, 2017.

CÔTÉ-GRAVEL, J. E MALOUIN, F. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 4727-4740, 2019.

CURRIE, G. A. Activated macrophages kill tumor cells by releasing arginase. *Nature*, v. 273, 1978.

DAI, J.; EL GAZZER, M.; LI, G. Y.; MOORMAN, J. P.; YAO, Z.Q. Myeloid-derived suppressor cells: paradoxical roles in infection and immunity. *Journal of Innate Immunity*, v. 7, p. 116-126, 2015.

DALTON, D. K.; PITTS-MEEK, S.; KESHAV, S.; FIGARI, I. S.; BRADLEY, A.; STEWART, T. A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon gamma genes. *Science*, v. 259, p. 1739-1742, 1993.

DIEP, B. A; GILL, S. R.; PHAN, T. H.; CHEN, J. H.; DAVIDSON, M. G.; LIN, F.; LIN, J.; CARLETON, H. A.; MONGODIN, E. F.; SENSABAUGH, G. F.; PERDREAU-REMYNGTON, F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, v. 367, p. 731-739, 2006.

DIRKSEN, U.; HATTENHORST, U.; SCHNEIDER, P.; SCHROTEN, H.; GOBEL, U.; BOCKING, A.; MULLER, K. M.; MURRAY, R.; BURDACH, S. Defective expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 receptor common beta chain in children with acute myeloid leukemia associated with respiratory failure. *Blood*, v. 92, p. 1097-1103, 1998.

DISKIN, C.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 2018.

DORMAN, S. E.; HOLLAND, S. M. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 11, p. 321-333, 2000.

DUQUE-CORREA, M.; KUHL, A. A.; RODRIGUEZ, P. C.; ZEDLER, U.; SCHOMMER-LEITNER, S.; RAO, M.; WEINER, J.; HURWITZ, R.; QUALLS, J. E.; KOSMIADI, G. A.; MURRAY, P. J.; KAUFMANN, S. H. E.; REECE, S. T. Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, p. 4024-4032, 2014.

EGAWA, E.; ROEDIGER, B.; TAY, S. S.; CAVANAGH, L. L.; GUY, T. V.; FAZEKAS, B.; BRZOSKA, A. J.; FIRTH, N.; WENINGER, W. Bacterial antigen is directly delivered to the draining lymph nodes and activates CD8+ T cells during *Staphylococcus aureus* skin infection. *Immunology and Cell Biology*, v. 99, n. 3, p. 299-308, 2021.

EHRCHEN, J.; STEINMULLER, L.; BARCZYK, K.; TENBROCK, K.; NACKEN, W.; EISENACHER, M.; NORDHUES, U.; SORG, C.; SUDERKOTTER, C.; ROTH, J. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood*, v. 109, p. 1265-1274, 2007.

EL-HELOU, O.; BERBARI, E. F.; BROWN, R. A.; GRALEWSKI, J. H.; OSMON, D. R.; RAZONABLE, R. R. Functional assessment of Toll-like receptor 2 and its relevance in patients with *Staphylococcus aureus* infection of joint prosthesis. *Human Immunology*, v. 72, n. 1, p. 47-53, 2011.

EL KASMI, K. C.; QUALLS, J. E.; PESCE, J. T.; SMITH, A. M.; THOMPSON, R. W.; HENAO-TAMAYO, M.; BARSABA, R. J.; KONIG, T.; SCHLEICHER, U.; KOO, M.; KAPLAN, G.; FITZGERALD, K. A.; TUOMANEN, E. I.; ORME, I. M.; KANNEGANTI, T.; BOGDAN, C.; WYNN, T. A.; MURRAY, P. J. Toll-like receptor-induced arginase in

macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nature Immunology*, v. 9, p. 1399-1406, 2008.

EL KASMI, K. C.; STENMARK, K. R. Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function. *Seminars in Immunology*, v. 27, p. 267-275, 2015.

ETZRODT, M.; CORTEZ-RETAMOZO, V.; NEWTON, A.; ZHAO, J.; NG, A.; WILDGRUBER, M.; ROMERO, P.; WURDINGER, T.; XAVIER, R.; GEISSMANN, F.; MEYLAN, E.; NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K.; BALTIMORE, D.; WEISSLEDER, R. Regulation of monocyte functional heterogeneity by miR-146a and Relb. *Cell Reports*, v. 1, p. 317-324, 2012.

EVAVOLD, C. L.; KAGAN, J. C. How inflammasomes inform adaptive immunity. *Journal of Molecular Biology*, v. 430, p. 217-237, 2018.

EVERTS, B.; AMIEL, E.; VAN DER WINDT, G. J. W.; FREITAS, T. C.; CHOTT, R.; PEARCE, E. L.; PEARCE, E. J. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood*, v. 120, p. 1422-1431, 2012.

FEINGOLD, K. R.; SHIGENAGA, J. K.; KAZEMI, M. R.; MCDONALD, C. M.; PATZEK, S. M.; CROSS, A. S. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 92, n. 4, p. 829-839, 2012.

FENG, J.; LI, L.; OU, Z.; LI, Q.; GONG, B.; ZHAO, Z. IL-25 stimulates M2 macrophage polarization and thereby promotes mitochondrial respiratory capacity and lipolysis in adipose tissues against obesity. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 14, p. 1-13, 2017.

FERNANDEZ-AGUERA, M. C.; GAO, L.; GONZALES-RODRIGUES, P.; PINTADO, C. O.; ARIAS-MAYENCO, L.; GARCIA-FLORES, P. Oxygen sensing by arterial chemo-receptors depends on mitochondrial complex I signaling. *Cell Metabolism*, v. 22, n. 5, p. 825-837, 2015.

FRASER, J. D. Clarifying the mechanism of superantigen toxicity. *Plos Biology*, v. 9, 2011.

FREEMERMAN, A. J.; JOHNSON, A. R.; SACKS, G. N.; MILNER, J. J.; KIRK, E. L. TROESTER, M. A. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1) - mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 11, p. 7884-7896, 2014.

FILATREAU, S. Cytokine-producing B cells as regulators of pathogenic and protective immune response. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 72, n. 2., p. 80-84, 2013.

- FORD, A. Q.; HELLER, N. M.; STEPHENSON, L.; BOOTHBY, M. R. KEEGAN, A. D. An atopy-associated polymorphism in the ectodomain of the IL-4R (alpha) chain (V50) regulates the persistence of STAT6 phosphorylation. *Journal of Immunology*, v. 183, p. 1607-1616, 2009.
- FOTIADIS, D.; KANAI, Y.; PALACIN, M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Molecular. Aspects of Medicine*, v. 34, p. 139-158, 2013.
- FUNK, J. L.; FEINGOLD, K. R.; MOSER, A. H.; GRUNFELD, C. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induce lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis*, v. 98, n. 1, p. 67-82, 1993.
- GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology Research*, v. 5, p. 3-8, 2017.
- GAIDAMAKOVA, E. K.; MYLES, I. A.; MCDANIEL, D. P.; FOWLER, P. A.; NAIK, S.; GAYEN, M.; GUPTA, P.; SHARMA, A.; GLASS, P. J.; MAHESHWARI, R. K.; DATTA, S. K.; DALY, M. J. Preserving immunogenicity of lethally irradiated viral and bacterial vaccine epitopes using a radio-protective Mn²⁺ - Peptide complex from *Deinococcus*. *Cell Host and Microbe*, v. 12, n. 1, p. 117-124, 2012.
- GELLER, D. A.; LOWENSTEIN, C. J.; SHAPIRO, R. A.; NUSSLER, A. K.; SILVIO, M.; WANG, S. C.; NAKAYAMA, D. K.; SIMMONS, R. L.; SNYDER, S. H.; BILLER, T. R. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, p. 3491-3495, 1993.
- GOBERT, A. P.; MCGEE, D. J.; AKHTAR, M.; MENDZ, G. L.; NEWTON, J. C.; CHENG, Y. L.; MOBLEY, H. L. T.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, p. 13844-13849, 2001.
- GOLDMANN, O.; MEDINA, E. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. *International Journal of Medical Microbiology*. 2017.
- GORDON, S. The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology*, v.37, p. 9–17, 2007.
- GREENLEE-WACKER, M. C.; DELEO, F. R.; NAUSEEF, W. M. How methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evade neutrophil killing. *Current Opinion in Hematology*, v. 22, n. 1, p. 30-35, 2015.

GREENLEE-WACKER M. C.; RIGBY K. M.; KOBAYASHI, S. D.; PORTER, A. D.; DELEO, F. R.; NAUSEEF, W., M. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. *Journal of Immunology*, v. 192, n. 10, p. 4709, 4717, 2014.

GUILLEN, C.; MCINNES, I. B.; VAUGHAN, D. M.; KOMMAJOSYULA, S.; VAN BERKEL, P. H.; LEUNG, B. P.; AGUILA, A.; BROCK, J. H. Enhanced Th1 response to *Staphylococcus aureus* infection in human lactoferrin-transgenic mice. *Journal of Immunology*, v. 168, n. 8, p. 3950-3957, 2002.

GUTTMAN-YASSKY, E.; LOWES, M. A.; FUENTES-DUCULAN, J.; ZABA, L. C.; CARDINALE, I.; NOGRALES, K. E.; KHATCHERIAN, A.; NOVIRSKAYA, I.; CARUCCI, J. A.; BERGMAN, R.; KRUEGER, J. G. Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis. *Journal of Immunology*, v. 181, n. 10, p. 7420-7427, 2008.

HAGAR, J. A.; POWELL, D. A.; AACHOUI, Y.; ERNST, R. K.; MIAO, E. A. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*, v. 341, p. 1250-1253, 2013.

HALL, C. J.; BOYLE, R. H.; ASTIN, J. W.; FLORES, M. V.; OEHLERS, S. H.; SANDERSON, L. E., ELLETT, F. Immunoresponsive gene 1 augments bactericidal activity of macrophage-lineage cells by regulating beta-oxidation dependent mitochondrial ROS production. *Cell Metabolism*, v. 18, p. 265-278, 2013.

HAO, N.; LU, M.; FAN, Y.; CAO, Y.; ZHANG, Z.; YANG, S. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical and Development Immunology*, 2012.

HARRISON, E. M.; PATERSON, G. K.; HOLDEN, M. T.; LARSEN, J.; STEGGER, M.; LARSEN, A. R.; PETERSEN, A.; SKOV, R. L.; CHRISTENSEN, J. M.; ZEUTHEN, A. B.; HELTBERG, O.; HARRIS, S. R.; ZADOKS, R. N.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J.; HOLMES, M. A. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Molecular Medicine*, v. 5, n. 4, 2013.

HARTLEY, G. P.; CHOW, D. T.; AMMONS, W. Wheat, and S. W. Dow, "Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation. *Cancer Immunology Research*, v. 6, n. 10, 2018.

HASCHEMI, A.; KOSMA, P.; GILLE, L.; EVANS, C. R.; BURANT, C. F.; STARKL, P. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metabolism*, v. 15, n. 6, p. 813-826, 2012.

HAYES, S. M.; HOWLIN, R.; JOHNSTON, D. A.; WEBB, J. S.; CLARKE, S. C.; STOODLEY, P.; HARRIES, P. G.; WILSON, S. I.; PENDER, S. L.; FAUST, S. N.; HALL-STOODLEY, L.; SALIB, R. J. Intracellular residency of *Staphylococcus aureus* within mast cells in nasal polyps: a novel observation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015.

HEIM, C. E.; VIDLAK, D.; SCHERR, T. D.; KOZEL, J. A.; HOLZAPFEL, M.; MUIRHEAD, D. E.; KIELIAN, T. Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *Journal of Immunology*, v. 192, p. 3778-3792, 2014.

HERBERT, D. R.; OREKOV, T.; ROLOSON, A.; ILIES, M.; PERKINS, C.; O'BRIEN, W.; CEDERBAUM, S.; CHRISTIANSON, D. W.; ZIMMERMANN, N.; ROTHERNBERG, M. E.; FINKELMAN, F. D. Arginase I suppresses IL-12/ IL-23p40 – driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. *Journal of Immunology*, v. 184, p. 6438-6446, 2010.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and amino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, v. 235, p. 473-476, 1987.

HIDRON, A. L.; KEMPKER, R.; MOANNA, A.; RIMLAND, D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. *Infection and Drug Resistance*, v. 3, p. 73-86, 2010.

HILLIER, S.; CHARNETZKY, W. T. Glyoxylate bypass enzymes in *Yersinia* species and multiple forms of isocitrate lyase in *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology*, v. 145, p. 452-458, 1981.

HILMI, D.; PARCINA, M.; STOLLEWERK, D.; OSTROP, J.; JOSTEN, M.; MEILAENDER, A.; ZAEHRINGER, U.; WICHELHAUS, T. A.; BIERBAUM, G.; HEEG, K.; WOLZ, C.; BEKEREDIJAN-DING, I. Heterogeneity of host TLR2 stimulation by *Staphylococcus aureus* isolates. *Plos One*, v. 9, n. 5, 2014.

HRUZ, P.; ZINKERNAGEL, A. S.; JENIKOVA, G.; BOTWIN, G. J.; HUGOT, J. P.; KARIN, M.; NIZET, V.; ECKMANN, L. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune

activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 31, p. 12873-12878, 2009.

HOLLAND, J. K., J. C.; HADRICH, C. A.; WOLF J. L. Economics of measuring costs due to mastitis-related milk loss. In.: *AAEA e WAEA Joint Annual Meeting*, San Francisco, CA, 2015.

HUANG, S. C.; EVERTS, B.; IVANOVA, Y.; O'SULLIVAN, D.; NASCIMENTO, M.; SMITH, A. M. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nature Immunology*, v. 15, n. 9, p. 846-855, 2014.

HUANG, S. C.; HENDRIKS, W.; ALTHAGE, A.; HEMMI, S.; BLUETHMANN, H.; KAMIJO, R.; VILCEK, J.; ZINKERNAGEL, R. M.; AGUET, M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*, v. 259, p. 1739-1742, 1993.

HU, X.; IVASHKIV, L. B. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*, v. 31, p. 539-550, 2009.

INFANTINO, V.; CONVERTINI, P.; CUCCI, I.; PANARO, M. A.; DI NOIA, M. A.; CALVELLO, R.; PALMIERI, F. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochemical Journal*, v. 438, p. 433-436, 2011.

IP, W. K. E.; HOSHI, N.; SHOUVAL, D. S.; SNAPPER, S.; MEDZHITOV, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, v. 356, p. 513-519, 2017.

IP, W. K. E.; TAKAHASHI, K.; MOORE, K. J.; STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *Journal of Experimental Medicine*, v. 205, n. 1, p. 169-181, 2008.

ISHIGAME, H.; KAKUTA, S.; NAGAI, T.; KADOKI, M.; NAMBU, A.; KOMIYAMA, Y.; FUJIKADO, N.; TANAHASHI, Y.; AKITSU, A.; KOTAKI, H. SUDO, K.; NAKAE, S.; SASAKAWA, C.; IWAKURA, Y. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, v. 30, n. 1, p. 108-119, 2009.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Short communication: prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 4, p. 2226-2230, 2014.

JHA, A. K.; HUANG, S. C.; SERGUSHICHEV, A.; LAMPROPOULOU, V.; IVANOVA, Y.; LOGINICHEVA, E.; CHIMIELEWSKI, K. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, v. 42, p. 419-430, 2015.

KAMENYEVA, O.; BOULARAN, C.; KABAT, J.; CHEUNG, G. Y.; CICALA, C.; YEH, A. J.; CHAN, J. L.; PERIASAMY, S.; OTTO, M.; KEHRL, H. Neutrophil recruitment to lymph nodes limits local humoral response to *Staphylococcus aureus*. *Plos Pathogens*, v. 11, n. 4, 2015.

KAUFMANN, S. H. E. Elie Metchnikoff and his drawings of bacterial phagocytosis by macrophages. *Nature Immunology*, v. 9, p. 705-712, 2008.

KAWAHARA, K.; GOTOH, T.; OYADOMARI, S.; KAJIZONO, M.; KUNIYASU, A., OHSAWA, K.; IMAI, Y.; KOHSAKA, H.; NAKAYAMA, H.; MORI, M. Co-induction of argininosuccinate synthetase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells. *Molecular Brain Research*, v. 90, p. 165-173, 2001.

KELLY, B.; TANNAHILL, G. M.; MURPHY, M. P.; O'NEILL, L. A. Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from NADH: ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1beta (IL-1beta) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 33, 2015.

KIELIAN, T.; HANEY, A.; MAYES, P. M.; GARG, S.; ESEN, E. Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 11, p. 7428-7435, 2005.

KITOWSKA, K.; ZAKRZEWICZ, D.; KONIGSHOFF, M.; CHOBAK, I.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; BULAU, P.; EICKELBERG, O. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 294, p. 34-45. 2008.

KLEIMAN, A.; HUBNER, S.; RODRIGUEZ PARKITNA, J. M.; NEUMANN, A.; HOFER, S.; WEIGAND, M. A.; BAUER, M.; SCHMID, W.; SCHUTZ, G.; LIBERT, C.; REICHARDT, H. M.; TUCKRTMANN, J. P. Glucocorticoid receptor dimerization is required for survival in septic shock via suppression of interleukin-1 in macrophages. *The FASEB Journal*, v. 26, p. 722-729, 2012.

KOHLER, J.; BREITBACH, K.; RENNER, C.; HEITSCH, A. K.; BAST, A.; VAN ROOIJEN, N.; VOGELGESANG, S.; STEINMETZ, I. NADPH-oxidase but not inducible nitric oxide synthase contributes to resistance in a murine *Staphylococcus aureus* Newman pneumonia model. *Microbes Infection*, v. 13, n. 11, p. 914-922, 2011.

KRAUSGRUBER, T.; BLAZEK, K.; SMALLIE, T.; ALZABIN, S.; LOCKSTONE, H.; SAHGAL, N.; HUSSEL, T.; FELDMANN, M.; UDALOVA, I. A. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature Immunology*, v. 12, p. 231-238, 2011.

KUROKAWA, K.; GONG, J. H.; RYU, K. H.; ZHENG, L.; CHAE, J. H.; KIM, M. S.; LEE, B. L. Biochemical characterization of evasion from peptidoglycan recognition by *Staphylococcus aureus* D-alanylated wall teichoic acid in insect innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 35, n. 8, p.835-839, 2011.

LABROUSSE, D.; PERRET, M.; HAYVEZ, D.; DA SILVA, S.; BADIOU, C.; COUZON, F.; BES, M.; CHAVANET, P., LINA, G. VANDENESCH, F.; CROISIER-BERTIN, D.; HENRY, T. Kineret(R)/IL-1ra blocks the IL-1/IL-8 inflammatory cascade during recombinant Panton Valentine Leukocidin-triggered pneumonia but not during *S. aureus* infection. *Plos One*, v. 9, n. 6, 2014.

LADEIRA, C.G.; SOUZA, F.N.; GUIMARÃES, A.S.; RIBEIRO, J.B.; BRITO, M.A.V.P.; HEIENAMNN, M.B.; MORENO, L.Z.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Molecular identification of *Staphylococcus aureus* isolated from intramammary infections with distinct clinical patterns in dairy cows. *VIII Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite*, 2019.

LAHIRI, A.; DAS, P.; CHAKRAVORTTY, D. New tricks new ways: exploitation of a multifunctional enzyme arginase by pathogens. *Virulence*, 2010.

LANG, R.; PATEL, D.; MORRIS, J. J.; RUTSCHMMAN, R. L.; MURRAY, P. J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *Journal of Immunology*, v. 169, p. 2253-2263, 2002.

LEE, J.; RYU, H.; FERRANTE, R. J.; MORRIS, S. M.; RATAN, R. R. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 4843-4848, 2003.

- LEE, S. H. I.; CAMARGO, C. H.; GONÇALVES, J. L.; CRUZ, A. G.; SARTORI, B. T.; MACHADO, M. B.; OLIVEIRA, C. A. F. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, v.95, p. 7377-7383, 2012.
- LEHTONEN, A.; AHLFORS, H.; VECKMAN, V.; MIETTINEN, M.; LAHESMAA, R.; JULKUENEN, I. Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 82, p. 710-720, 2007.
- LIANG, S. C.; TAN, X. Y.; LUXENBERG, D. P.; KARIM, R.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; COLLINS, M.; FOUSER, L. A. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, v.203, n. 10, p. 2271-2279, 2006.
- LINDGREN, J. K.; THOMAS, V. C.; OLSON, M. E.; CHAUDHARI, S. S.; NUXOLL, A. S.; SCHAEFFER, C. R.; LINDGREN, K. E.; JONES, J.; ZIMMERMAN, M. C.; DUNMAN, P. M.; BAYLES, K. W.; FREY, P. D. Arginine deiminase in *Staphylococcus epidermidis* functions to augment biofilm maturation through pH homeostasis. *Journal of Bacteriology*, v. 196, p. 2277-2289, 2014.
- LLEWELYN. M.; COHEN, J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 156-162, 2002.
- LU, D.; NI, Z.; LIU, X.; FENG, S.; DONG, X.; SHI, X.; ZHAI, J.; MAI, S.; JIANG, J.; WANG, Z.; WU, H.; CAI, K. Beyond T Cells: Understanding the role of PD-1/PD-L1 in tumor-associated macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2019.
- MAARSINGH, H.; DEKKERS, B. G.; ZUIDHOF, A. B.; BOS, I. S.; MENZEN, M. H.; KLEIN, T. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. *European Respiratory Journal*, v. 38, p. 318-328, 2011.
- MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 323-350, 1997.
- MAHER, B. M.; MULCAHY, M. E.; MURPHY, A. G.; WILK, M.; O'KEEFFE, K. M.; GEOGHEGAN, J. A.; LAVELLE, E. C.; MCLOUGHLIN, R. M. Nlrp-3-driven interleukin 17 production by $\gamma\delta$ T cells controls infection outcomes during *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Infection and Immunity*, v. 81, n. 12, 2013.

