

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Peter Silva Rocha

**A IMUNIDADE TREINADA PROMOVE MODIFICAÇÕES EM MACRÓFAGOS
SINOVIAIS E AGRAVA O PROCESSO INFLAMATÓRIO DA ARTRITE
INFECCIOSA CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Belo Horizonte
2024

Peter Silva Rocha

**A IMUNIDADE TREINADA PROMOVE MODIFICAÇÕES EM MACRÓFAGOS
SINOVIAIS E AGRAVA O PROCESSO INFLAMATÓRIO DA ARTRITE
INFECCIOSA CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientador: Dr. Flávio Almeida Amaral

Belo Horizonte
2024

043

Rocha, Peter Silva.

A imunidade treinada promove modificações em macrófagos sinoviais e agrava o processo inflamatório da artrite infecciosa causada por *Staphylococcus aureus* [manuscrito] / Peter Silva Rocha. – 2024.
80 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Flávio Almeida Amaral.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Memória Imunológica. 3. Sinoviócitos. 4. Inflamação. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Amaral, Flávio Almeida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE PETER SILVA ROCHA. Aos nove dias do mês de abril de 2024 às 13:00 horas, reuniu-se de forma "online" utilizando a plataforma "Zoom", no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "A imunidade treinada promove modificações em macrófagos sinoviais e agrava o processo inflamatório da artrite infecciosa causada por *Staphylococcus aureus*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Almeida Amaral, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior (Universidade Estadual de Londrina), aprovado; Dr. Nicolas RITEAU (Centre National de la Recherche Scientifique), aprovado; Dra. Daniele da Glória de Souza (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Flávio Almeida Amaral - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

(X) APROVADO

() REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de abril de 2024.

gov.br

documento assinado digitalmente

WALDICEU APARECIDO VERRI JUNIOR

Data: 10/04/2024 16:30:31 -0300

Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior (Universidade Estadual de Londrina)

Dr. Nicolas RITEAU (Centre National de la Recherche Scientifique)

documento assinado digitalmente

gov.br

DANIELE DA GLÓRIA DE SOUZA

Data: 11/04/2024 13:28:55 -0300

Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Dra. Daniele da Glória de Souza (UFMG)

gov.br

documento assinado digitalmente

FÁBIO ANTÔNIO VITARELLI MARINHO

Data: 11/04/2024 12:38:10 -0300

Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho (UFMG)

gov.br

FLÁVIO ALMEIDA AMARAL

Data: 10/04/2024 09:44:49 -0300

Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Dr. Flávio Almeida Amaral - Orientador (UFMG)

Profa. Fabíola Mara Ribeiro
Coordenadora do Programa de Pós-graduação
Em Bioquímica e Imunologia

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Flávio Almeida Amaral pela oportunidade em seu laboratório e pela orientação durante esses 4 anos. Agradeço o incentivo, o aprendizado e a boa convivência que foram importantes na construção da minha formação acadêmica.

Às minhas ex-orientadoras Dra. Grazielle Ribeiro Goes, e Dra. Leda Quercia Vieira pela orientação desde o período de iniciação científica e mestrado. Agradeço pelos ensinamentos que se perpetuaram até o final do meu doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao longo do meu doutorado.

Aos meus companheiros de laboratório, Amanda e Gabrielly, Laura e Isabela pela boa convivência e pela disposição em ajudar.

Ao Adryan pelos bons momentos de convivência e pela disposição em me ajudar em experimentos essenciais no desenvolvimento da tese. Muito obrigado pelo apoio, ele foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Aline e Paulo pelo apoio, atenção e ajuda em diversos momentos dentro e fora da vida acadêmica. Muito obrigado e me sinto honrado em ter a amizade de vocês.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão durante toda a minha formação acadêmica.

À minha mãe Neuza por todo o suporte, amor e carinho que proporcionou durante toda a minha vida. Obrigado pelo apoio, força, paciência e compreensão durante a minha formação acadêmica e também durante muitas outras situações em que passamos. Seu apoio foi e continua sendo vital para todas as minhas decisões e escolhas.

RESUMO

O conceito de imunidade treinada se baseia em uma resposta aprimorada e não específica contra um estímulo após a exposição primária a certos componentes microbianos ou não microbianos, que resulta na reprogramação epigenética e metabólica na célula treinada. Os mecanismos de imunidade treinada foram elucidados em células imunes inatas clássicas, mas o estudo desse evento em células sinoviais residentes e como isso poderia ser responsável pelo aumento da inflamação articular ainda são escassos. Utilizamos um modelo artrite de dupla estimulação, sendo o LPS como estímulo inflamatório primário e a infecção por *Staphylococcus aureus* como estímulo secundário e analisamos se sinoviócitos desenvolveriam o fenótipo de imunidade treinada e suas consequências para o agravamento da artrite. Nossos resultados mostram que a dupla estimulação (LPS + *S. aureus*) aumenta os marcadores de inflamação nas populações de sinoviócitos e promove dano tecidual e aumento da resposta nociceptiva quando comparado aos camundongos que recebem injeção única de *S. aureus*. Entretanto, o aumento da inflamação não resultou no *clearance* do *S. aureus*. O duplo estímulo LPS - *S. aureus* aumentou a população de macrófagos sinoviais, incluindo uma população mais específica que expressa CX3CR1, que por sua vez apresentou aumento dos principais componentes da via de sinalização intracelular do mTOR (p-mTOR e HIF1 α) e do marcador epigenético de metilação da histona H3. De maneira importante, o tratamento com inibidor de mTOR, Rapamicina, causou uma redução do fenótipo da imunidade treinada, com redução da inflamação articular e do dano ósseo. Em conclusão, o fenótipo de imunidade treinada apresentado em macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ sugere uma possibilidade de explicar o que acontece com as células sinoviais durante a infecção por *S. aureus*, que parece ser responsável pela inflamação e dano tecidual exacerbado pelo *S. aureus*.