MALDRINO, M. I.; FUCHO, R.; WEBER, M.; CALDERON-DOMINGUEZ, M.; MIR, J. F.; VALCARCEL, L. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, v. 308, n. 9, p. 756-769, 2015.

MANTEGAZZA, A. R.; MAGALHÃES, J. G.; AMIGORENA, S.; MARKS, M. S. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*, v. 14, p. 135-152, 2013.

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

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of Immunology*, v. 177, p. 303-311, 2006.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage action: time for reassessment. *F1000 Prime Reports*, p. 14, 2014.

MATSUI, K.; NISIKAWA, A. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces T(H)2 immune response in mice. *Journal of Investigation Allergology and Clinical Immunology*, v. 22, n. 2, p. 80-86, 2012.

MATTILA, J. T.; OJO, O. O.; KEPKA-LENHART, D.; MARINO, S.; KIM, J. H.; EUM, S. Y.; VIA, L. E.; BARY, C. E.; KLEIN, E.; KIRSHNER, D. E.; MORRIS, M.; LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Microenvironments in *Tuberculous granulomas* are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. *Journal of Immunology*, v. 191, p. 773-784, 2013.

MC LOUGHLIN, R. M.; LEE, J.C.; KASPER, D. L.; TZIANABOS, A. O. IFN-gamma regulated chemokine production determines the outcome of *Staphylococcus aureus* infection, *Journal of Immunology*, v. 181, n. 2, p. 1323-1332, 2008.

MEISER, J.; KRAMER, L.; SAPCARIU, S. C.; BATTELLO, N.; GJELFI, J.; D'HEROUEL, A. F. Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 8, p. 3932-3946, 2016.

MERAD, M.; SATHE, P.; HELF, J.; MILLER, J.; MORTHA, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*, v. 31, p. 563-604, 2013.

MICHELUCCI, A.; CORDES, T.; GHELFI, J.; PAILLOT, A.; REILING, N.; GOLDMANN, O.; BINZ, T. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, p. 7820-7825, 2013.

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

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

MILLS, C. D. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Critical Reviews in Immunology*, v. 21, p. 399-425, 2001.

MILLS, E. L.; O'NEILL, L. A. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *European Journal of Immunology*, v. 46. P. 13-21, 2016.

MODELELL, M.; CORRALIZA, I. M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by Th1 and Th2 cytokines. *European Journal of Immunology*, v. 25, p. 1101-1104, 1995.

MONTGOMERY, C. P.; DANIELS, M.; ZHAO, F.; ALEGRE, M. L.; CHONG, A. S.; DAUM, R. S. Protective immunity against recurrent *Staphylococcus aureus* skin infection requires antibody and interleukin-17A. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 5, p. 2125-2134, 2014.

MOON, J. S.; LEE, S.; PARK, M. A.; SIEMPOS, I. I.; HASLIP, M.; LEE, P. J. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 2, p. 665-680, 2015.

MORRIS, S. M. Arginine metabolism revisited. *Journal of Nutrition*, v. 146, p. 2579-2586, 2016.

MURPHY, A. G.; O'KEEFFE, K. M.; LALOR, S. J.; MAHER, B. M.; MILIS, K. H.; MCLOUGHILIN, R. M. *Staphylococcus aureus* infection of mice expands a population of

memory gamma delta T cells that are protective against subsequent infection. *Journal of Immunology*, v. 192, n. 8, p. 3697-3708, 2014.

MURRAY, P. J. Amino acid auxotrophy as a system of immunological control nodes. *Nature Immunology*, v. 17, n. 2, 2016.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 723-737, 2011.

NAVQI, S.A.; DE BUCK, J.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H. W. Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. *Journal of Dairy Science*, v.101, p.3233-3247, 2018.

NGUYEN, K. D.; QIU, Y.; CUI, X.; GOH, Y. P. S.; MWANGI, J.; DAVID, T.; MUKUNDAN, L.; BROMBACHER, F.; LOCKSLEY, R. M.; CHAWLA, A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, v. 480, p. 104-108, 2011.

NGUYEN, M. T.; KRAFT, B.; YU, W.; DEMICRIOGLU, D. D.; HERTLEIN, T.; BURIAN, M.; SCHMALER, M.; BOLLER, K.; BEKEREDJIAN-DING, I.; OHLSEN, K.; SCHITTEK, B.; GOTZ, F. The nuSa alpha specific lipoprotein like cluster (lpl) of *S. aureus* USA300 contributes to immune stimulation and invasion in human cells. *Plos Pathogens*, v. 11, n. 6, 2015.

NICHOLSON, B.; MANNER, C. K.; KLEEMAN, J.; MACLEOD, C. L. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 15881-15885, 2001.

NIEBUHR, M.; HERATIZADEH, A.; WICHMANN, K.; SATZGER, I.; WERFEL, T. Intrinsic alterations of pro-inflammatory mediators in unstimulated and TLR-2 stimulated keratinocytes from atopic dermatitis patients. *Experimental Dermatology*, v. 20, n. 6, p. 468-472, 2011.

NYMAN, A.K.; FASTH, C.; WALLER, K.P. Intramammary infections with different non-aureus staphylococci in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.101, p.1403-1418, 2018.

O'NEILL, L. A.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 9, p. 553-565, 2016.

- OREN, R.; FARNHAM, A. E.; SAITO, K.; MILOFSKY, E.; KARNOVSKY, M. L. Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *Journal of Cell Biology*, v. 17, p. 487-501, 1963.
- OU, L. S.; GOLEVA, E.; HALL, C.; LEUNG, D. Y. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *Journal of Investigation Allergology and Clinical Immunology*, v. 113, n. 4, p. 756-763, 2004.
- PACHECO, F. C.; CARDOSO, E. M. Imunidade inata e inflamação. *Fundamentos da Imunologia*, p. 57-102, 2012.
- PARKER, D.; RYAN, C. L.; ALONZO, F.; TORRES, V. J.; PLANET, P. J.; PRINCE, A. S. CD4+ T cells promote the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 5, p. 835-845, 2015.
- PARK-MIN, K.; ANTONIV, T. T.; IVASHKIV, L. B. Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology*, v. 210, p. 77-86, 2005.
- PATIL, N. K.; LUAN, L.; BOHANNON, J. K.; HERNANDEZ, A.; GUO, Y.; SHERWOOD, W. E. Anti-PD-L1 protects Against infection with common bacterial pathogens after burn injury. *Journal of Leukocyte biology*, v. 33, p. 103-123, 2018.
- PAULI, N. T.; KIM, H. K.; FALUGI, F.; HUANG, M.; DULAC, J.; HENRY DUNAND, C.; ZHENG, N. Y.; KAUR, K.; ANDREWS, S. F.; HUANG, Y.; DEDENT, A.; FRANK, K. M.; CHARNOT-KATSIKAS, A.; SCHNEEWIND, O.; WILSON, P. C. *Staphylococcus aureus* infection induces protein A- mediated immune evasion in humans. *Journal of Experimental Medicine*, v. 211, n. 12, p. 2331-2339, 2014.
- PAUL, W. E. The immune system. *Fundamental Immunology*, ed. 7, p. 1-21, 2013.
- PAVLOU, S.; WANG, L.; XU, H.; CHEN, M. Higher phagocytic activity of thioglycol-late-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *Journal of Inflammation*, v. 14, n. 4, 2017.
- PEARCE, E.L.; PEARCE, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, v. 38, p. 633-643, 2013.
- PESCHEL, A.; OTTO, M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 667-673, 2013.

PLANET, P. J.; LARUSSA, S. J.; DANA, A.; SMITH, H.; XU, A.; RYAN, C.; UHLEMANN, A.; BOUNDY, S.; GOLDBERG, J.; APURVA, N.; KULKAMI, R.; RATNER, A. J.; GEOGHEGAN, J. A.; KOLOKOTRONIS, S.; PRINCE, A. Emergence of the epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catalabolic mobile element and speG-mediated adaptations for survival on skin. *mBio*, v. 4, n. 6, 2013.

PRADO, R. R.; FREITAS, E. A.; JUNIOR, E. C. V.; COSTA, P. C.; SIQUEIRA, M. C.; ROSSI, D. A. *Staphylococcus* spp.: importantes riscos à saúde pública. *Publicações em Medicina Veterinária*, v. 9, p. 363-368, 2015.

PRAJSNAR, T. K.; HAMILTON, R.; GARCIA-LARA, J.; MCVICKER, G.; WILLIAMS, A.; BOOTS, M. A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *Staphylococcus aureus* in a zebrafish model. *Cellular Microbiology*, v. 14, p. 1600-1619, 2012.

PEGG, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, v. 61, p. 880-894, 2009.

POLLITT, E. J.; SZKUTA, P. T.; BURNS, N.; FOSTER, S. J. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *Plos Pathogens*, v.14, 2018.

QUALLS, J. E.; NEALE, G.; SMITH, A. M.; KOO, M.; FREITAS, A. A.; ZHANG, H.; KAPLAN, G.; WATOWICH, S. S.; MURRAY, P. J. Arginine usage in mycobacteria – infected macrophages depends on autocrine-paracrine cytokine signaling. *Science Signaling*, v. 3, 2010.

QUALLS, J. E.; SUBRAMANIAN, C.; RAFI, W.; SMITH, A. M.; BALOUZIAN, L.; DEFREITAS, A. A.; SHIREY, K. A. Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1. *Cell Host & Microbe*, v. 12, p. 313-323, 2012.

RADEMAKERS, R.; BAKER, M.; NICHOLSON, A. M.; RUTHERFORD, N. J.; FINCH, N.; SOTO-ORTOLAZA, A.; LASH, J.; WIDER, C.; WOJTAS, A.; DEJESUS-HERNANDEZ, M.; ADAMSON, J.; KOURI, N. SUNDAL, C.; SHUSTER, E. A.; AASLY, J.; MACKENZIE, J.; ROEBER, S.; KRETZSCHMAR, H. A.; BOEVE, B. F.; KNOPMAN, D. S.; PETERSEN, R. C.; CAIRNS, N. J.; GHETTI, B.; SPINA, S.; GARBERN, J.; TSELIS, A. C.; UITTI, R.; MESCHIA, J. F. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nature Genetics*, v. 44, p. 200-205, 2012.

- RAINARD, P.; CUNHA, P.; MARTINS, R. P.; GILBERT, F. B.; GERMON, P.; FOUCRAS, G. Type 3 immunity: a perspective for the defense of the mammary gland against infections. *Veterinary Research*, v. 51, n. 1, 2020.
- RAPHAEL, I.; NALAWADE, S.; EAGAR, T. N.; FORSTHUBER, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, v. 74, p. 5-17, 2014.
- RAPOVY, S. M.; ZHAO, J.; BRICKER, R. L.; SCHMIDT, S. M.; SETCHELL, K. D. R.; QUALLS, J. E. Differential Requirements for L-citrilline and L-arginine during antimycobacterial macrophage activity. *Journal of Immunology*, v. 195, p. 3293-3300, 2015.
- RATH, M.; MULLER, I.; KROPF, P.; CLOSS, E. I.; MUNDER, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 5, 2014.
- RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signaling Technology*, v. 24, n.5, p. 981-90, 2012.
- REECE, S. T.; LODDENKEMPER, C.; ASKEW, D. J.; ZEDLER, U.; SCHOMMERLEITNER, S.; STEIN, M.; MIR, F. A.; DORHOI, A.; MOLLENKOOPF, H.; SILVERMAN, A.; KAUFMANN, S. H. E. Serine protease activity contributes to control of *Mycobacterium tuberculosis* in hypoxic lung granulomas in mice, *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, p. 3365-3376, 2010.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 31, p. 986-1000, 2011.
- RUEGG, P. L. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 381-397, 2017.
- SAMBA, H. TAKEDA, N.; ISAGAWA, T.; SUGIURA, Y.; HONDA, K.; WAKE, M. HIF-1alpha-PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nature Communications*, 2016.
- SANTA, F.; BAROZZI, I.; MIETTON, F.; GHISLETTI, S.; POLLETTI, S.; TUSI, B. K.; MULLER, H.; RAGOUSSIS, J.; WEI, C.; NATOLI, G. A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *Plos Biology*, v. 8, 2010.

SCHAFFLER, H.; DERMICIOGLU, D. D.; KUHNER, D.; MENZ, S.; BENDER, A.; AUTENRIETH, I. B.; BODAMMER, P.; LAMPRECHT, G.; GOTZ, F.; FRICK, J. S. NOD2 stimulation by *Staphylococcus aureus*- derived peptidoglycan is boosted by Toll-like receptor 2 costimulation with lipoproteins in dendritic cells. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 11, p. 4681-4688, 2014.

SCHMALER, M.; JANN, N. J.; FERRACIN, F.; LANDMANN, R. T and B cells are not required for clearing *Staphylococcus aureus* in systemic infection despite a strong TLR2-MyD88-dependent T cell activation. *Journal of Immunology*, v. 186, n. 1, p. 443-452, 2011.

SCHREINER, J.; KRETSCHMER, D.; KLENK, J.; OTTO, M. BUHRING, H. J.; STEVANOVIC, S.; WANG, J. M.; BEER-HAMMER, S.; PESCHEL, A.; AUTENRIETH, S. E. *Staphylococcus aureus* phenol-soluble modulins peptides modulate dendritic cell functions and increase in vitro priming of regulatory T cells. *Journal of Immunology*, v. 190, p. 3417-3426, 2013.

SHARMA, D. e KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *Journal of Cell Biology*, v. 213, p. 617-629, 2016.

SHI, O.; MORRIS, S. M.; ZOGHBI, H.; PORTER, C. W.; O'BRIEN, W. E. Generation of a mouse model for arginase II deficiency by targeted disruption of the arginase II gene. *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, p. 811-813, 2001.

SIMOJOKI, H.; SALOMAKI, T.; TAPONEN, S.; IIVANAINEN, A.; PYORALA, S. Innate immune response in experimentally induced bovine intramammary infection with *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis*. *Veterinary Research*, v. 42, p. 49, 2011.

SINGHAL, S.; STADANLICK, J.; ANNUNZIATA, M. J. Human tumor-associated monocytes/macrophages and their regulation of T cell responses in early-stage lung cancer. *Science Translational Medicine*, v. 11, n. 479, 2019.

SIRONI, M.; MARTINEZ, F. O.; D'AMBROSIO, D.; GATTORNO, M.; POLENTARUTTI, N.; LOCATI, M.; GREGORIO, A.; IELLEM, A.; CASSATELLA, M. A.; VAN DAMME, J.; SOZZANI, S.; MARTINI, A.; SINIGAGLIA, F.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A. Differential regulation of chemokine production by Fcγ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *Journal of Leukocyte Biology*, v. 80, p. 342-349, 2006.

SKABYTSKA, Y.; WOLBING, F.; GUNTHER, C.; KOBERLE, M.; KAESLER, S.; CHEN, K. M.; GUENOVA, E.; DEMIRCIOLU, D.; KEMPF, W. E.; VOLZ, T.; RAMMENSEE, H. G.; SCHALLER, M.; ROCKEN, M.; GOTZ, F.; BIEDERMANN, T. Cutaneous innate immune sensing of Toll-like receptor 2-6 ligands suppresses T cell immunity by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Immunity*, v. 41, n. 5, p. 762-775, 2014.

SMITH, E. J.; VISAL, L.; KERRIGAN, S. W.; SPEZIALE, P.; FOSTER, T. J. The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 9, p. 3801-3809, 2011.

SOKOLOVSKA, A.; BECKER, C. E.; RATHINAM, V. A.; BRUDNER, M.; PAQUETTE, N.; TANNE, A.; VANEJA, S. K.; MOORE, K. J.; FITZGERALD, K. A.; LACY-HULBERT, A.; STUART, L. M. Activation of caspase-1 by the NLRP3 inflammasome regulates the NADPH oxidase NOX2 to control phagosome function. *Nature Immunology*, v. 14, n. 6, p. 543-553, 2013.

SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary Microbiology*, v.96, p. 91-102, 2003.

SOONG, G.; PAULINO, F.; WATCHTEL, S.; PARKER, D.; WICKERSHAM, M.; ZHANG, D.; BROWN, A.; LAUREN, C.; DOWD, M.; WEST, E.; HORST, B.; PLANET, P.; PRINCE, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* adaptation to human keratinocytes. *MBio*, v. 6, n. 2, 2015.

SOUZA, F. N.; SANTOS, K. R.; FERRONATTO, J. A.; LIBERA, A. M. M. P. D.; HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Patógenos envolvidos na etiologia da mastite: o que há de novo e o que precisamos fazer? *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Qualidade de Leite*, p. 31-40, 2019.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v. 21, p. 685-711, 2003.

SUBRAMANIAM, R.; BARNES, P. F.; FLETCHER, K.; BOGGARAM, V.; HILLBERRY, Z.; NEUENSCHWANDER, P.; SHAMS, H. Protecting against post-influenza bacterial pneumonia by increasing phagocyte recruitment and ROS production. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 209, n. 11, p. 1827-1836, 2014.

SUN, C.; MEZZADRA, R.; SCHUMACHER, T. N. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity*, v. 48, n. 3, p. 434-452, 2018.

SUREWAARD, B. G. I.; DENISET, J. F.; ZEMP, F. J.; AMREIN, M.; OTTO, M.; CONLY, J. Identification and treatment of the *Staphylococcus aureus* reservoir in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, v. 213, p. 1141-1151, 2016.

SWAMINATHAN, S.; HU, X.; ZHENG, X.; KRIGA, Y.; SHETTY, J.; ZHAO, Y.; STEPHANS, R.; TRAN, B.; BASELER, M. W.; YANG, J.; LEMPICKI, R. A.; HUANG, D.; LANE, H. C.; IMAMICHI, T. Interleukin-27 treated human macrophages induce the expression of novel microRNAs which may mediate antiviral properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 434, p. 228-234, 2013.

TANNAHILL, G. M.; CURTIS, A. M.; ADAMIK, J.; PALSSON- MCDERMOTT, E. M.; MCGETTRICK, A. F.; GOEL, G. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*, v. 496, p. 238-242, 2013.

TAPIERO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Arginine. *Biomed Pharmacother*, v. 56, p. 439-445, 2012.

TAVAKOLI, S.; SHORT, J. D.; DOWNS, K.; NGUYEN, H. N.; LAI, Y.; ZHANG, W. Differential regulation of macrophage glucose metabolism by macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: implications for 18F FDG PET imaging of vessel wall inflammation. *Radiology*, v. 238, n. 1, p. 87-97, 2017.

TAYLOR, P. M. Amino acid transporters: eminences grises of nutrient signaling mechanisms? *Biochemical Society Transactions*, v. 37, p. 237-241, 2009.

TEBARTZ, C.; HORST, S. A.; SPARWASSER, T.; HUEHN, J.; BEINEKE, A.; PETERS, G.; MEDINA, E. A major role for myeloid-derived suppressor cells and a minor role for regulatory T cells in immunosuppression during *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Immunology*, v. 194, p. 1100-1111, 2015.

TERRAZAS, L. I.; MONTERO, C. A.; TERRAZAS, J. L.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Role of the programmed death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 13, p. 1349-1358, 2005.

THURLOW, L. R.; JOSHI, G. S.; CLARK, J. R.; SPONTAK, J. S.; NEELY, C. J.; MAILE, R.; RICHARDSON, A. R. Functional modularity of the arginine catabolic mobile element

contributes to the success of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cell Host & Microbe*, v. 13, p. 100-107, 2013.

TONG, S. Y.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, p. 603-661, 2015.

TUSCHCHERR, L.; MEDINA, E.; HUSSAIN, M.; VOLKER, W.; HEITMANN, V.; NIEMANN, S.; HOLZINGER, D.; ROTH, I.; PROCTOR, R. A.; BECKER, K.; PETERS, G.; LOFFLER, B. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Molecular Medicine*, v. 3, n. 3, p. 129-141, 2011.

VAN DYKEN, S. J.; LOCKSLEY, R. M. Interleukin-4- and interleukin-13- mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annual Review of Immunology*, v. 31, p. 317-343, 2013.

VATS, D.; MUKUNDAN, L.; ODEGAARD, J. I.; ZHANG, L.; SMITH, K. L.; MOREL, C. R. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metabolism*, v. 4, n. 1, p. 13-24, 2006.

VERKAIK, N. J.; DE VOGEL, C. P.; BOELENS, H. A.; GRUMANN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; VINK, H.; HOOIJKAAS, T. J.; FOSTER, H. A. Anti-staphylococcal humoral immune response in persistent nasal carriers and noncarriers of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious disease*, v. 199, p. 625-632, 2009.

VIOLA, A.; MURANI, F.; SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, R.; SCOLARO, T.; CASTEGNA, A. The metabolic signature of macrophage responses. *Frontiers in Immunology*, 2019.

VON DEN BOSSCHE, J.; BAARDMAN, J.; WINTHER, M. P. Metabolic characterization of polarized M1 and M2 bone marrow-derived macrophages using real-time extracellular flux analysis. *Journal of Visualized Experiments*, v. 105, 2015.

VON DEN BOSSCHE, J.; O'NEILL, L. A.; MENON, D. Macrophage Immunometabolism: Where are we going? *Trends in Immunology*, v. 38, n. 6, 2017.

VOYICH, J. M.; BRAUGHTON, K. R.; STURDEVANT, D. E.; WHITNEY, A. R.; SAID-SALIM, B.; PORCELLA, S. F.; LONG, R. D.; DORWARD, D. W.; GARDNER, B. N.; MUSSER, J. M.; DELEO, F. R. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to

avoid destruction by human neutrophils. *Journal of Immunology*, v. 175, n. 6, p. 3907-3919, 2005.

WADDELL, S. J.; POPPER, S. J.; RUBINS, K. H.; GRIFFITHS, M. J.; BROWN, P. O.; LEVIN, M.; RELMAN, D. A. Dissecting interferon-induced transcriptional programs in human peripheral blood cells. *Plos One*, v. 5, 2010.

WANKE, I.; STEFFEN, H.; CHRIST, C.; KRISMER, B.; GOTZ, F.; PESHEL, A.; SCHALLER, M.; SCHITTEK, B. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 131, n. 2, p. 382-390, 2011.

WERNER, A.; PIEH, D.; ECHCHANNAOUI, H.; RUPP, J.; THEOBALD, M.; CLOSS, E. I.; MUNDER, M. Cationic amino acid transporter-1-mediated arginine uptake is essential for chronic lymphocytic leukemia cell proliferation and viability. *Frontiers in Oncology*, v. 9, 2019.

WERTHAIM, H. F.; MELLES, D. C.; VOS, M. C.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; NOUWEN, J. L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 5, n. 12, p. 751-762, 2005.

WEST, A. P.; BRODSKY, I. E.; RAHNER, C.; WOO, D. K.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, v. 472, p. 476-480, 2011.

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, p. 486-499, 2015.

WINDMUELER, H. G.; SPAETH, A. E. Source and fate of circulating citrulline. *American Journal of Physiology*, v. 241, p. 473-480, 1981.

WOLF, A. J.; ARRUDA, A.; REYES, C. N.; KAPLAN, A. T.; SHIMADA, T.; ARDITI, M.; LIU, G.; UNDERHILL, D. M. Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria, *Journal of Immunology*, v. 187, n. 11, p. 6002-6010, 2011.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, v.336, p. 1-17, 1998.

YERAMIAN, A.; MARTIN, L.; SERRAT, N.; ARPA, L.; BERTRAN, J.; MCLEOD, C.; PALACÍN, M.; MODOLELL, MANUEL, LIOBERAS, J.; CELADA, A. Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *Journal of Immunology*, v. 176, p. 5918-5924, 2006.

YIMIN KOHANAWA, M.; ZHAO, S.; OZAKI, M.; HAGA, S.; NAN, G.; KUGE, Y.; TEMAKI, N. Contribution of toll-like receptor 2 to the innate response against *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Plos One*, v. 8, n. 9, 2013.

YOUN, J. I.; GABRILOVICH, D. I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European Journal of Immunology*, v. 40, p. 2969-2975, 2010.

ZIPFEL, P. e SIKERKA, C. *Staphylococcus aureus*: the multi headed hydra resists and controls human complement response in multiple ways. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014.

CAPÍTULO 2

Avaliação imunometabólica de macrófagos desafiados por distintos isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus chromogenes* associados a vacas leiteiras

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que acometem a pecuária leiteira por todo mundo, a mastite é a enfermidade de maior relevância (Rainard *et al.*, 2018). Petrovski, Trajcev e Buneski (2006) relataram que os danos econômicos causados pela mastite estão relacionados a perdas diretas e indiretas. As perdas diretas incluem os custos de tratamento e descarte de leite. Já as perdas indiretas incluem diminuição da produção e qualidade do leite, descarte de animais, aspectos de bem-estar animal, entre outros.

Inúmeros patógenos são responsáveis pela mastite, sendo *Staphylococcus*, o gênero mais frequentemente isolado em amostras de leite assepticamente coletados (Adkins *et al.*, 2022). *Staphylococcus aureus* é o microrganismo mais importante relacionado à mastite devido a sua patogenicidade, mecanismos de evasão e por ser um patógeno multi-hospedeiro, dificultando seu controle e erradicação (Richardson *et al.*, 2018). Devido a isso, é vista notória resistência aos antimicrobianos associados a *S. aureus* (Gomes e Henriques, 2015), sendo comum o isolamento desse patógeno em infecções intramamárias persistente (Souza *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020) e em nichos extramamários (Santos *et al.*, 2020).

Staphylococcus não-aureus (SNA) que era considerado um grupo homogêneo anteriormente – estafilococos coagulase-negativo, tem sido frequentemente isolado em casos de mastite em várias regiões do mundo (Condas *et al.*, 2017; Naqvi *et al.*, 2018; Nyman *et al.*, 2018). *Staphylococcus chromogenes* é o SNA mais frequentemente isolado de amostras de leite bovino assepticamente coletado, podendo levar a infecções persistentes (Supré *et al.*; 2011; Valckenier, *et al.*, 2020; Beuckelaere *et al.*, 2021). Em contrapartida, De Vlieghe *et al.* (2004), Piepers *et al.* (2011) e Toledo-Silva *et al.* (2021) relataram que *S. chromogenes* possuem efeitos protetores à glândula mamária. Esses efeitos são provavelmente devido à capacidade de alguns isolados de SNA produzirem bacteriocinas e regulação do quórum sensing (Nascimento *et al.*, 2005; Carson *et al.*, 2017; Toledo *et al.*, 2021), em que a espécie e o habitat desses são determinantes nesse processo (Toledo-Silva *et al.*, 2022). Por exemplo, De Vlieghe *et al.* (2004) demonstraram que *S. chromogenes* isolado de ápice de teto de novilha exerce proteção *in vitro* contra vários patógenos, como *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, e Toledo-Silva *et al.* (2022) demonstraram essa proteção em infecções causadas por *E. coli*.

Devido a isso, com o aumento dos estudos moleculares, fica claro que para se definir a ação e a patogenicidade dos microrganismos, deve-se considerar o isolado e não a espécie em si (Souza *et al.*, 2019). Por isso, cada vez mais é necessário aprimorar a compreensão dos mecanismos

celulares e moleculares que regulam a defesa inata e adaptativa do hospedeiro contra patógenos específicos (Bagnoli *et al.*, 2018).

Nesse contexto, durante a infecção, os patógenos entram na glândula mamária através do canal do teto (Nidziela *et al.*, 2021). A resposta imune nessas glândulas se inicia por células epiteliais mamárias bovinas, nos alvéolos do úbere e por macrófagos residentes, nos quais ocorre a sinalização por vias imunológicas que estimulam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Lahouassa *et al.*, 2007). Com isso, é visto a importância do macrófago na resposta imune do hospedeiro, através de funções como fagocitose, liberação de citocinas e apresentação de antígenos (Murray e Wynn, 2011).

Então, percebe-se a importância do impacto e do ineditismo de se investigar a respeito da modulação do metabolismo do hospedeiro nas infecções *in vitro* com *Staphylococcus* spp., uma vez que esses microrganismos podem causar grandes prejuízos em propriedades leiteiras e laticínios, além de representar também problema de saúde pública.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a modulação do imunometabolismo por distintos isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus chromogenes* associados a vacas leiteiras numa infecção *in vitro* macrófago-bactéria.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados de *Staphylococcus* spp. e condições de crescimento

Nesse estudo, foram utilizados quatro isolados distintos de *Staphylococcus* spp., compreendendo dois isolados de *Staphylococcus aureus* e dois de *Staphylococcus chromogenes*. Essas amostras fazem parte do acervo do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e já foram previamente isoladas e identificadas por análises moleculares e caracterizados por vários estudos (De Vlieghe *et al.*, 2004; Supré *et al.*, 2011; Breyne *et al.*, 2015; Piccart *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020; Beuckelaere *et al.*, 2021; Toledo-Silva *et al.*, 2021; Toledo-Silva *et al.*, 2022).

A primeira amostra de *S. aureus* é proveniente de um nicho extramamário (*swab* nasal – SN/; spa t098) (Santos *et al.*, 2020), enquanto a outra amostra de *S. aureus* (spa t605) foi originada de uma infecção subclínica intramamária (IM) persistente (Souza *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020). Já a primeira amostra de *S. chromogenes* foi obtida a partir do ápice do teto de uma

novilha (TA) (De Vliegher *et al.*, 2004; Breyne *et al.*, 2015; Piccart *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Toledo-Silva *et al.*, 2021; Toledo-Silva *et al.*, 2022), e que demonstrou proteção *in vitro* contra vários patógenos, como *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* (De Vliegher *et al.*, 2004) e *E. coli* (Toledo-Silva *et al.*, 2022). A outra amostra de *S. chromogenes* é originária de uma infecção IM persistente (Supré *et al.*, 2011).

Os isolados estavam armazenados a -80 °C e foram descongelados a temperatura ambiente. Primeiro, as amostras foram cultivadas em placas de ágar sangue contendo 5 % de sangue de carneiro. Em seguida, colônias frescas de cada bactéria foram cultivadas de 12 a 16 horas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 37 °C. Posteriormente, todas as amostras foram diluídas 1:1000, e em seguida, incubadas em caldo BHI até atingirem sua respectiva fase de crescimento exponencial tardio. Após o crescimento bacteriano, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 2.500 g por 15 minutos e lavado duas vezes com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco 1X (DPBS) (cat. No. 14190185, Gibco, Paisley, Reino Unido). Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em meio de cultivo celular *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI-1640) (cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Usando diluição decimal seriada, 10 µL de cada amostra de isolado de estafilococos foram cultivados em ágar BHI até que as bactérias vivas fossem contadas de forma confiável para determinar as unidades formadoras de colônia. O inóculo foi ajustado para 5×10^5 unidades formadoras de colônias mL⁻¹ (ufc mL⁻¹) (CLSI, 2021) e armazenado a -80 °C até processamento posterior.

2.2 Cultivo de células RAW da linhagem 264.7

Células RAW da linhagem 264.7 (linha celular de macrófagos de camundongos BALB/c, ATCC) foram cultivadas e replicadas a cada quatro dias em meio RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (SFB, cat. n. F9665 Sigma Aldrich; Sigma) e com 1% de solução antibiótico-antimicótico (penicilina/ estreptomicina) (cat. n. 15240-062, Life Technologies, Pasley, United Kingdom). Essas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂ modelo CB150 (Binder, Tittlingen, Alemanha). A viabilidade celular foi avaliada por teste de exclusão com o corante azul Tripán (cat. n. T8154-100ML, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 0,02%. Amostras com viabilidade superior a 95% foram colocadas em cultura. A concentração de células foi ajustada para 5×10^5 células/mL. Foi utilizada a linhagem macrófagica, ao invés de macrófagos

derivados de monócitos do sangue periférico, para evitar a variação da resposta celular que ocorreria se obtidos de indivíduos diferentes (Souza Leão *et al.*, 1995).

2.3 Desafio bacteriano com amostras de *Staphylococcus* spp.

As células Raw 264.7 foram distribuídas em placas de vinte quatro poços, e incubadas em estufa umidificada com 5 % de CO₂ a 37 °C, por um período de 1 hora, para que as mesmas pudessem aderir à placa. Após a aderência das células nas placas, o meio foi retirado e as células foram lavadas com meio de cultivo celular RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) para retirada dos resquícios da solução antibiótico-antimicótico, a fim de evitar a morte bacteriana. Para os experimentos de infecção, foi utilizado a proporção de *Staphylococcus* sp./macrófago com multiplicidade de infecção (MOI) de 1 (*S. aureus* t098 e t605 e *S. chromogenes* TA e IM) e dois tempos de incubação (90 min e 180 min). Sucintamente, 5 x 10⁵ células em RPMI sem antibiótico com 5% de SFB em 500 µL foram distribuídas em placas de cultura com poços, em triplicatas. Em cada placa tinha a triplicata de macrófagos sem a infecção (controle) e com os estafilococos. Após a incubação, as células não aderentes foram removidas por aspiração do sobrenadante e lavadas com PBS. O meio de cultivo celular RPMI foi repostado e as células deixadas em repouso por 1 hora a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as infecções com cada uma das quatro amostras de estafilococos foram realizadas e incubadas em incubadora úmida a 37°C, com 5% CO₂. Após os diferentes tempos de incubação, o sobrenadante também foi coletado e armazenado a -80°C.

2.4 Quantificação de mRNA de *IDO1*, *IL-1β*, *IL-18*, *NLRP3*, *Nos2*, *Arg1*, *Cat-2B*, *Bax* e *Bcl2*

2.4.1 Purificação de RNA

O RNA total foi extraído de 5 x 10⁵ células/mL, e ressuspenso em 1 mL de Trizol (cat. A33248, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e adicionado de 200 µL de clorofórmio. A centrifugação foi realizada a 13000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa separada foi adicionada de isopropanol (v/v) e a mistura foi mantida por 30 minutos a temperatura ambiente. Novamente, foi realizada a centrifugação, onde foi obtido um *pellet* celular, ao qual foi adicionado 1 mL de etanol 75%. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi deixado à temperatura ambiente por 10 minutos (até o etanol evaporar) e suspenso em água livre de RNase. O RNA obtido foi quantificado e analisado por

espectrofotometria a 260/280 nm no equipamento *nanodrop spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA).

2.4.2 Obtenção do cDNA

Para a síntese de cDNA foi usado 1 µg da amostra de RNA total a 6 µL do reagente *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, EUA) e o cDNA foi sintetizado segundo as recomendações do fabricante.

2.4.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Foram utilizados os seguintes iniciadores (*primers*) de amplificação:

Quadro 1 - Sequência de iniciadores (*primers*) de amplificação, utilizados na qPCR

<i>IDO1</i>	Forward: 5' CTA TTG GTG GAA ATC GCA GCT TCT 3' Reward: 5' TCC ACA AAG TCA CGC ATC CTC TTA 3'
<i>Arg1</i>	Forward: 5' AGC ACT GAG GAA AGC TGG TC 3' Reward: 5' CAG ACC GTG GGT TCT TCA CA 3'
<i>iNOS</i>	Forward: 5' AGA GCC ACA GTC CTC TTT GC 3' Reward: 5' GCT CCT CTT CCA AGG TGC TT 3'
<i>Cat-2B</i>	Forward: 5' TAT GTT GTC TCG GCA GGC TC 3' Reward: 5' GAA AAG CAA CCC ATC CTC CG 3'
<i>IL-18</i>	Forward: 5' CCT GAA GAA AAT GGA GAC CTG GAA 3' Reward: 5' ACA CAG GCT GTC TTT TGT CAA CGA 3'
<i>IL-1β</i>	Forward: 5' TCA TCT TTG AAG AAG AGC CCA TCC 3' Reward: 5' CGG AGC CTG TAG TGC AGT TGT CTA 3'
<i>NLRP3</i>	Forward: 5' TAG ACA ACT GCA GCC TCA CCT CAC 3' Reward: 5' ATT TCA CCC AAC TGT AGG CTC TGC 3'
<i>Bax</i>	Forward: 5' AAC TGG ACA GTA ACA TAG AG 3'

Reward: 5' TTG CTG GCA AAG TAG AAA AG 3'

Bcl2 Forward: 5' GAT TGT GGC CTT CTT TGA G 3'

Reward: 5' GTT CCA CAA AGG CAT CC 3'

β-actin Forward: 5' GCC TTC CTT CTT GGG TAT GGA ATC 3'

Reward: 5' ACG GAT GTC AAC GTC ACA CTT CAT 3'

Foram misturados 1 μL de cDNA com 12.5 μL do reagente *SYBR[®]Green (2X)* (*Applied Biosystems*, EUA), 1 μL de cada *primer* a 5.0 pMol/μL e 9.5 μL de água MilliQ autoclavada segundo as instruções do fabricante. A quantificação relativa da expressão do RNA mensageiro foi mensurada utilizando a comparação do Threshold cycle (C_T) do gene alvo (*IDO1*, *IL-18*, *IL-1β*, *NLRP3*, *iNOS*, *Arg1*, *Cat-2B*, *Bax* e *Bcl2*) com o gene constitutivo *β-actina*. Para a análise da expressão, normalizamos os resultados, ou seja, descontamos o C_T obtido do gene constitutivo do C_T do gene alvo de cada amostra (ΔC_T). Em seguida, para as comparações dos resultados entre os diferentes grupos, calculamos em relação ao valor de ΔC_T somente da célula, isto é, sem infecção e sem estímulo ($\Delta\Delta C_T$) e o valor final foi obtido da equação: $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Pfaffl, 2001).

2.5 Dosagem de óxido nítrico

Com o objetivo de determinar a dosagem de NO em sobrenadantes de culturas celulares, foi utilizada a Reação de *Griess* (Green *et al.*, 1982). Nessa análise se quantifica a geração de nitrito (NO_2^-) - produto de degradação de NO - liberado pelas células. Após os tempos de tratamento (90 min e 180 min) com a infecção de *Staphylococcus* spp. o sobrenadante de cada poço foi coletado para a realização da Reação de *Griess*. Para a quantificação de NO, foram adicionados 50 μL de sobrenadante das culturas e 50 μL do reagente de *Griess* (solução A: sulfanilamida 1% em água bidestilada e solução B: 0,1% de dicloridrato de N-(1-naftil) -etilenodiamina e ácido fosfórico a 2,5% em água bidestilada) (v/v), em cada poço de placa de 96 poços, incubando-se a reação por 10 min a temperatura ambiente e no escuro. A determinação da concentração de nitrito foi feita com base em curva padrão determinada a partir de concentrações conhecidas de NaNO_2 . A leitura das análises foi realizada em espectrofotômetro de placa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com filtro de 540 nm.

2.6 Análise estatística

Antes de iniciar as análises foram verificados a normalidade e homocedasticidade das variáveis, utilizando os testes Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Observou-se que as variáveis relacionadas a qPCR e produção de óxido nítrico possuíam distribuição não paramétrica e não foi possível normalizá-las por transformação devido aos altos valores de coeficiente de variação. Desta forma, as variáveis foram comparadas pelo teste estatístico de Kruskal Wallis para os resultados de qPCR e para os resultados de óxido nítrico foi utilizado o teste de Friedman, todos a um nível de significância (α) de 0,05 (Sampaio, 2010). As comparações foram feitas em dois níveis, sendo o nível 1, efeito tempo e efeito bactéria isoladamente, e o nível 2, interação do efeito bactéria e tempo. O programa estatístico usado foi o *InfoStat* (Córdoba, Argentina).

3. RESULTADOS

3.2 Expressão relativa dos genes *iNOS*, *arginase* e produção de NO

No presente estudo, a expressão relativa do gene *iNOS* não diferiu entre os isolados de estafilococos ($P = 0,08$). No entanto, maior expressão relativa do gene *iNOS* foi encontrada após 180 min de infecção ($P < 0,0001$; Figura 1A). Apesar do comportamento semelhante entre os distintos isolados de estafilococos logo no início da infecção (90 min), após 180 min ficou evidente a maior expressão relativa do gene *iNOS* na infecção experimental por estafilococos isolados de infecções intramamárias persistentes ($P < 0,0001$; Figura 1B).

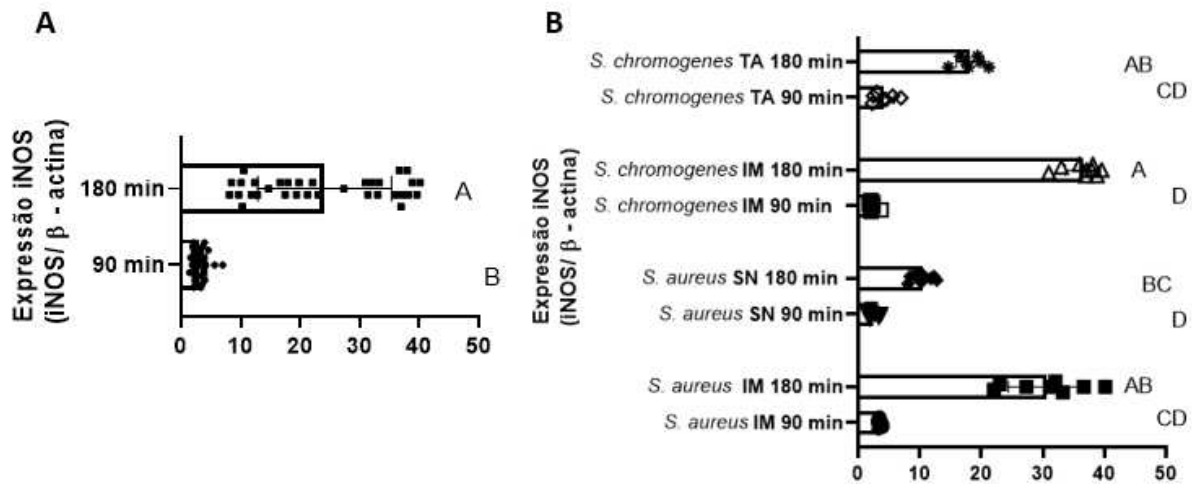


Figura 1: Expressão relativa do gene *iNOS* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito do tempo de infecção na expressão relativa do gene *iNOS*. B - Comparação entre tempo e bactéria na expressão relativa do gene *iNOS*. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

O tempo não impactou na expressão relativa do gene *Arg1* (*arginase*) ($P = 0,99$). *Staphylococcus aureus* SN foi o isolado que levou à maior expressão relativa do gene *arginase* ($P = 0,0006$; Figura 2A). *Staphylococcus aureus* SN 180 min foi o único isolado que induziu maior expressão de *arginase* nos macrófagos infectados comparados com o controle ($P < 0,0001$; Figura 2B). Mesmo que as infecções com os isolados *S. aureus* SN 180 min, *S. aureus* IM 180 min e *S. chromogenes* 90 min sejam estatisticamente iguais, existe grande diferença biológica entre eles, uma vez que apenas os macrófagos infectados com *S. aureus* SN 180 expressaram mais *arginase* que o controle.

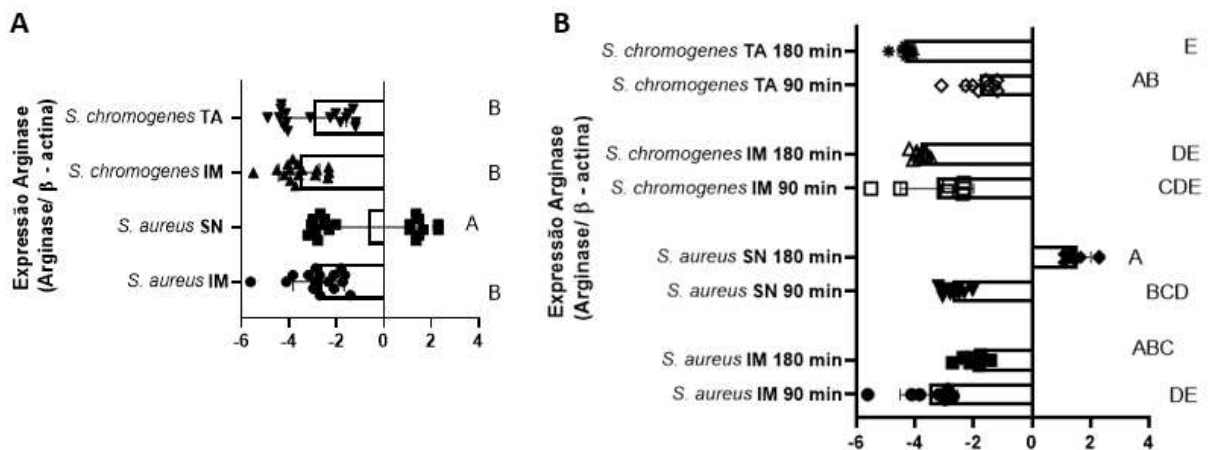


Figura 2: Expressão relativa do gene *arginase* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90

min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa de arginase. B - Comparação entre tempo e bactéria na expressão relativa de arginase. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto.

A produção de NO por macrófagos foi menor no controle (basal) e maior em *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$; Figura 3A). Além disto, a produção de NO por macrófagos foi maior aos 180 min de infecção do que 90 min ($P < 0,0001$; Figura 3B). Logo no início da infecção, *S. chromogenes* TA levou a robusta e expressiva produção de NO ($P < 0,0001$, Figura 3C). Diferentemente dos demais isolados, com *S. chromogenes* TA, a produção de NO pelos macrófagos foi menor após 180 min de infecção que em 90 min ($P < 0,0001$, Figura 3C). Aos 180 min, a produção de NO por macrófagos na infecção por *S. aureus* IM foi menor que *S. aureus* SN e *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$; Figura 3C).

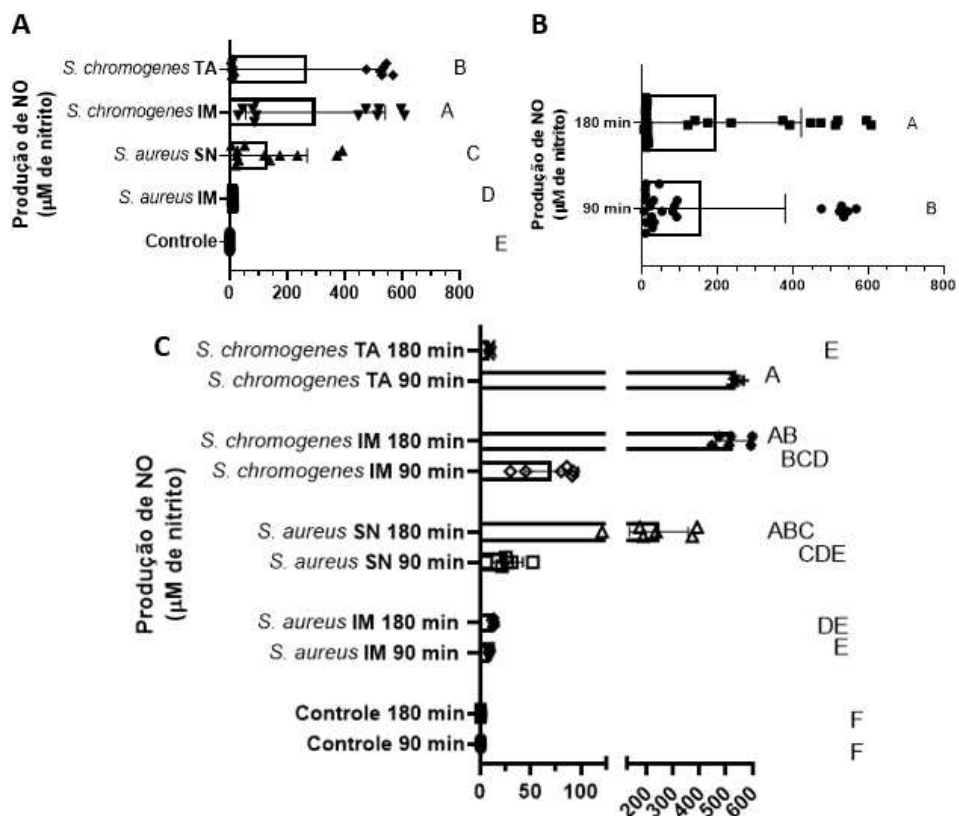


Figura 3: Produção de óxido nítrico (NO) em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A – Efeito do tempo na produção de óxido nítrico. B – Efeito da bactéria na produção de NO. C – Efeito da interação entre bactéria e tempo na produção de NO. $P < 0,05$ e teste de Friedman. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto.

3.3 Expressão relativa dos genes *NLRP3*, *IL-1 β* e *IL-18*

S. aureus SN foi o que levou à maior expressão relativa do gene *NLRP3* por macrófagos dentre os estafilococos estudados ($P < 0,0001$; Figura 4A), e curiosamente, a expressão relativa do gene *NLRP3* foi maior logo no início da infecção ($P = 0,00014$; Figura 4B). Com 90 min de infecção, dentre os isolados de estafilococos estudados, *S. aureus* SN levou à maior expressão relativa do gene *NLRP3* em macrófagos, enquanto *S. chromogenes* TA teve a menor expressão ($P < 0,0001$; Figura 4C). Após 180 min da infecção, *S. aureus* SN levou à maior expressão relativa do gene *NLRP3* em macrófagos ($P < 0,0001$; Figura 4C), enquanto a expressão relativa do gene *NLRP3* foi menor quando desafiado com *S. aureus* IM ($P < 0,0001$; Figura 4C), apesar desta última não diferir estatisticamente de *S. chromogenes* TA. *Staphylococcus aureus* IM foi o único isolado de estafilococos que levou à menor expressão relativa do gene *NLRP3* por macrófagos após 180 min de infecção quando comparado com 90 min ($P < 0,0001$; Figura 4C).

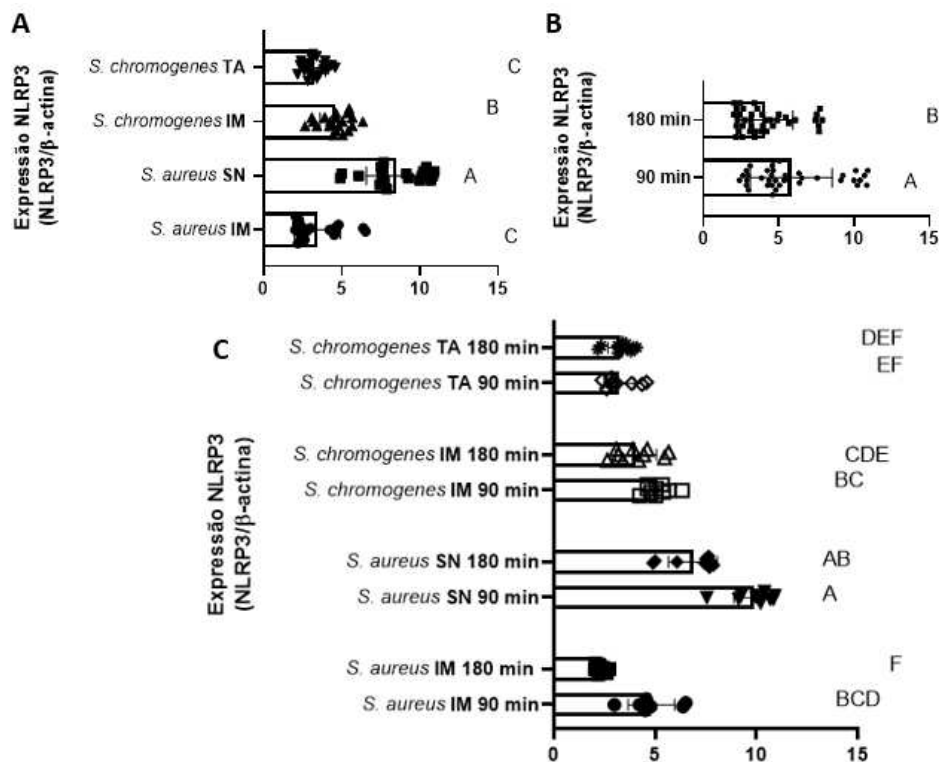


Figura 4: Expressão relativa do gene *NLRP3* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A – Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *NLRP3*. B – Efeito do tempo na expressão relativa do gene *NLRP3*. C – Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *NLRP3*. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

A expressão relativa do gene *IL-1 β* por macrófagos foi menor na infecção experimental por *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$; Figura 5A). Além disto, a expressão relativa do gene *IL-1 β* por macrófagos foi maior aos 180 min de infecção do que em 90 min ($P < 0,0001$; Figura 5B). Aos 90 min de infecção, *S. chromogenes* IM levou à menor expressão relativa do gene *IL-1 β* por macrófagos que *S. chromogenes* TA ($P < 0,0001$; Figura 5C) e *S. aureus* SN ($P < 0,0001$; Figura 5C), porém semelhante a *S. aureus* IM. Aos 180 min de infecção, *S. chromogenes* IM levou à menor expressão relativa de *IL-1 β* por macrófagos que *S. chromogenes* TA ($P < 0,0001$; Figura 5C) e *S. aureus* IMI ($P < 0,0001$; Figura 5C); no entanto, semelhante a *S. aureus* SN. Além disto, a expressão relativa do gene *IL-1 β* por macrófagos foi maior aos 180 min por todos os estafilococos ($P < 0,0001$; Figura 5C), com exceção de *S. aureus* SN.

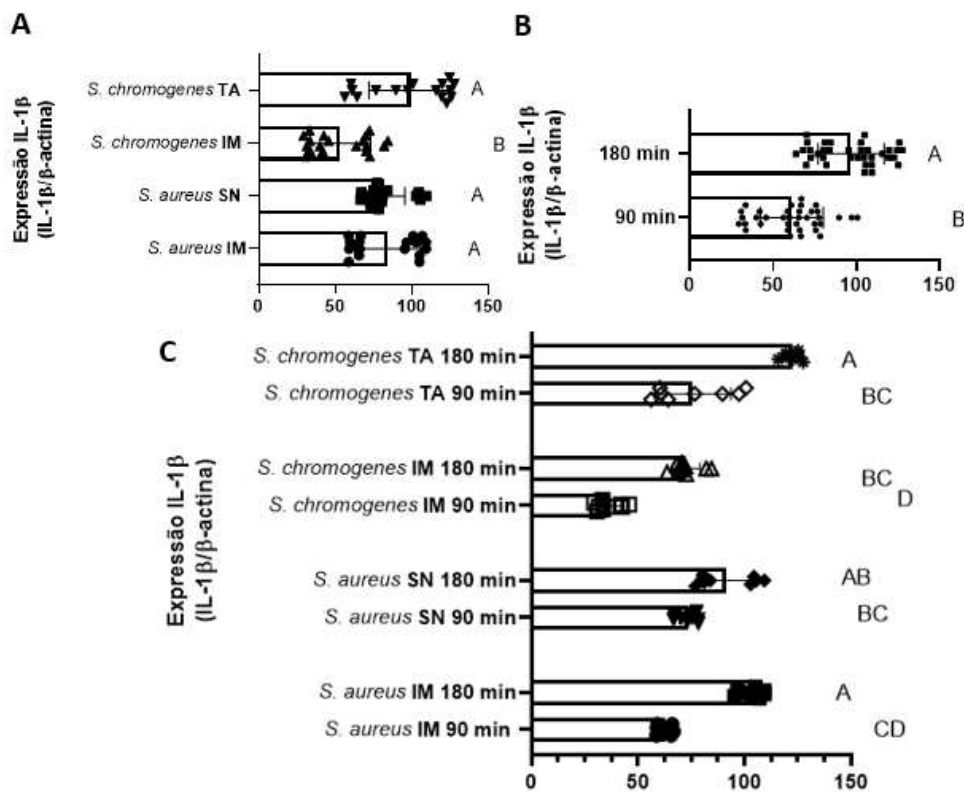


Figura 5: Expressão relativa do gene *IL-1 β* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *IL-1 β* . B - Efeito do tempo na expressão relativa do gene *IL-1 β* . C - Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *IL-1 β* . $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

Em relação à expressão de *IL-18* por macrófagos não houve efeito do tempo ($P = 0,10$). Como todos os valores médios dos isolados da expressão de *IL-18* pelos macrófagos variaram apenas

± 1 vez em relação ao controle, esses resultados são considerados não significativos biologicamente, apesar de algumas diferenças estatísticas serem observadas (Figura 6A e 6B).

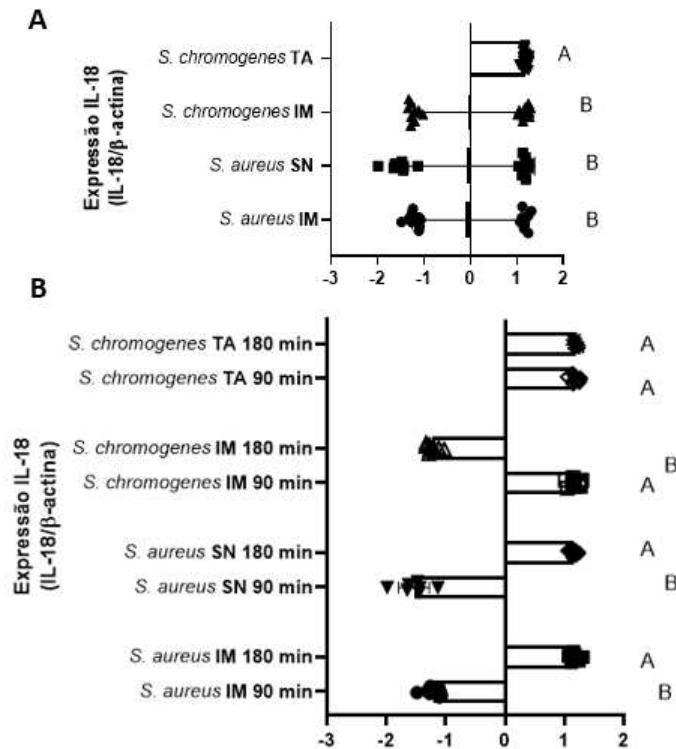


Figura 6: Expressão relativa do gene *IL-18* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *IL-18*. B - Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *IL-18*. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

3.4 Expressão relativa dos genes *Bax* e *Bcl2*

A expressão relativa do gene *Bax* só foi expressiva em *S. chromogenes* IM e TA, uma vez que os macrófagos sem infecção expressaram mais o gene *Bax* que os infectados ($P < 0,0001$; Figura 7A). Além disto, a expressão relativa de *Bax* por macrófagos foi maior após 180 min do desafio experimental que 90 min ($P < 0,0001$; Figura 7B). Na infecção de *S. chromogenes* IM 90 min foi o resultado em que os macrófagos sem infecção expressaram mais o gene *Bax* do que os macrófagos infectados ($P < 0,0001$; Figura 7C).

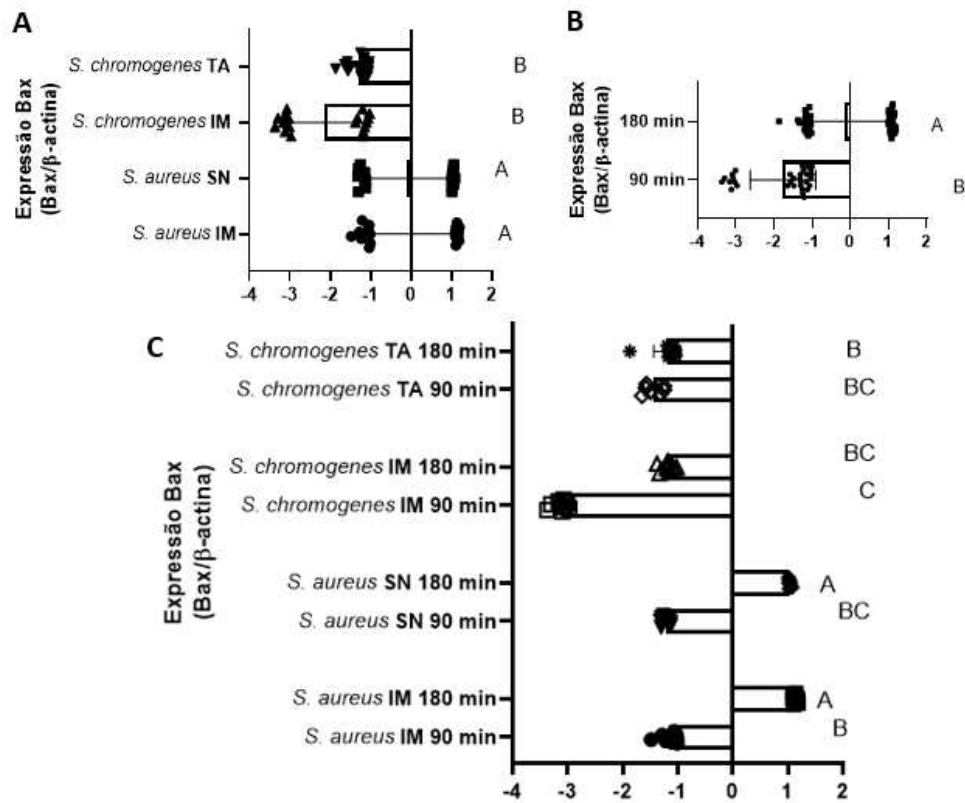


Figura 7: Expressão relativa do gene *Bax* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *Bax*. B - Efeito do tempo na expressão relativa do gene *Bax*. C - Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *Bax*. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

A expressão relativa do gene *Bcl2* foi maior em macrófagos quando desafiados por *S. aureus* SN ($P = 0,03$; Figura 8A). Além disto, a expressão do gene *Bcl2* por macrófagos foi maior após 180 min do desafio experimental do que em 90 min ($P < 0,0001$; Figura 8B). Logo no início da infecção, os macrófagos sem infecção expressaram mais o gene *Bcl2* do que os macrófagos infectados com os isolados *S. aureus* IM e *S. chromogenes* TA ($P < 0,0001$; Figura 8C). Aos 180 min da infecção experimental, a expressão do gene *Bcl2* em macrófagos infectados foi maior do que nos macrófagos não infectados, quando desafiados pelos isolados de *S. aureus*.

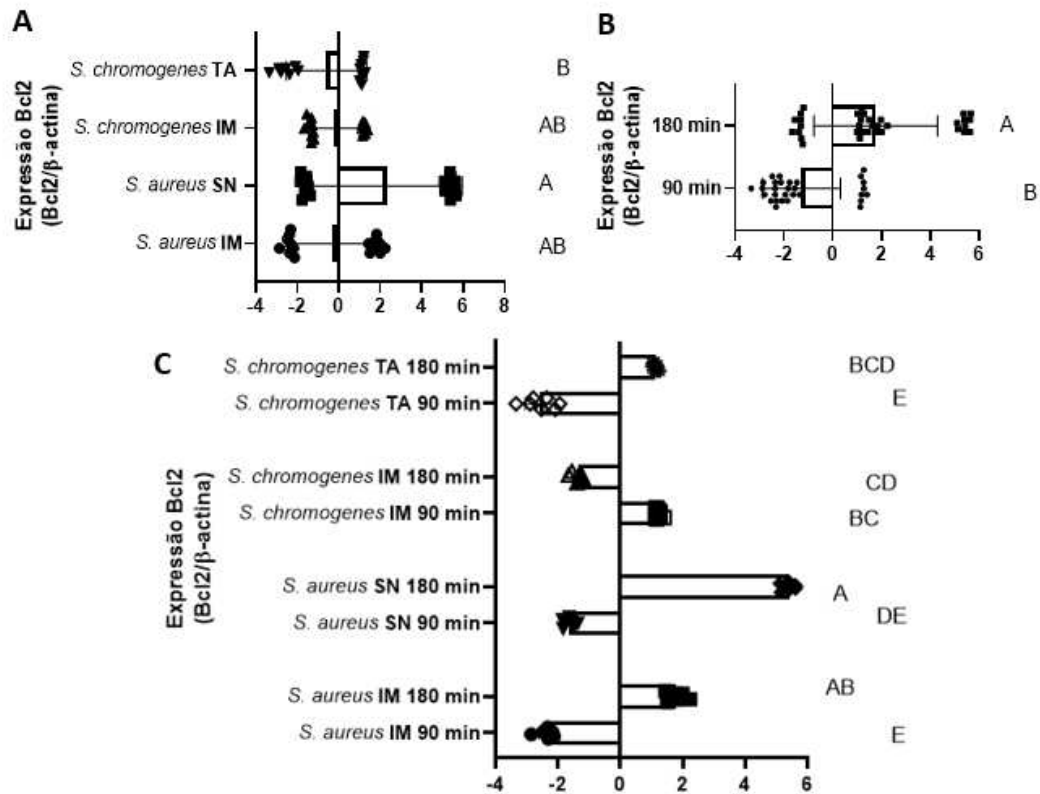


Figura 8: Expressão relativa do gene *Bcl2* em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 90 min e 180 min. A - Efeito da bactéria na expressão relativa do gene *Bcl2*. B - Efeito do tempo na expressão relativa do gene *Bcl2*. C - Efeito da interação entre bactéria e tempo na expressão relativa do gene *Bcl2*. $P < 0,05$ e teste de Kruskal Wallis. Medianas com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto.

3.5 Expressão relativa dos genes *IDO* e *Cat-2B*

As análises da expressão dos genes *IDO* e *Cat-2 β* foram realizadas, mas os resultados não puderam ser aproveitados devido à baixa qualidade das curvas de dissociação geradas ao longo da amplificação do qPCR. Com isso, não foi possível verificar a especificidade das amostras analisadas, que é sempre validada com evidência experimental direta. Também se verificou a presença de valores de Cts altos, podendo levar a resultados falso-positivos.

4. DISCUSSÃO

É inegável que a principal resposta protetora da glândula mamária à presença de estafilococos é a fagocitose por neutrófilos (Burton e Erskine, 2003). Mas, nesse estudo foram utilizados

macrófagos murinos ao invés de neutrófilos, pois esses fazem parte da primeira linha de defesa da imunidade inata no úbere (Mosser e Edwards, 2010).

No presente estudo, pode-se perceber que após as infecções com os isolados de estafilococos, os macrófagos foram polarizados como M1 devido à alta expressão de *iNOS*, principalmente nos isolados de infecção intramamária persistente. E, apenas os macrófagos infectados com *S. aureus* SN aos 180 min, uma bactéria comensal, expressaram mais *arginase* do que os macrófagos sem desafio com estafilococos. A diferença de expressão gênica entre dois isolados distintos de *S. aureus* remete ao fato que a resposta imune a esse patógeno é genótipo-dependente, como confirmado por outros autores (Murphy *et al.*, 2019; Niedziela *et al.*, 2020).

Além disso, é conhecido que os macrófagos e as células epiteliais são as primeiras células a reconhecerem os patógenos que entram na glândula mamária. Então, ao ocorrer a polarização M1, desencadeia-se a secreção de citocinas pró-inflamatórias e essas levam ao recrutamento de neutrófilos do sangue para o tecido mamário (Wellnitz e Bruckmaier, 2012).

No entanto, vale ressaltar que as características baseadas em M1 e M2 são fundamentadas em estudos *in vitro*, associando os resultados com polarização clássica e alternativa (Orchioni *et al.*, 2019). Ao se considerar a complexidade da glândula mamária, o observado é que os experimentos feitos *in vitro* podem, nem sempre, se relacionar com fenótipos de macrófagos *in vivo*, pois nesse caso, varia-se de acordo com a origem da célula, microambiente, e alterações de acordo com a evolução da infecção (Nahrendorf e Swirsky, 2016).

Desse modo, foi observado que apenas os macrófagos infectados com *S. aureus* SN por 180 min produziram *arginase* e *iNOS* conjuntamente. A *arginase* é um marcador característico de macrófagos estimulados com IL-4 e IL-13, com ação anti-inflamatória, mas que também pode ser encontrado em macrófagos que expressam *iNOS* (Michel, 2013). Com isso, podemos perceber que bactérias comensais, como *S. aureus* SN, tendem a demonstrar mecanismos para manter a tolerância imunológica (Littman e Pamer, 2011).

Dessa forma, também é conhecido que a presença de NOHA (N-hidroxi-L-arginina), um intermediário da ação de *iNOS* para a produção de NO, inibe a atividade da *arginase* em camundongos. Os autores descreveram que devido a isso, a infecção por *Salmonella* sp. reduziu a carga bacteriana no hospedeiro (El Kasmi *et al.*, 2008). Strapkova e Antasova (2011) ao analisarem a competição de *arginases* e NO sintases, relataram a inibição da atividade da *arginase* com NOHA *in vitro*.

Pang *et al.* (2020) ao infectarem *S. aureus* em camundongos observaram que durante a infecção estafilocócica, a expressão da maioria das isoenzimas de *arginase* e NOS do hospedeiro foi induzida simultaneamente em amostras de fígado, rim e sangue desses animais. No entanto, a indução de isoenzimas de *arginase* foi altamente maior do que as isoenzimas de NOS, dificultando, assim, a resolução da infecção pelo hospedeiro.

Ademais, *S. aureus* pode se proteger da ação de agentes antimicrobianos gerados pela fagocitose por meio da expressão de inúmeros fatores de virulência que lhe permitem colonizar tecidos do hospedeiro e escapar do efeito deletério do sistema imunológico (Fraunholz e Sinha, 2012). Lahiri, Das e Chakraborty (2010) relataram que alguns isolados de *S. aureus* além de carregar sua própria arginase, podem também modular a arginase do hospedeiro e dessa forma, aumentar a competitividade por arginina com *iNOS*. Dessa forma, levam à diminuição da apresentação de antígenos, deixando a função das células T prejudicadas. Medina *et al.* (2019) também relataram que *S. aureus* pode alterar o metabolismo da arginina do hospedeiro, limitando então, a produção do óxido nítrico.

Desse modo, a produção de NO de macrófagos infectados com *S. aureus* SN e *S. chromogenes* IM acompanhou a expressão relativa do gene *iNOS*. A principal citocina responsável pela produção dessa enzima em macrófagos é IFN- γ , e essas células ao serem polarizados M1, secretam citocinas pró-inflamatórias, ERO e NO (Bosedasgupta e Pieters, 2014). Em infecções cutâneas por *S. aureus*, a gravidade da infecção reduziu devido a polarização pró-inflamatória dos macrófagos (Chan *et al.*, 2018). Bactérias expostas ao NO encontram uma variedade de estresses bioquímicos e metabólicos, como danos ao DNA e interrupção de enzimas metabólicas, incluindo componentes da cadeia respiratória. Grosser *et al.* (2016) relataram como fatores de transcrição regulam a resistência ao NO por *S. aureus* e sugerem como essa resistência é extremamente multifacetada e integrada em redes complexas de virulência e regulação do metabolismo dessa bactéria.

Além disso, os macrófagos infectados com *S. aureus* IM, mesmo com alta expressão relativa de *iNOS*, apresentaram baixa produção de NO. É conhecido que microRNAs (miRNAs) podem afetar o nível de mRNA de *iNOS* e expressão de proteínas de vários tipos celulares, incluindo macrófagos de camundongos, como miR-125a-5p (Banerjee *et al.*, 2013) e miR-301a (Huang *et al.*, 2013). Em células RAW 264.7, mesmas células usadas nesse trabalho, a alta expressão de miR-124 aumentou a expressão de citocinas anti-inflamatórias e reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo também a apoptose dos macrófagos (Liang *et al.*, 2020). Esses autores relataram que os miRNAs identificados agiram bloqueando a expressão de

sinalização ou os fatores de transcrição que regulam positiva ou negativamente a expressão de *iNOS*. Com isso, é visto que a baixa produção de NO é um possível mecanismo de evasão de *S. aureus* IM, levando esse patógeno a aumentar sua persistência na infecção intramamária.

Já em relação à produção de NO em macrófagos infectados com *S. chromogenes* TA, foi observado que em 90 min de infecção, a produção desse composto era alta e em 180 min muito baixa, demonstrando que houve uma degradação do NO ao longo do tempo. Kim *et al.* (2022) relataram que *Levilactobacillus brevis* KU15151 em células RAW 164.7 demonstraram ação antioxidante, diminuindo a geração de espécies reativas de oxigênio. Os autores sugerem que essa bactéria tem potencial para ser usada como agente profilático em distúrbios inflamatórios. Yang *et al.* (2020) também concluíram que *L. brevis* KU15151 demonstraram maior atividade de eliminação de radicais e atividade inibitória de peroxidação lipídica comparado ao *Pediococcus pentosaceus* SC28.

Em relação à ativação do inflamassoma *NLRP3*, é conhecido que essa é desencadeada por muitos estímulos, como PAMPs, ATP e toxinas (Elliot e Sutterwala, 2015; Lin *et al.*, 2019) que levam à agregação da proteína *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) e à ativação da pró-caspase 1 em macrófagos, seguido de *IL-1 β* e maturação e secreção de *IL-18* (Chiu *et al.*, 2019). Nesse contexto, o receptor de superfície TLR2 é mais reconhecido por ativar essa cadeia metabólica quando se trata do reconhecimento de bactérias Gram-positivo, como estafilococos. Em estudos *in vivo* foi demonstrado que camundongos sem esse receptor funcional (genes *myd88* e *irak4*) são altamente susceptíveis a infecções por *S. aureus*. Na infecção por esse patógeno, esses camundongos apresentam respostas reduzidas às citocinas e maior carga bacteriana nos órgãos afetados (Kielian *et al.*, 2005; Yimin Kohanawa *et al.*, 2013).

Então, os resultados desse trabalho demonstraram que mesmo com a grande ativação de *NLRP3* e *IL-1 β* , o *IL-18* não foi ativado nos macrófagos. Zhu e Kanneganti (2017) e Afonina *et al.* (2017) relataram a importância da sinalização de NF- κ B para a ativação transcricional de respostas a estimulação de TLRs e citocinas. O sinal 1 (*priming*) é desencadeado pela sinalização de PRRs nos receptores, que posteriormente leva a ativação transcricional de *NLRP3*, pró-*IL-1 β* e pró-*IL-18*, vias dependentes de NF- κ B (Swanson, Deng e Ting, 2019; McKee e Coll, 2020). Uma vez que nesse experimento foi observada a presença de mRNA de *NLRP3* e *IL-1 β* , pode-se inferir que a região cromossômica relacionada à *IL-18* não foi estimulada por NF- κ B. Como já é conhecido, *NLRP3*, *IL-1 β* e *IL-18* estão presentes em cromossomos distintos em camundongos, 11, 2 e 9, respectivamente.

A citocina *IL-1 β* foi altamente expressa em todos os tempos de infecção nos macrófagos e com todas as bactérias estudadas nesse trabalho. Uma consequência da ativação do inflamassoma é um tipo de morte celular chamada piroptose (Kovacs e Miao, 2017). Dessa forma, um dos resultados da liberação de *IL-1* é a morte concomitante da célula secretora, uma vez que pode ocorrer a lise da membrana após a ativação de *IL-1 β* (Lopes-Castejan e Brough, 2011; Cullen *et al.*, 2015). É conhecido que citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e *IL-1 β* são expressas durante a resposta imune precoce da glândula mamária (Aitken *et al.*, 2011), podendo justificar os altos valores expressos por macrófagos dessa interleucina no presente estudo.

Em relação à expressão de *Bax*, apenas macrófagos infectados com *S. chromogenes* IM 90 min tiveram um resultado expressivo, no qual, o controle expressou três vezes mais que os macrófagos infectados. Xu *et al.* (2020) relataram que a alta expressão de *Bax* foi devido à ativação de citocinas pró-inflamatórias após infecções com *S. aureus* em células RAW 264.7, resultado esse, contrário ao achado desse trabalho. Esses mesmos autores observaram que a expressão de *Bcl2*, que é anti apoptótico, foi baixa. No presente estudo, no início da infecção, *S. aureus* IM inibiu a expressão de *Bcl2*, mas com 180 min, esse gene expressou mais que o controle. Além disso, *S. chromogenes* IM aos 90 min inibiu a expressão de *Bax*. Com isso, foi possível observar que ao longo do curso do experimento, os patógenos de infecção intramamária inibiram a apoptose de macrófagos. Esse comportamento facilita a persistência desses microrganismos no tecido mamário.

De modo geral, os resultados da expressão de *Bax* desse trabalho foram pouco expressivos e o motivo pode ser que no presente estudo, a infecção só durou até 180 min. De acordo com Medina *et al.* (2019), que investigaram a dinâmica da infecção de *S. aureus* em tecido epitelial durante 72 h por meio de imagens de células vivas, imunofluorescência e microscopia eletrônica, essa bactéria começa a induzir a apoptose de células imunes no hospedeiro 24h após a infecção.

5. CONCLUSÕES

- Os isolados de estafilococos modulam o metabolismo de células RAW 264.7 de formas distintas, demonstrando a importância do isolado em si e não da espécie.
- A expressão relativa do gene *iNOS* foi alta nas células infectadas com todas as bactérias.
- A expressão relativa do gene *arginase* só foi maior que o controle em *S. aureus* SN, bactéria comensal que possivelmente leva à manutenção da tolerância imunológica.

- A produção de NO foi inibida em macrófagos com infecção de *S. aureus* IM, demonstrando possível mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro. Já na infecção com *S. chromogenes* TA, esse composto foi possivelmente degradado ao longo do desafio, sendo observada ação antioxidante desse isolado.
- Em todas as infecções foi observada ativação do inflamassoma, mas em nenhuma houve a expressão de mRNA de *IL-18*, podendo-se inferir que a região cromossômica referente à essa interleucina não foi estimulada.
- Na expressão de *Bax* e *Bcl2* em macrófagos foram observados possíveis mecanismos de evasão das bactérias de infecção intramamária persistente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, P.R.F.; PLACHETA, L. M.; BORCHES, M. R.; BEWLEY, J. M.; MIDDLETON, J. R. Distribution of staphylococcal and mammaliicoccal species from compost-bedded pack or sand-bedded freestall dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 105, n. 7, 2022.

AFONINA, I. S.; ZHONG, Z.; KARIN, M.; BEYAERT, R. Limiting inflammation – the negative regulation of NF-kappaB and the NLRP3 inflammasome. *Nature Immunology*, 2017.

AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 16, p.291-304, 2011.

BANERJEE, S.; CUI, H.; XIE, N.; TAN, Z.; YANG, S.; ICYUZ, M.; THANNIKAL, V. J.; ABRAHAM, E.; LIU, G. miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, 2013.

BAGNOLI, F.; RAPPUOLI, R.; GRANDI, G. *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*, ed. 1, Springer, 2018.

BEUCKELAERE, L.; DE VISSCHER, A.; SOUZA, F. N.; MEYER, E.; HAESBROUCK, F.; PIEPERS, S.; DE VliegHER, S. Colonization and local host response following intramammary *Staphylococcus chromogenes* challenge in dry cows. *Veterinary Research*, v. 52, n. 137, 2021.

BOSEDASGUPTA, S.; PIETERS, J. Inflammatory stimuli reprogram macrophage phagocytosis to macropinocytosis for the rapid elimination of pathogens. *Plos Pathogens*, v. 10, 2014.

BREYNE, K.; DE VILEGHER, S.; DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; MEYER, E. Technical note: A pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 2, 2015.

BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice*, v; 19, p. 1-45, 2003.

CARSON, D. A.; BARKEMA, H.; NAUSHAD, S.; DE BUCK, J. Bacteriocins of Non-aureus Staphylococci isolated from bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, 2017.

CHAN, L. C.; ROSSETTI, M.; MILLER, L. S.; FILLER, S. G.; JOHNSON, C. W.; LEE, H.K. Protective immunity in recurrent Staphylococcus aureus infection reflects localized immune signatures and macrophage-conferred memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018.

CHIU, H. W.; LI, L. H; HSIEH, C. Y.; RAO, Y. K.; CHEN, F. H. Glucosamine Inhibits IL-1b Expression by Preserving Mitochondrial Integrity and Disrupting Assembly of the NLRP3 Inflammasome. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 2019.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, ed. 31, Wayne, PA, 2021.

CONDAS, L.A.Z.; DE BUCK, J.; NOBREGA, D.B.; CARSON, D.A.; ROY, J.P.; KEEFE, G.P.; DEVRIES, T.J.; MIDDLETON, J.R.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H.W. Distribution of non-aureus staphylococci species in udder quarters with low and high somatic cell count, and clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.100, p.5613-5627, 2017.

CULLEN, S. P.; KEARNEY, C. J.; CLANCY, D. M.; MARTIN, S. J. Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1beta Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Reports*, v. 11, n. 10, 2015.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; SANTOS, B. P. AZEVEDO, L. F. F.; SANCHEZ, E. M. R.; DINIZ, S. A.; HADDAD, J. P.; BLAGITZ, M. G. Effects of

bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Veterinary Research*, v. 46, n. 1, 2015.

DE VliegHER, S.; OPSOMER, G.; VANROLLEGHEM, A.; DEVRISE, L.; A.; SAMPIMON, J.; SOL, J.; BARKEMA, H. W.; HAESEBROUCK, F.; KRUIF, A. *In vitro* growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Veterinary Microbiology*, v. 101, n. 3, p. 215–221, 2004.

EL KASMI, K. C.; QUALLS, J. E.; PESCE, J. T.; SMITH, A. M.; THOMPSON, R. W.; HENAO-TAMAYO, M.; BARSABA, R. J.; KONIG, T.; SCHLEICHER, U.; KOO, M.; KAPLAN, G.; FITZGERALD, K. A.; TUOMANEN, E. I.; ORME, I. M.; KANNEGANTI, T.; BOGDAN, C.; WYNN, T. A.; MURRAY, P. J. Toll-like receptor-induced arginase in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nature Immunology*, v. 9, p. 1399-1406, 2008.

ELLIOTT, E. I.; SUTTERWALA, F. S. Initiation and Perpetuation of NLRP3 Inflammasome Activation and Assembly. *Immunological Reviews*, v. 265, n. 1, 2015.

FRAUNHOLZ, M.; SINHA, B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live in and let die. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, 2012.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, 2015.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GROSSER, M. R.; WEISS, A. SHAW, L. N.; RICHARDSON, A. R. Regulatory Requirements for *Staphylococcus aureus* Nitric Oxide Resistance. *Journal of Bacteriology*, 2016.

HOCHGRAFE, F.; WOLF, C.; FUCHS, S.; LIEBEKE, M.; LALK, M.; HECKER, M. Nitric Oxide Stress Induces Different Responses but Mediates Comparable Protein Thiol Protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 190, 2008.

HUANG, L.; LIU, Y.; WANG, L.; CHEN, R.; GE, W.; LIN, Z.; ZHANG, Y.; LIU, S.; SHAN, Y.; LIN, Q.; KIANG, M. Down-regulation of miR-301a suppresses pro-inflammatory cytokines in Toll-like receptor-triggered macrophages. *Immunology*, v. 140, p. 314–322, 2013.

KIELIAN, T.; HANEY, A.; MAYES, P. M.; GARG, S.; ESEN, E. Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 11, p. 7428-7435, 2005.

KIM, Y.; IM, J. Y.; HAN, S. H.; KANG, H. S.; CHOI, I. INF- γ Up-Regulates IL-18 Gene Expression Via IFN Consensus Sequence-Binding Protein and Activator Protein-1 Elements in Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 165, 2022.

KOVACS, S. B.; MIAO, E. A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. *Trends in Cell Biology*, v. 27, n. 9, 2017.

LAHIRI, A.; DAS, P.; CHAKRAVORTTY, D. New tricks new ways: exploitation of a multifunctional enzyme arginase by pathogens. *Virulence*, 2010.

LAHOUASSA, H.; MOUSSAY, E.; RAINARD, P.; RIOLLET, C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*, v. 38, n. 1, p. 12-21, 2007.

LIANG, X.; WANG, L.; WANG, M.; LIU, Z.; ZHANG, B.; LIU, E.; LI, E. MicroRNA-124 inhibits macrophage cell apoptosis via targeting p38/MAPK signaling pathway in atherosclerosis development. *Aging*, v. 12, n. 3, 2020.

LIN, L.; XU, L., HAN, W. H.; XIANG, Y. Z.; FU, L. An NLRP3 Inflammasome- Triggered Cytokine Storm Contributes to Streptococcal Toxic Shock-Like Syndrome (STSLs). *Plos Pathogens*, v. 15, 2019.

LITTMAN, D. R.; PAMER, E. G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host & Microbe*, v. 10, n. 4, p. 311-323, 2011.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 22, n. 4, 2011.

MCKEE, C. M.; COLL, R. C. NLRP3 inflammasome priming: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 108, p. 937-952, 2020.

MEDINA, L. M. P.; BECKER, A.; MICHALIK, S.; YEDAVALLY, H.; RAINERI, E. J. M.; HILDEBRANT, P.; SALAZAR, M. G.; SURMANN, K.; PFORTNER, H.; MEKONN, S. A.; SALVATI, A.; KADERALI, L.; VAN DIJI, J. M.; VOLKER, U. Metabolic crosstalk between

human bronchial epithelial cells and internalized *Staphylococcus aureus* as a driver for infection. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 18, p. 892-908, 2019.

MICHEL, T. R. Is for arginine: metabolism of arginine takes off again, in new directions. *Circulation*, v. 128, p. 1400–1404, 2013.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 6, 2010.

MURPHY, M. P.; NIEDZIELA, F. C.; LEONARD, F. C.; KEANEM O. M. The *in vitro* host cell immune response to bovine-adapted *Staphylococcus aureus* varies according to bacterial lineage. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 2019.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 723-737, 2011.

NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K. Abandoning M1/M2 for a network model of macrophage function. *Circulation Research*, v. 119, n. 414, 2016.

NASCIMENTO, J.; FAGUNDES, P. C.; BRITO, M. A. V. D. P.; DOS SANTOS, K. R. N.; BASTOS, M. D. C. D. F. Production of bacteriocins by coagulase negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 106, p. 61-71, 2005.

NAVQI, S.A.; DE BUCK, J.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H. W. Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. *Journal of Dairy Science*, v.101, p.3233-3247, 2018.

NIEDZIELA, D. A.; CORMICAN, P.; FOUCRAS, G.; LEONARD, F. C.; KEANE, O. M. Bovine milk somatic cell transcriptomic response to *Staphylococcus aureus* is dependent on strain genotype. *BMC Genomics*, v. 22, n. 796, 2021.

NYMAN, A.K.; FASTH, C.; WALLER, K.P. Intramammary infections with different non-*aureus* staphylococci in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.101, p.1403-1418, 2018.

ORECCHONI, M.; GHOSHEH, Y.; PRAMOD, A. B.; LEY, K. Macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) vs. Classically and M2 (LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. 1084, 2019.

PAIK, S.; KIM, J. K.; SILWAL, P.; SASAKAWA, C.; EUN-KYEONG, J. Na update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 18, 2021.

PANG, R.; ZHOU, H.; HUANG, Y.; SU, Y.; CHEN, X. Inhibition of host arginase activity Against staphylococcal bloodstream infection by different metabolites. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 2020.

PETROVSKI, K. R.; TRAJCEV, M.; BUNESKI, G. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 77, p. 52-60, 2006.

PFÄFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, 2001.

PICCART, K.; VERBEKE, J.; DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; HAESEBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Local host response following an intramammary challenge with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers. *Veterinary Research*, v. 47, n. 1, 2016.

PIEPERS, S.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; FRANKENA, K.; DE VliegHER, S. Pathogen group specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 99, n. 2-4, p. 91–101, 2011.

RAINARD, P.; FOUCRAS, G.; FITZGERALD, J. R.; WATTS, J. L.; KOOP, G.; MIDDLETON, J. R. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 65, p. 149–165, 2018.

RICHARDSON, E.; BACIGALUPE, R.; HARRISON, E. M.; WEINERT, L. A.; LYCETT, S.; VRIELING, M.; ROBB, K.; HOSKISSON, P. A.; HOLDEN, T. G. M.; FEIL, E. J.; PATERSON, G. K.; TONG, S. Y. C.; SHITTU, A.; VAN WAMEL, W.; HOLMES, M.; FITZGERALD, J. R. Gene exchange drives the ecological success a multi-host bacterial pathogen. *Nature Ecology & Evolution*, v. 2, n. 9, p. 1468-1478, 2018.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. *Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 3, p. 264, 2010.

SANTOS, R. P.; SOUZA, F. N.; OLIVEIRA, A. C. D.; SOUZA FILHO, A. F. S.; AIZAWA, J.; MORENO, L. Z.; CUNHA, A. F.; CORTEZ, A.; DELLA LIBERA, A. M. M.;

HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. *Animals*, v. 10, n. 11, p. 2143, 2020.

SOUZA, F. N.; PIEPERS, S.; DELLA LIBERA, A. N. M. P.; HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; DE VliegHER, S. Interaction between bovine-associated coagulase-negative staphylococci species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 4, p. 2867-2874, 2016.

SOUZA, F. N.; SANTOS, K. R.; FERRONATTO, J. A.; LIBERA, A. M. M. P. D.; HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Patógenos envolvidos na etiologia da mastite: o que há de novo e o que precisamos fazer? *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Qualidade de Leite*, p. 31-40, 2019.

SOUZA LEÃO, S.; LANG, T.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTONIE, J. C. Intracellular *Leishmania amazonenses* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of Cell Science*, v. 108, p. 3219-3231, 1995.

STRAPKOVA, A.; ANTOSOVA, M. Competition of NO synthases and arginase in the airways hyperreactivity. *General Physiology and Biophysics*, v. 30, p. 75-83, 2011.

SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; ZADOKS, R.N.; VANEECHOUTTE, M.; PIEPERS, S.; DE VliegHER, S. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science*, v.94, p.2329-2340, 2011.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, p. 477-489, 2019.

TOLEDO-SILVA, B.; BEUCKELAERE, L.; DE VISSCHER, A.; GEEROMS, C.; MEYER, E.; PIEPERS, S.; THIRY, D.; HAESBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Novel quantitative assay to describe in vitro bovine mastitis bacterial pathogen inhibition by Non-*aureus* Staphylococci. *Pathogens*, v. 11, n. 264, 2022.

TOLEDO-SILVA, B.; SOUZA, F. N.; PIEPERS, S.; MERTENS, K.; HAESBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Metabolites of bovine-associated non-*aureus* staphylococci influence

expression of *Staphylococcus aureus agr*-related genes in vitro. *Veterinary Research*, v. 52, n. 62, 2021.

WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R. M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The Veterinary Journal*, v. 192, p. 148-152, 2012.

XU, J.; YAO, H.; WANG, S.; LI, H.; HOU, X. Magiferin Inhibits Apoptosis and Autophagy Induced by *Staphylococcus aureus* in RAW 264.7 Cells. *Journal of Inflammation Research*, v. 13, 2020.

YANG, S. J.; KIM, K.; KIM, T. Y.; PAIK, H. Probiotic Properties and Antioxidant Activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in Fermented Black Gamju. *Foods*, v. 9, 2020.

YIMIN KOHANAWA, M.; ZHAO, S.; OZAKI, M.; HAGA, S.; NAN, G.; KUGE, Y.; TEMAKI, N. Contribution of toll-like receptor 2 to the innate response against *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Plos One*, v. 8, n. 9, 2013.

ZHU Q.; KANNEGANT, T. D. Cutting edge: distinct regulatory mechanisms control proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1beta. *Journal of Immunology*, v. 198, 2017.

CAPÍTULO 3

Avaliação da expressão do receptor de morte programada-1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1) em macrófagos desafiados por distintos isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus chromogenes* associados a vacas leiteiras

1. INTRODUÇÃO

A mastite, enfermidade de grande importância nos rebanhos leiteiros, causa impactos na saúde única, como prejuízos socioeconômicos, ambientais e saúde pública (Holland *et al.*, 2015). Dentre os agentes causadores de mastite, é inegável que *Staphylococcus aureus* é um dos microrganismos de maior importância, devido a sua patogenicidade, mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, persistência no ambiente da vaca, colonização da pele e mucosa e baixa eficácia de cura com tratamentos (Rainard *et al.*, 2017). A glândula mamária, mesmo saudável, é susceptível a infecção, sugerindo que os isolados de *S. aureus* são bem adaptados a esse nicho e podem causar infecções intramamárias persistentes (Souza *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020). Esse microrganismo também é eficiente em se adaptar a diferentes hospedeiros, inclusive em sítios extra mamários (Marques *et al.*, 2013, Santos *et al.*, 2020).

Em contrapartida, *Staphylococcus* não-aureus (SNA), que já foi considerado um grupo homogêneo anteriormente – estafilococos coagulase-negativos está presente em uma ampla variedade de nichos ecológicos, como o úbere de vacas (Condas *et al.*, 2017; Naqvi *et al.*, 2018; Nyman *et al.*, 2018). Dessa forma, *Staphylococcus chromogenes* é o SNA mais frequentemente isolado de amostras de leite assepticamente coletadas, e geralmente associado com infecções intramamárias persistentes (Supré *et al.*; 2011; Valckenier, *et al.*, 2020; Beuckelaere *et al.*, 2021), mas essas infecções, normalmente, têm efeitos limitados na contagem de células somáticas e na qualidade do leite (Valckenier, *et al.*, 2020). Apesar disso, De Vlieghe *et al.* (2004), Piepers *et al.* (2011) e Toledo-Silva *et al.* (2021) classificam esses microrganismos como parte da microbiota comensal da glândula mamária bovina ou ápices dos tetos com potenciais efeitos protetores contra a mastite. O efeito protetor de SNA depende da espécie, dos isolados, das concentrações usadas, e do nicho ecológico (Toledo-Silva *et al.*, 2022). Foi demonstrado que *S. chromogenes* exerce proteção *in vitro* contra vários patógenos, como *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* (De Vlieghe *et al.*, 2004) e *E coli* (Toledo-Silva *et al.*, 2022).

Nesse contexto, sabe-se que muitas vezes, esses patógenos interferem na ação de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, impedindo a sinalização necessária para ativação da resposta imune adaptativa (Wang, Roderiquez e Norcross, 2012). Estudos recentes têm evidenciado a ação de moléculas cossupressoras, também conhecidas como imuno *checkpoints*, dentre os quais se destacam o receptor de morte celular programada (PD-1) e seus respectivos ligantes, como PD-L1. A ativação de PD-1/PD-L1 afeta

negativamente a função de linfócitos T, e sua atuação frente às infecções e injúrias teciduais, devido a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Chen e Flies, 2013; Lu *et al.*, 2019).

Gordon *et al.* (2017) relataram que PD-1 desempenha papel supressor em macrófagos, inibindo a fagocitose e levando a polarização M2 dessas células. Com relação à função de PD-L1 em macrófagos, Xiong *et al.* (2019) relataram que macrófagos tratados com anti-PD-L1 apresentaram expressão reduzida de *arginase-1*, e expressão aumentada de *iNOS*, MHC II e CD40. Galbraith *et al.* (2018) também demonstraram que INF- γ aumenta a expressão de PD-L1 em macrófagos. Hartley *et al.* (2018) observaram que macrófagos com alta expressão de PD-L1 tiveram maior capacidade de proliferação, sobrevivência e ativação após tratamento com anticorpo anti-PD-L1.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 na infecção *in vitro* de macrófagos com dois isolados distintos de *Staphylococcus aureus* e dois isolados distintos de *Staphylococcus chromogenes*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados de *Staphylococcus* spp. e condições de crescimento

Nesse estudo, foram utilizados quatro isolados distintos de *Staphylococcus* spp., compreendendo dois isolados de *Staphylococcus aureus* e dois de *Staphylococcus chromogenes*. Essas amostras fazem parte do acervo do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e já foram previamente isoladas e identificadas por análises moleculares e caracterizados por vários estudos (De Vlieghe *et al.*, 2004; Supré *et al.*, 2011; Breyne *et al.*, 2015; Piccart *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020; Beuckelaere *et al.*, 2021; Toledo-Silva *et al.*, 2021; Toledo-Silva *et al.*, 2022).

A primeira amostra de *S. aureus* é proveniente de um nicho extramamário (*swab* nasal – SN/; spa t098) (Santos *et al.*, 2020), enquanto a outra amostra desse patógeno (spa t605) foi originada de uma infecção subclínica intramamária (IM) persistente (Souza *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020). Já a primeira amostra de *S. chromogenes* foi obtida a partir do ápice do teto de uma novilha (TA) (De Vlieghe *et al.*, 2004; Breyne *et al.*, 2015; Piccart *et al.*, 2016; Souza *et al.*,

2016), que demonstrou proteção *in vitro* contra vários patógenos, como *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* (De Vliegher *et al.*, 2004) e *E. coli* (Toledo-Silva *et al.*, 2022). A outra amostra de *S. chromogenes* é originária de uma infecção IM persistente (Supré *et al.*, 2011).

Os isolados estavam armazenados a -80 °C e foram descongelados a temperatura ambiente. Primeiro, as amostras foram cultivadas em placas de ágar sangue contendo 5 % de sangue de carneiro. Em seguida, colônias frescas de cada bactéria foram cultivadas de 12 a 16 horas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 37 °C. Posteriormente, todas as amostras foram diluídas 1:1000, e em seguida, incubadas em caldo BHI até atingirem sua respectiva fase de crescimento exponencial tardio. Após o crescimento bacteriano, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 2.500 g por 15 minutos e lavado duas vezes com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco 1X (DPBS) (cat. No. 14190185, Gibco, Paisley, Reino Unido). Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em meio de cultivo celular RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Usando diluição decimal seriada, 10 µL de cada amostra de isolado de estafilococos foram cultivados em ágar BHI até que as bactérias vivas fossem contadas de forma confiável para determinar as unidades formadoras de colônia. O inóculo foi ajustado para $2,2 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias mL⁻¹ (ufc mL⁻¹) (CLSI, 2021) e armazenado a -80 °C até processamento posterior.

2.2 Cultivo de células RAW da linhagem 264.7

Células RAW da linhagem 264.7 (linhagem celular de macrófagos de camundongos BALB/c, ATCC) foram cultivadas e replicadas a cada quatro dias em meio RPMI-1640, cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (SFB, cat. n. F9665 Sigma Aldrich; Sigma) e com 1% de solução antibiótico-antimicótico (penicilina/ estreptomicina) (cat. n. 15240-062, *Life Technologies*, Pasley, United Kingdom). Essas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂ modelo CB150 (Binder, Tittlingen, Alemanha). A viabilidade celular foi avaliada por teste de exclusão com o corante azul Tripán (cat. n. T8154-100ML, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 0,02%. Amostras com viabilidade superior a 95% foram colocadas em cultura. A concentração de células foi ajustada de acordo com a necessidade de cada experimento. Foi utilizada a linhagem macrofágica, ao invés de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico, para evitar a variação da resposta celular que ocorreria se obtidos de indivíduos diferentes (Souza Leão *et al.*, 1995).

2.3 Desafio bacteriano com amostras de *Staphylococcus* spp.

As células foram distribuídas em placas de vinte quatro poços, e incubadas em estufa umidificada com 5 % de CO₂ a 37 °C, por um período de 1 hora, para que as mesmas pudessem aderir à placa. Após a aderência das células nas placas, o meio foi retirado e as células foram lavadas com solução *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) (cat. n. 14190185, Gibco, Paisley, UK), para retirada dos resquícios da solução antibiótico-antimicótico, a fim de evitar a morte bacteriana. Para os experimentos de infecção, foram utilizados a proporção de *Staphylococcus* sp./macrófago com multiplicidade de infecção (MOI) de 1, 5 e 10 (*S. aureus* t098 e t605 e *S. chromogenes* TA e IM) e dois tempos de incubação (3 h e 6 h). Sucintamente, 2,2 x 10⁵ células em RPMI sem antibiótico com 5% de SFB em 500 µL foram distribuídas em placas de cultura com poços, em sextuplicata e foram deixados poços sem infecção para utilização como controle. Após a incubação, as células não aderentes foram removidas por aspiração do sobrenadante e lavadas com PBS. O meio de cultivo celular RPMI sem antibiótico foi repostado e as células deixadas em repouso por 1h a 37°C com 5% de CO₂, e após isso, as infecções de cada uma das quatro amostras de estafilococos foram realizadas em incubadora úmida a 37°C com 5% CO₂.

2.4 Detecção de viabilidade celular e expressão de PD-1 e PD-L1

A viabilidade celular foi definida por marcação dupla usando um anticorpo conjugado fluorescente anti-anexina-V (FITC) (cat. n. A13199, BD Biosciences, San Diego, EUA) e 7-aminoactinomicina (7-AAD) (cat. n. A1310, Biolegend, San Diego, EUA), conforme descrito por Zembuski *et al.* (2012), mas com pequenas alterações. Brevemente, após o período de incubação, as células foram retiradas das placas de 24 poços e transferidas para tubos para citometria de fluxo de 5 mL, fundo redondo, 12 x 75 mm, e centrifugadas a 250 g a 4 °C por 8 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), e acrescentado 1 µL de anexina-V FITC e 5 µL de 7-AAD (5 µg mL⁻¹) sendo incubado em temperatura ambiente por 20 min no escuro.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com solução DPBS, e centrifugadas a 250 g a 4 °C por 8 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Para avaliação da expressão de PD-1 e seu ligante PD-L1 foram acrescentados aos tubos 0,5 µL do anticorpo conjugado PE *Rat Anti-Mouse* CD274 (PD-L1) (cat. n. 14-5982-82, BD Biosciences, San

Diego, EUA) e 0,5 μ L do anticorpo conjugado APC *Rat anti-Mouse* CD279 (PD-1) (cat. n. 11-9985-82, BD Biosciences, San Diego, EUA), que foram deixados no escuro, incubando por 30 min em temperatura ambiente. Após o período de incubação as células foram lavadas com solução de DPBS e centrifugadas a 250 g a 4 °C por 8 min. Depois da centrifugação o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas com 300 μ L de solução DPBS contendo 1% de soro fetal bovino para posterior análise por citometria de fluxo no equipamento (FACSCalibur™, Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA). O software *Flow Jo Tree Star* (*Flow Jo – Tree star* 10.5.3 para Windows, Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA) foi usado para analisar os dados. Um controle sem coloração e amostras com coloração única também foram preparados como controles de compensação, além da estratégia *fluorescence minus one* (FMO). Um exemplo da nossa estratégia para a determinação da expressão de PD-1 em macrófagos é mostrado na Figura 1.

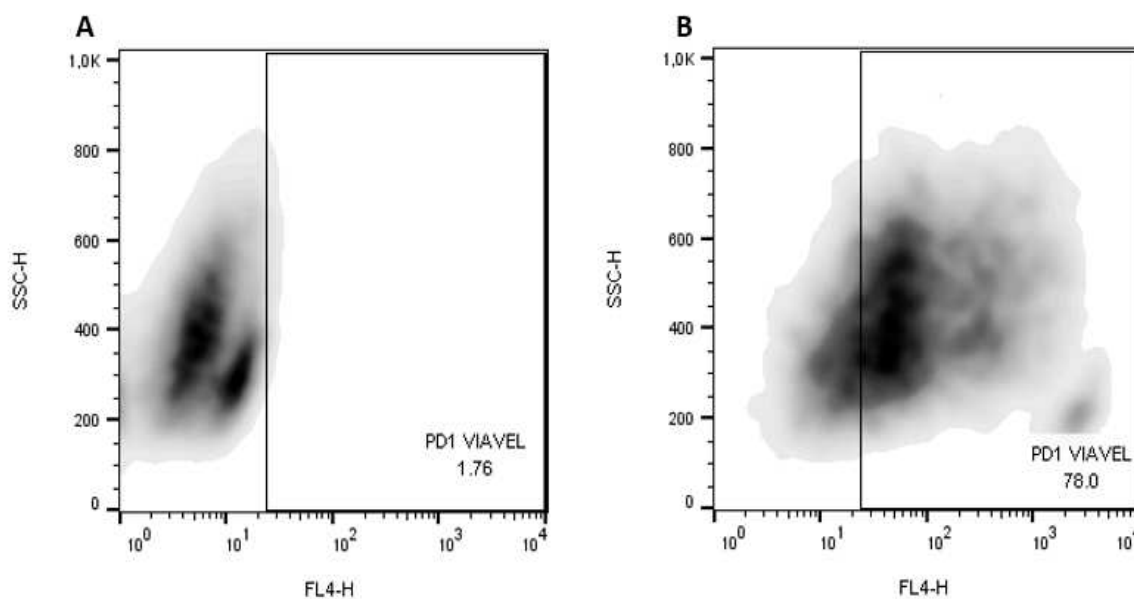


Figura 1: A – Imagem de macrófagos sem infecção. B – Imagem de macrófagos com infecção de 3h com *S. aureus* SN com MOI 10.

2.5 Análise estatística

Antes de iniciar as análises foram verificados a normalidade e homocedasticidade das variáveis, utilizando os testes Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Observou-se que todas as variáveis possuíam distribuição paramétrica, com exceção da intensidade da fluorescência média geométrica (GMFI) de PD1, que passou por transformação logarítmica (valor de dados + 1). Desta forma, as variáveis foram comparadas pelo teste estatístico de Duncan, considerando o nível de significância (α) de 0,05 (Sampaio, 2010). As comparações foram feitas em dois níveis, sendo o nível 1, efeito tempo, efeito bactéria e efeito MOI isoladamente e o nível 2, interação do efeito bactéria e tempo, e a interação do efeito bactéria e MOI. O programa estatístico usado foi o *InfoStat* (Córdoba, Argentina).

3. RESULTADOS

3.1 Porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 e intensidade da fluorescência média geométrica (GMFI) do PD-1

No presente estudo, a infecção experimental pelos distintos isolados de estafilococos levou maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 que o controle (basal), sendo a maior porcentagem observada na infecção pelos dois isolados de *S. aureus*, seguindo por *S. chromogenes* isolado de IM, e *S. chromogenes* isolados do ápice do teto ($P < 0,0001$; Figura 2A). Curiosamente, a maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 foi observado logo no início da infecção (3 h) em relação a 6 h após a infecção ($P = 0,0003$; Figura 2B). Não houve efeito de MOI na porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 ($P = 0,71$). No início da infecção (3 h), maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 foi observada nas infecções por *S. aureus* IM e *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$; Figura 2C). Já com 6h de infecção, maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 foi observada na infecção por *S. aureus* SN ($P < 0,0001$; Figura 2C).

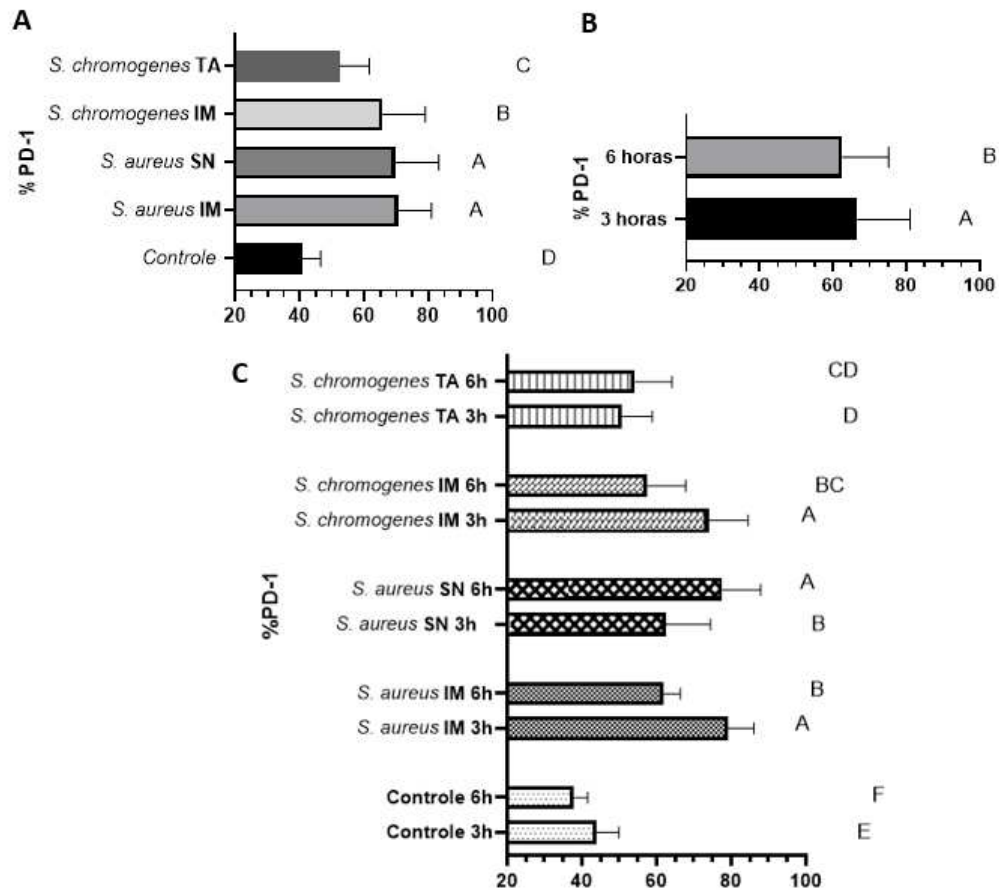


Figura 2: Porcentagem de macrófagos que expressam receptor de morte programada (PD-1) em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 3h e 6h. A - Efeito da bactéria na porcentagem de macrófagos que expressam PD-1. B – Efeito do tempo na porcentagem de macrófagos que expressam PD-1. C – Efeito da interação da bactéria e do tempo na porcentagem de macrófagos que expressam PD-1. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de *swab* nasal; TA = isolado de ápice do teto.

Todos os isolados de estafilococos levaram à maior intensidade de expressão de PD-1 em macrófagos quando comparados ao controle ($P < 0,0001$; Figura 3A). Os macrófagos das infecções de MOI 10 foram os que expressaram PD-1 em maior intensidade, sendo o controle (basal) menor expresso ($P < 0,0001$; Figura 3B). Os macrófagos das infecções de 6 h expressaram maior intensidade de PD-1 do que 3 h ($P < 0,0001$; Figura 3C). Os macrófagos infectados com *S. aureus* SN foram os que expressaram maior intensidade de PD-1 ao longo da infecção ($P < 0,0001$; Figura 3D).

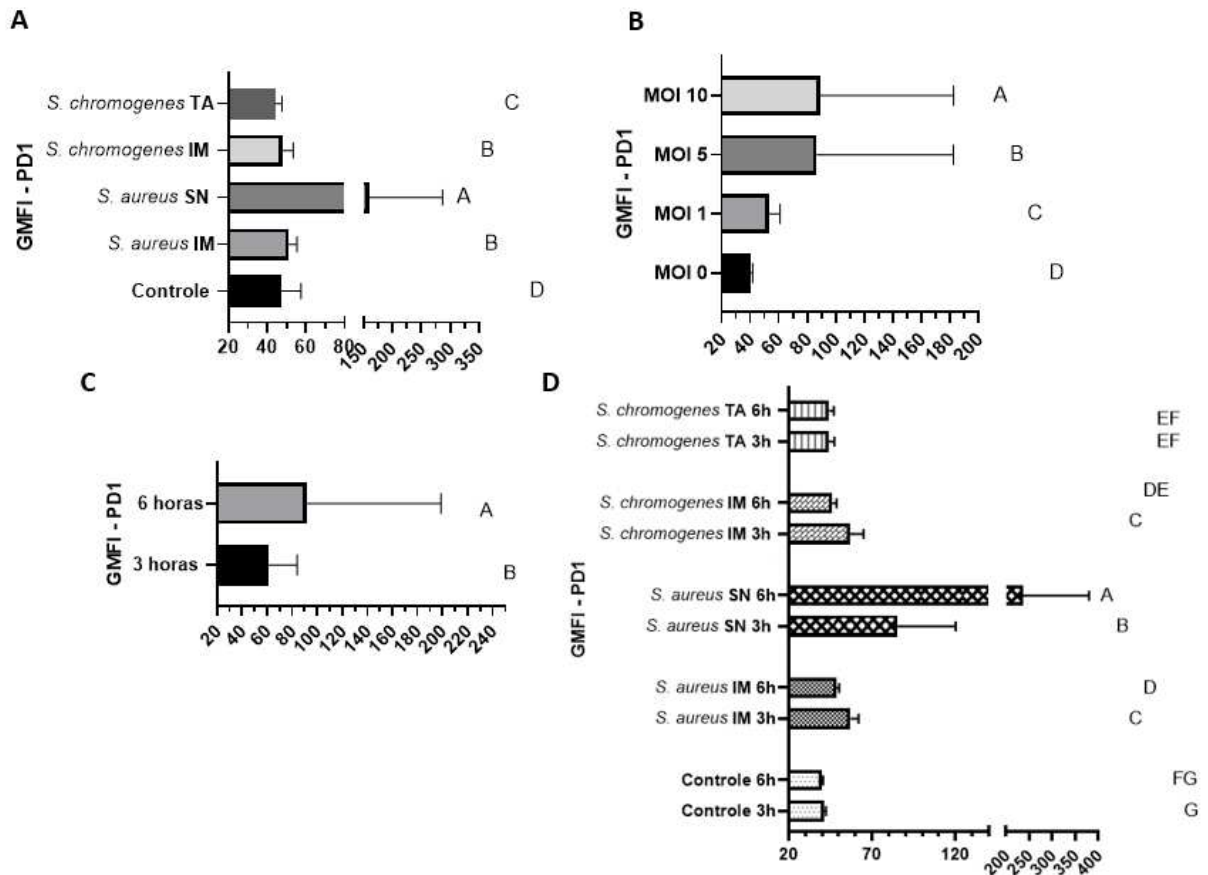


Figura 3: Intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) da expressão do receptor de morte programada (PD-1) em macrófagos em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 3h e 6h. A - Efeito da bactéria na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-1. B - Efeito do MOI na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-1. C – Efeito do tempo na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-1. D – Efeito da interação da bactéria e do tempo na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-1. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

3.2 Porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1 e intensidade da fluorescência média geométrica (GMFI) do PD-L1

Apenas *S. aureus* IM induziu maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1 em relação ao controle (basal) ($P < 0,0001$; Figura 4A). Interessantemente, a maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1 foi observada no início da infecção (3 h) ($P < 0,0001$; Figura 4B). As maiores porcentagens de macrófagos que expressam PD-L1 foram observadas nos MOIs de 5 e 10 ($P = 0,0003$; Figura 4C). Somente *S. aureus* IM e *S. chromogenes* IM

tiveram maiores porcentagens de macrófagos PD-L1 que o controle (basal) na interação bactéria e MOI ($P < 0.0001$; Figura 4D).

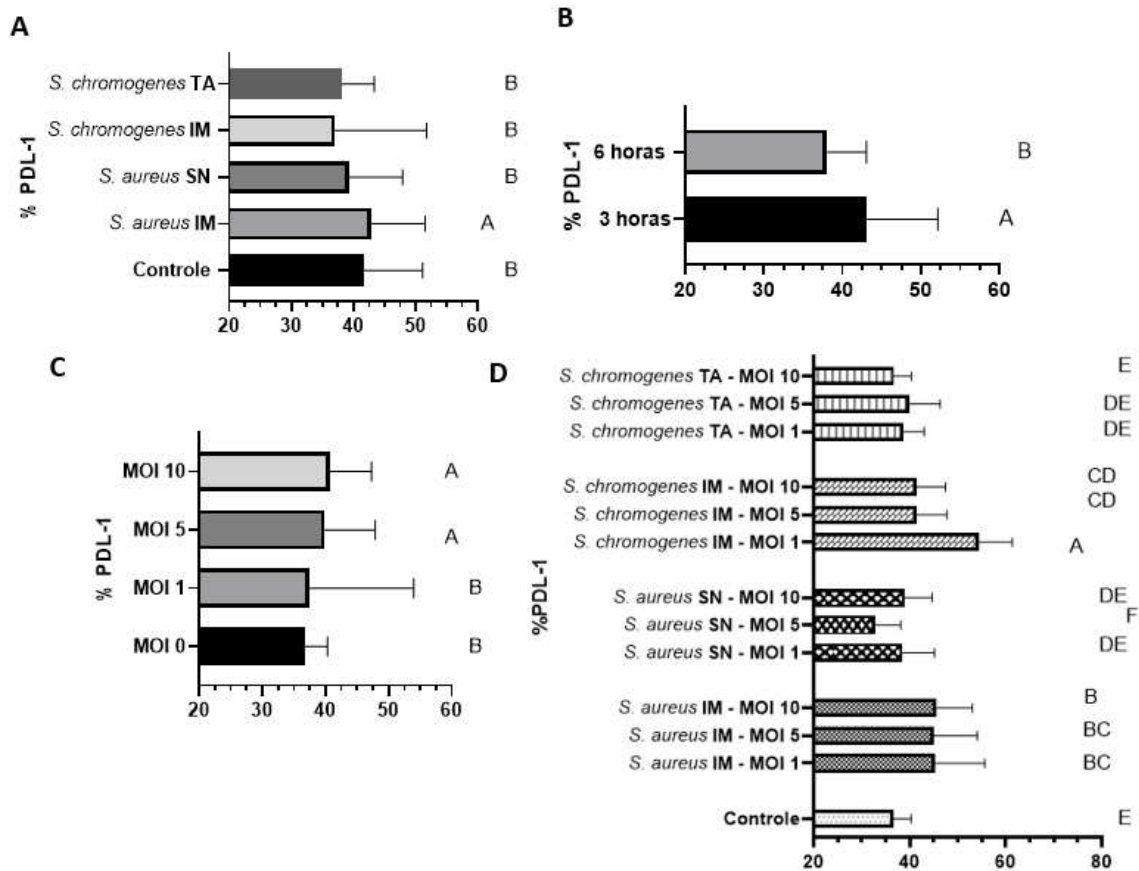


Figura 4: Porcentagem de macrófagos que expressam o ligante do receptor de morte programada (PD-L1) em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 3h e 6h. A - Efeito da bactéria na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1. B - Efeito do tempo na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1. C - Efeito do MOI na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1. D - Efeito da interação da bactéria e do MOI na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

Em relação à expressão de PD-L1 em macrófagos observou-se maior intensidade, mesmo que discretamente, na infecção por *S. aureus* IM e *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$; Figura 5A). A intensidade da expressão de PD-L1 foi maior no início da infecção (3 h) ($P < 0,0001$; Figura 5B). Não houve efeito de MOI ($P = 0,13$) para a intensidade da expressão de PD-L1 nos macrófagos.

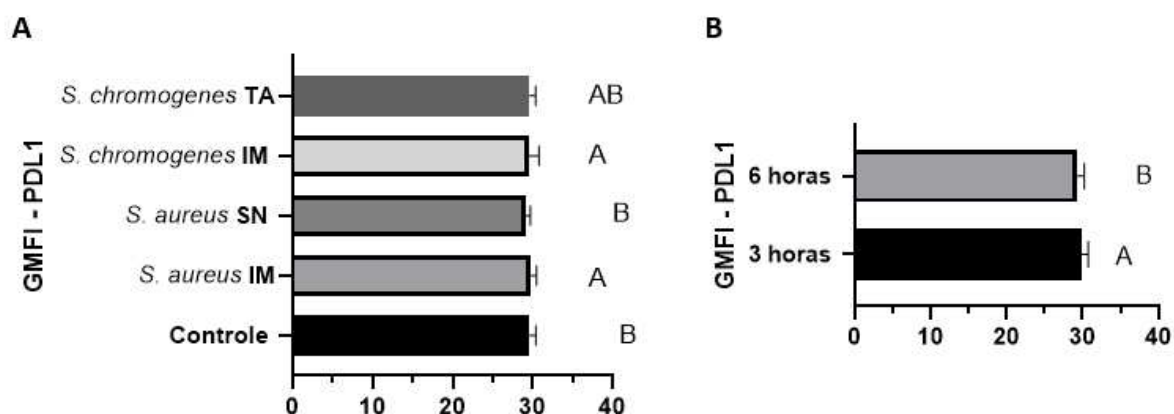


Figura 5: Intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) da expressão do ligante do receptor de morte programada (PD-L1) em macrófagos em infecção experimental de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA, em dois tempos de infecção, 3h e 6h. A - Efeito da bactéria na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PD-L1. B – Efeito do tempo na intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de macrófagos que expressam PDL-1. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

3.3 Viabilidade de macrófagos

A infecção experimental pelos isolados de estafilococos fez com que a maior porcentagem de macrófagos viáveis, tenha sido dos infectados com *S. aureus* IM e *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$; Figura 6A). Foi observada maior viabilidade dos macrófagos das infecções de 3 h do que das infecções de 6 h ($P < 0,0001$; Figura 6B). A maior porcentagem de macrófagos viáveis é do MOI 1 ($P < 0,0001$; Figura 6C).

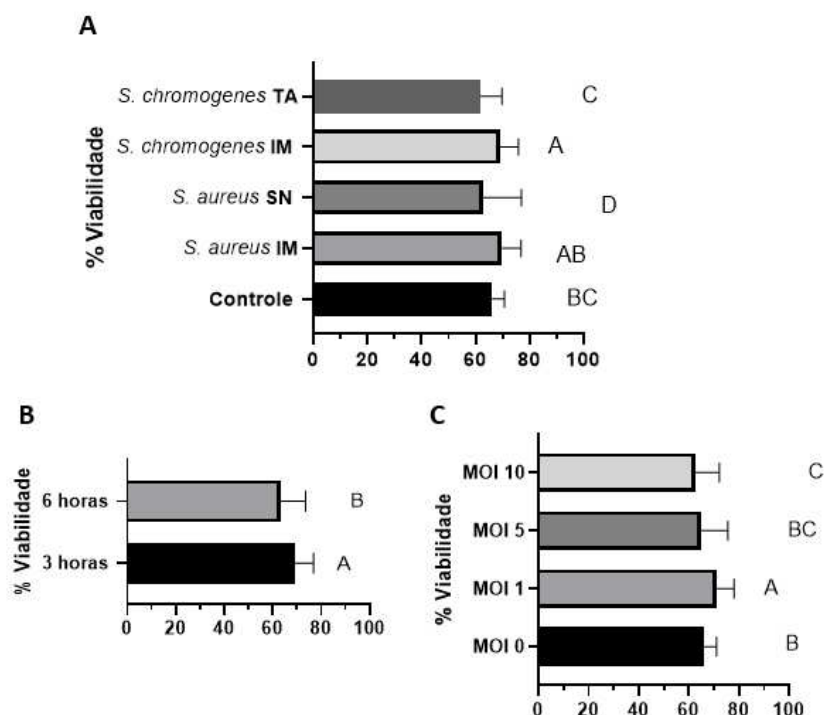


Figura 6: Viabilidade dos macrófagos em infecção de células RAW 264.7 com *S. aureus* IM, *S. aureus* SN, *S. chromogenes* IM e *S. chromogenes* TA. A – Efeito da bactéria na viabilidade dos macrófagos. B – Efeito do tempo na viabilidade dos macrófagos. C – Efeito do MOI na viabilidade dos macrófagos. Resultados expressos em médias \pm erro-padrão. $P < 0,05$, ANOVA e teste de Duncan. Médias com uma letra em comum não são significativamente diferentes. Legenda: IM = isolado de infecção intramamária; SN = isolado de swab nasal; TA = isolado de ápice do teto.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados macrófagos murinos ao invés de neutrófilos, pois esses fazem parte da primeira linha de defesa da imunidade inata no úbere, desenvolvendo papel importante na resposta imune precoce de bovinos (Mosser e Edwards, 2010).

O PD-1 desempenha papel essencial no equilíbrio da imunidade protetora, imunopatologia, homeostase e tolerância. Apesar disso, o PD-1 pode limitar a imunidade protetora do hospedeiro (Sharpe e Pauken, 2018). Bally *et al.* (2015) relataram que esse receptor pode ser induzido em monócitos e macrófagos por meio da sinalização de TLR.

Nesse contexto, nota-se que a sinalização de PD-1 em macrófagos estimulados por estafilococos, se torna possível mecanismo de evasão dessas bactérias, principalmente dos isolados de *S. aureus*, que foram os que levaram a maior porcentagem de macrófagos a expressarem esse receptor. Gordon *et al.* (2017) demonstraram que PD-1 em macrófagos

desempenham papel de supressão, podendo estar associados a polarização M2 dessas células, com ação anti-inflamatória e diminuição da apresentação de antígenos.

Ikebuchi *et al.* (2013) e Okagawa *et al.* (2018) relataram como expressão de PD-1 em células imunes tem sido associado à imunossupressão, progressão da infecção e ao prognóstico ruim em doenças infecciosas de bovinos. Esses resultados demonstram como todos isolados estudados nesse trabalho, ao induzirem mais PD-1 que o controle, podem levar a exaustão de células imunes efetoras. Dessa maneira, é possível perceber evidências que patógenos possibilitam interações inibitórias entre células imunes através de proteínas de *checkpoint* imunológico para evadir o sistema imune do hospedeiro, explorando a tolerância imunológica e restringindo a eliminação de microrganismos (Wykes e Sharon, 2018).

Patera *et al.* (2016) relataram que em estudos experimentais em camundongos com sepse, houve alta expressão de PD-1 e PD-L1 na superfície de monócitos do sangue periférico, demonstrando que macrófagos tiveram perda da função fagocitária, além de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. Foi observado também que a capacidade fagocitária de macrófagos em camundongos *knockout* para PD-1 é aumentada em relação a camundongos selvagens (Ayala *et al.*, 2014). Xie *et al.* (2018) observaram em camundongos que células T que expressavam altos níveis de PD-1, diminuíram a capacidade de secretar citocinas. Já essas células com menor expressão de PD-1 tiveram secreção aumentada de TNF. Com isso, os autores puderam afirmar que esses receptores de superfície inibem a função de células T.

Além disso, em relação a *Mycobacterium tuberculosis*, sabe-se que PD-1 e PD-L1 são altamente expressos em células imunes durante a infecção (Suarez *et al.*, 2019). Existem estudos que demonstram que a expressão de PD-1 é prejudicial nesses casos, pois inibe a resposta imune do hospedeiro (Jurado *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2010). Por outro lado, também há estudos que validam que a indução desse receptor de superfície é necessária para inibir a resposta imune exacerbada, que pode levar a lesões teciduais (Lazar-Molnar *et al.*, 2010; Barber *et al.*, 2011). Com isso, também é possível perceber que essas células são vitais para a manutenção da auto tolerância e na modulação da magnitude e duração das respostas imunes efetoras para prevenir dano tecidual, do modo que é necessário em bactérias comensais, como *S. aureus* SN.

Suarez *et al.* (2019) relataram que ao reconhecerem células infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*, células inatas e adaptativas secretam IFN- γ , levando a ativação de macrófagos

M1, aumentando, portanto, a susceptibilidade desses à citotoxicidade mediada por células T CD8⁺. Concomitantemente, esse mesmo estímulo leva a uma expressão aumentada de PD-1 e PD-L1 e a uma diminuição da toxicidade das células T CD8⁺. Os autores relataram também que é esse equilíbrio entre sinais estimuladores e inibitórios que definirá o destino da célula alvo e delinear o desfecho da infecção.

A maior expressão de PD-1 no isolado de *S. aureus* de infecção intramamária persistente pode levar à exaustão das células T, aumentando o processo inflamatório da glândula mamária causada por esses patógenos. Com isso, perdas na qualidade do leite e derivados em razão do aumento da contagem de células somáticas (CCS) causada por mastite são inúmeras. Os principais danos da presença de patógenos no tecido mamário são o recrutamento de leucócitos, a síntese de peptídeos antimicrobianos pelas células desse tecido e a liberação de citocinas. Tudo isso traz consequências para as propriedades leiteiras e produtos lácteos (Le Maréchal *et al.*, 2011).

Em relação à porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1, ao observarmos o efeito bactéria, percebe-se que apenas o isolado *S. aureus* IM estimulou mais macrófagos a expressarem esse ligante em relação ao controle (basal), mesmo que discretamente. Com isso, é possível demonstrarmos que as bactérias comensais analisadas nesse estudo não estimulam a o aumento do número de macrófagos que expressam PD-L1.

Apesar dos resultados desse trabalho, é possível encontrar estudos na literatura que demonstram que a presença de antígenos induz a expressão de PD-L1 em células imunes. Hartley *et al.* (2018) indicaram um papel regulador de PD-L1 na proliferação e ativação de macrófagos. Outro estudo mostrou que a supressão da expressão de PD-L2 em macrófagos, levou a diminuição da expressão de marcadores M2, como IL-10 e *arginase* e o aumento da expressão de marcadores M1, como IL-12 e TNF- α (Zhang, Chen e Xiang, 2017).

Além disso, Wang *et al.* (2015) relataram o aumento escalonado da expressão de PD-L1 em neutrófilos de camundongos, com 12h, 18h e 24h após início da sepse. Nesse sentido, Huang *et al.* (2014) demonstraram que o número de bactérias em camundongos *knockout* para PD-L1 é significativamente reduzido em comparação com camundongos selvagens, relatando como a expressão desse ligante também pode ser visto como um mecanismo de evasão do sistema imune. Patil *et al.* (2017), ao induzirem injúria tecidual por escalda em camundongos, seguido de infecções por *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, relataram regulação positiva de PD-L1

em células mieloides, juntamente com uma diminuição no número e função de células T e diminuição da sobrevivência desses animais.

Esse trabalho também demonstrou que a intensidade da expressão de PD-1 aumenta devido à concentração do inóculo, ou seja, quanto maior a quantidade de bactérias, mais receptores são expressos nas células. Já para PD-L1 não houve diferença estatística ao analisar o efeito MOI. Dessa forma, vale ressaltar a importância da intensidade de expressão de PD-1 na superfície de cada célula. Thommen *et al.* (2015) relataram que a expressão de PD-1 na superfície de células T interfere na eficácia da terapia anti-PD-1, uma vez que essas células com altos níveis de PD-1 expressos, ou seja, com múltiplos receptores inibitórios, não possuem respostas satisfatórias com tratamentos anti-PD-1. Células T CD8⁺ com altos níveis de expressão de PD-1 não respondem ao bloqueio de PD-1, diferentemente de células T com níveis intermediários de expressão, sendo responsivas a esse tipo de terapia (Blackburn *et al.*, 2008; Wherry, 2011). Com isso, o isolado que teve a maior intensidade de expressão de PD-1 foi *S. aureus* SN, bactéria comensal, que tende a demonstrar mecanismos para manter a tolerância imunológica (Littman e Pamer, 2011).

Por fim, no presente estudo foi observado que o isolado que levou à menor viabilidade dos macrófagos foi *S. aureus* SN, mas a diferença biológica com os outros isolados e o controle (basal) foi pouco significativa. Houve maior viabilidade nas infecções de 3 h do que nas de 6 h, mas com discreta diferença. Essa diferença ocorre, uma vez que com o passar do tempo, mais células entram em apoptose, que é desencadeada por processos inflamatórios e realizada como defesa do sistema imune contra patógenos e injúrias (Lee, Hartman e Kornfeld, 2009).

5. CONCLUSÕES

- Todos os isolados estudados nesse trabalho induziram maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 em células RAW 264.7 em relação ao controle (basal), demonstrando que esse é um possível mecanismo de evasão desses isolados.
- A maior expressão de PD-1 em macrófagos desafiados por *S. aureus* IM pode aumentar o processo inflamatório da glândula mamária, levando à persistência da infecção intramamária, perdas na produção e alterações na qualidade do leite.
- Apenas *S. aureus* IM levou à indução de discreto aumento na porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1 em relação ao controle (basal).

- *S. aureus* SN teve a maior intensidade de expressão de PD-1, demonstrando que esse é possível mecanismo para bactérias comensais manterem a tolerância imunológica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, I. B.; PASQUINELLI, V.; JURADO, J. O.; ABBATE, E.; MUSELLA, R. M.; LA BERRERA, S. S. Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Infectious Disease*, v. 2020, p. 524-532, 2010.

AYALA, A.; ELPHICK, G. F.; KIM, Y. S.; HUANG, X, CARREIRA-ROSARIO, A.; SANTOS, S. C.; SHUBIN, N. J.; CHEN, Y.; REICHNER, J.; CHUNG, C. S. Sepsis-induced potentiation of peritoneal macrophage migration is mitigated by programmed cell death receptor-1 gene deficiency. *Journal of Innate Immunity*, v. 6, 2014.

BALLY, A. P. R.; LU, P.; TANG, Y.; AUSTIN, J. W.; SCHARER, C. D.; AHMED, R.; BOSS, J. M. NF- κ B regulates PD-1 expression on macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 9, 2015.

BARBER, D. L.; MAYER-BARBER, K. D.; FENG, C. G.; SHARPE, A. H.; SHER, A. CD4 T cells promote rather than control tuberculosis in the absence of PD-1-mediated inhibition. *The Journal of Immunology*, v. 186, P. 1598-1607, 2011.

BLACKBURN, S. D.; SHIN, H.; FREEMAN, G. J.; WHERRY, E. J. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alpha PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, 2008.

BREYNE, K.; DE VILEGHER, S.; DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; MEYER, E. Technical note: A pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 2, 2015.

BEUCKELAERE, L.; DE VISSCHER, A.; SOUZA, F. N.; MEYER, E.; HAESEBROUCK, F.; PIEPERS, S.; DE VliegHER, S. Colonization and local host response following intramammary *Staphylococcus chromogenes* challenge in dry cows. *Veterinary Research*, v. 52, n. 137, 2021.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, p. 227-242, 2013.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, ed. 31, Wayne, PA, 2021.

CONDAS, L.A.Z.; DE BUCK, J.; NOBREGA, D.B.; CARSON, D.A.; ROY, J.P.; KEEFE, G.P.; DEVRIES, T.J.; MIDDLETON, J.R.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H.W. Distribution of non-aureus staphylococci species in udder quarters with low and high somatic cell count, and clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.100, p.5613-5627, 2017.

DE VliegHER, S.; OPSOMER, G.; VANROLLEGHEM, A.; DEVRise, L; A.; SAMPIMON, J.; SOL, J.; BARKEMA, H. W.; HAESEBROUCK, F.; KRUIF, A. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Veterinary Microbiology*, v. 101, n. 3, p. 215–221, 2004.

GALBRAITH, N. J.; MANEK, S.; WALKER, S.; BISHOP, C.; CARTER, J. V.; CAHILL, M.; GARDNER, S. A.; POLK, H. C.; GALANDIUK, S. The effect of the IκK-16 on lipopolysaccharide-induced impaired monocytes. *Immunobiology*, v. 223, n. 4, p. 365-373, 2018.

GORDON, S. R.; MAUTE, R. L.; DULKEN, B. W.; HUTTER, G.; GEORGE, B. M.; McCRACKEN, M. N.; GUPTA, R.; TSAI, J. M.; SINHA, R.; COREY, D.; RING, A. M.; CONNOLLY, A. J.; WEISSMAN, I. L. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*, v. 545, n. 7655, p. 495-499, 2017.

HARTLEY, G. P.; CHOW, L.; AMMONS, D. T.; WHEAT, W. H.; DOW, S. W. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) signaling regulates macrophage proliferation and activation. *Cancer Immunology Research*, v. 10, 2018.

HOLLAND, J. K., J. C.; HADRICHT, C. A.; WOLF J. L. Economics of measuring costs due to mastitis-related milk loss. In.: AAEA e WAEA *Joint Annual Meeting*, San Francisco, CA, 2015.

HUANG, X.; CHEN, Y.; CHUNG, C. S.; YANG, Z.; MONAGHAN, S. F.; WANG, F.; AYALA, A. Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/proinflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis. *Journal of Immunology*, v. 192, 2014.

IKEBUCHI, R.; KONNAI, S.; OKAGAWA, T.; YOKOYAMA, K.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.; MURATA, S.; OHASHI, K. Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. *Veterinary Research*, v. 44, n. 59, 2013.

JURADO, J. O.; ALVAREZ, I. B.; PASQUINELLI, V.; MARTÍNEZ, G. J.; QUIROGA, M. M.; ABBATE, E.; MUSELLA, R. M.; CHULUYAN, H. E. Programmed death (PD)-1: PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *The Journal of Immunology*, v. 181, p. 116-125, 2008.

LAZAR-MOLNAR, E.; CHEN, B.; SWEENEY, K. A.; WANG, E. J. LIU, W.; LIN, J. PORCELLI, S. A.; ALMO, S. C.; NATHENSON, S. G. Programmed death-1 (PD-1) deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 30, 2010.

LEE, J.; HARTMAN, M.; KORNFELD, H. Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei Medical Journal*, v. 50, n. 1, p. 1-11, 2009.

LE MARÉCHAL, C.; THIÉRY, R.; VAUTOR, E.; LÉ LOIR, Y. Mastitis impact on technological properties of milk and quality products – a review. *Dairy Science & Technology*, v. 91, p. 247-282, 2011.

LITTMAN, D. R.; PAMER, E. G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host & Microbe*, v. 10, n. 4, p. 311-323, 2011.

LU, D.; NI, Z.; LIU, X.; FENG, S.; DONG, X.; SHI, X.; ZHAI, J.; MAI, S.; JIANG, J.; WANG, Z.; WU, H.; CAI, K. Beyond T Cells: Understanding the role of PD-1/PD-L1 in tumor-associated macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2019.

MARQUES, V. F.; SOUZA, M. M. S.; MENDONÇA, E. C. L.; ALENCAR, T. A. A.; PRIBUL, B. R.; COELHO, S. M. O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E. B. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 2, p. 161-170, 2013.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 6, 2010.

NAVQI, S.A.; DE BUCK, J.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H. W. Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. *Journal of Dairy Science*, v.101, p.3233-3247, 2018.

NYMAN, A.K.; FASTH, C.; WALLER, K.P. Intramammary infections with different non-aureus staphylococci in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.101, p.1403-1418, 2018.

OKAGAWA, T.; KONNAI, S.; NISHIMORI, A.; MAEKAWA, N.; GOTO, S.; IKEBUCHI, R.; KOHARA, J.; SUZUKI, Y.; YAMADA, S.; KATO, Y.; MURATA, S.; OHASHI, K. Cooperation of PD-1 and LAG-3 in the exhaustion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells during bovine leukemia virus infection. *Veterinary Research*, v. 49, 2018.

PATERA, A. C.; DREWRY, A. M.; CHANG, K.; BEITER, E. R.; OSBORNE, E. R.; HOTCHKISS, R. S. Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD 1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, p. 1239-1254, 2016.

PATIL, N. K.; LUAN, L.; BOHANNON, J. K.; HERNANDEZ, A.; GUO, Y.; SHERWOOD, E. R. Anti-PD-L1 protects Against infection with common bacterial pathogens after burn injury. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 103, p. 23-33, 2017.

PICCART, K.; VERBEKE, J.; DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; HAESEBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Local host response following an intramammary challenge with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers. *Veterinary Research*, v. 47, n. 1, 2016.

PIEPERS, S.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; FRANKENA, K.; DE VliegHER, S. Pathogen group specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 99, n. 2-4, p. 91–101, 2011.

RAINARD, P.; FOUCRAS, G.; FITZGERALD, J. R.; WATTS, J. L.; KOOP, G.; MIDDLETON, J. R. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 65, p. 149–165, 2017.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. *Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 3, p. 264, 2010.

SANTOS, R. P.; SOUZA, F. N.; OLIVEIRA, A. C. D.; SOUZA FILHO, A. F. S.; AIZAWA, J.; MORENO, L. Z.; CUNHA, A. F.; CORTEZ, A.; DELLA LIBERA, A. M. M.;

HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. *Animals*, v. 10, n. 11, p. 2143, 2020.

SHARPE, A. H.; PAUKEN, K. E.; The diverse functions of the PD-1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, p. 153-157, 2018.

SOUZA, F. N.; PIEPERS, S.; DELLA LIBERA, A. N. M. P.; HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA; DE VliegHER, S. Interaction between bovine-associated coagulase-negative staphylococci species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior. *Journal Dairy of Science*, v. 99, n. 4, p. 2867-2874, 2016.

SOUZA LEÃO, S.; LANG, T.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTONIE, J. C. Intracellular *Leishmania amazonenses* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of Cell Science*, v. 108, p. 3219-3231, 1995.

SUAREZ, G. V.; GANZARAIN, C. C. M.; VECCHIONE, M. B.; TRIFONE, C. A.; FRANCO, J. L. M.; GENOULA, M.; MORAÑA, E. J.; BALBOA, L.; QUIROGA, M. F. PD-1/PD-L1 pathway modulates macrophage susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* specific CD8+ T cell induced death. *Scientific Reports*, 2019.

SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; ZADOKS, R.N.; VANEECHOUTTE, M.; PIEPERS, S.; DE VliegHER, S. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science*, v.94, p.2329-2340, 2011.

THOMMEN, D. S.; SCHEREINER, J.; MULLER, P.; HERZIG, P; ROLLER, A.; BELOUSOV, A. Progression of lung cancer is associated with increased dysfunction of T Cells defined by coexpression of multiple inhibitory receptors. *Cancer Immunology Research*, v. 3, p. 1344-1355, 2015.

TOLEDO-SILVA, B.; BEUCKELAERE, L.; DE VISSCHER, A.; GEEROMS, C.; MEYER, E.; PIEPERS, S.; THIRY, D.; HAESBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Novel quantitative assay to describe in vitro bovine mastitis bacterial pathogen inhibition by Non-*aureus* Staphylococci. *Pathogens*, v. 11, n. 264, 2022.

TOLEDO-SILVA, B.; SOUZA, F. N.; PIEPERS, S.; MERTENS, K.; HAESBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Metabolites of bovine-associated non-*aureus* staphylococci influence

expression of *Staphylococcus aureus agr*-related genes in vitro. *Veterinary Research*, v. 52, n. 62, 2021.

TSUCHIYA, S.; KOBAYASHI, Y.; GOTO, Y.; OKUMURA, H.; NAKAE, S.; KONNO, T.; TADA, K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Research*, v. 42, n. 4, 1982.

VALCKENIER, D.; PIEPERS, S.; DE VISSCHER, DE VLIEGHER, S. The effect of intramammary infection in early lactation with non-aureus staphylococci in general and *Staphylococcus chromogenes* specifically on quarter milk somatic cell count and quarter milk yield. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 1, p. 768-782, 2020.

WANG, J.; LI, J.; ZHAO, Y.; YI, W.; BIAN, J.; WAN, X.; ZHU, K.; DENG, X. Up-regulation of Programmed Cell Death 1 Ligand 1 on Neutrophils May Be Involved in Sepsis-induced Immunosuppression: an animal study and a prospective case-control study. *Anesthesiology*, v. 122, n. 4, p. 852-863, 2015.

WANG, J.; RODRIGUEZ, G.; NORCROSS, M. A. Control of Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus* through IL-10, PD-L1 and TLR2. *Scientific Reports*, v. 2, n. 1, 2012.

WHERRY, E. J. T cell exhaustion. *Nature Immunology*, v. 12, p. 492-499, 2011.

WYKES, M. N.; SHARON, R. I. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, p. 91-104, 2018.

XIE, J.; ROBERTSON, J. M.; CHEN, C. W.; ZHANG, W.; COOPERSMITH, C. M.; FORD, M. L. Pre-existing malignancy results in increased prevalence of distinct populations of CD4+ T cells during sepsis. *Plos One*, 2018.

XIONG, H.; MITTMAN, S.; RODRIGUEZ, R.; MOSKALENKO, M.; PACHE-SANCHEZ, P.; YANG, Y.; NICKLES, D.; CUBAS, R. Anti-PD-L1 treatment results in functional remodeling of the macrophage compartment. *Cancer Research*, v. 79, n. 7, p. 1493-1506, 2019.

YAO, A.; LIU, F.; CHEN, K.; TANG, L.; ZHANG, K.; YU, C.; BIAN, G.; GUO, H.; ZHENG, J.; CHENG, P.; JU, G. WANG, J. Programmed death 1 deficiency induces the polarization of macrophages/microglia to the M1 phenotype after spinal cord injury in mice. *Neurotherapeutics*, v. 3, p. 636-650, 2014.

ZEMBRUSKI, N. C. L.; STACHE, V.; HAEFELI, W. E.; WEIS, J. 7-aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, v. 1, n. 429, p. 79-81.

ZHANG, W.; CHEN, Z.; XIANG, C. Upregulation of PDL1 by SPP1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma. *Experimental Cell Research*, v. 359, n. 2, p. 449–457, 2017.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os estudos realizados nesse trabalho foi possível perceber que os isolados de estafilococos modulam o metabolismo de células RAW 264.7 de formas distintas, demonstrando a importância do isolado em si e não da espécie. Com isso, mais estudos nessa área são de grande importância, uma vez que o imunometabolismo das células estudadas já se estabeleceu como alvos terapêuticos para possibilidade de novos tratamentos para infecções e distúrbios imunológicos.

Assim, mais estudos são necessários sobre a modulação imunometabólica de *Staphylococcus* spp., principalmente de *Staphylococcus* não-*aureus* que anteriormente era considerado um grupo homogêneo e sem grandes ressonâncias, mas que há alguns anos, têm causado grandes agravos e prejuízos na saúde única.