PALAVRAS CHAVES: Imunidade Treinada; Artrite infecciosa; *S. aureus*; Inflamação.

ABSTRACT

The concept of trained immunity is based on an enhanced, non-specific response against a stimulus after primary exposure to certain microbial and non-microbial components, which results in epigenetic and metabolic reprogramming in the trained cell. The trained immunity mechanisms have been elucidated on classical innate immune cells, but the study of this event in resident synovial cells and how it could be responsible for the increase in joint inflammation is still scarce. We used a dual stimulation model, with LPS as the primary inflammatory stimulus and the induction of inflammatory arthritis by *S. aureus* as the secondary stimulus, and analyzed whether and which synoviocytes would develop a trained immunity phenotype that could result in increased joint inflammation after secondary joint infection. Our results show that double stimulation (LPS – *S. aureus*) increases inflammation markers in synoviocyte populations and promotes tissue damage and increased nociceptive response when compared to mice receiving a single injection of *S. aureus*. However, increased inflammation did not result in *S. aureus* clearance. LPS - *S. aureus* group increased the population of synovial macrophages, including a more specific population of CX3CR1⁺, showed an increased component of the mTOR pathway (p-mTOR and HIF1 α) and the epigenetic marker H3K4me3. Treatment with mTOR inhibitor promoted a reduction in trained immunity phenotype, with a reduction in joint inflammation and bone damage. In conclusion, the trained immunity phenotype presented in CX3CR1⁺ synovial macrophages suggest a possibility to explain what happens to synovial cells during *S. aureus* infection, which seems to be responsible for inflammation and increased tissue damage by *S. aureus*.

KEYWORDS: Trained Immunity; Infectious Arthritis; *S. aureus*; Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: trifosfato de adenosina

IL-X: interleucina

NF- κ B: fator nuclear κ B

PBS: salina tamponada com fosfato

ROS: espécies reativas de oxigênio

RPMI: meio do Instituto Roswell Park Memorial

TNF: fator de necrose tumoral

BCG: *Bacillus Calmette Guerin*

OX-LDL: LDL oxidado

LPS: lipopolissacarídeo

TLR2 e 4: receptor do tipo Toll 2 e 4

HSPC: célula hematopoiética e progenitora

MSCRAMM: *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* - Componentes da Superfície Microbiana Reconhecedores de Moléculas Adesivas da Matriz
S. aureus: *Staphylococcus aureus*

PRR: receptor de reconhecimento de patógeno

PAMP: padrão molecular associado a patógeno

NET: armadilhas extracelulares de neutrófilos

FPR2: receptor de peptídeos formilados

GPCR: receptor acoplado à proteína G

H3K4me3: trimetilação da lisina 4 da histona H3

H3K27ac: acetilação da lisina 27 da histona H3

OXPHOS: fosforilação oxidativa

FAO: oxidação de ácidos graxos

mTOR: alvo mamífero da Rapamicina

HIF1 α : Fator 1^a indutor de hipoxia

YY1: proteína repressora transcricional

PCG1 α : co-ativador do receptor proliferador de peroxissoma - γ 1- α

***Vangl2* e *Fat4*:** genes de polaridade celular

MHCII: complexo principal de histocompatibilidade classe 2

MyD88 (gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88),

TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR, semelhante a adaptador MyD88)

TRIF (adaptador contendo domínio TIR induzindo do IFN- β)

IRAK-4 (quinase-4 associada ao receptor IL-1)

TRAF6 (fator 6 associado ao receptor TNF)

TAK1 (transformador da quinase ativada por fator de crescimento 1 β)

IKK (I κ B quinase)

MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno)

Trx (Trithorax)

PcG (Polycomb)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
1.1 IMUNIDADE TREINADA	13
FIGURA 1: PANORAMA GERAL DA IMUNIDADE TREINADA.....	14
FIGURA 2: DESENHO ESQUEMÁTICO DA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MEDIADA POR LPS.	16
1.1.2 REPROGRAMAÇÃO EPIGENÉTICA E SUA RELAÇÃO COM A IMUNIDADE TREINADA	17
FIGURA 3: DESENHO ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE REMODELAÇÃO DA CROMATINA DURANTE O PROCESSO DE TREINAMENTO IMUNOLÓGICO DE CÉLULAS IMUNE INATAS.....	18
1.1.3 ALTERAÇÕES METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA IMUNIDADE TREINADA	19
FIGURA 4: DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS PROMOVIDAS PELO TREINAMENTO IMUNOLÓGICO EM CÉLULAS IMUNE-INATAS.....	20
1.2 ARTICULAÇÃO SINOVIAL.....	22
FIGURA 5: DESENHO ESQUEMÁTICO DA ARQUITETURA DA CAVIDADE SINOVIAL.....	24
FIGURA 6: DESENHO ESQUEMÁTICO DA DINÂMICA DAS POPULAÇÕES DE MACRÓFAGOS SINOVIAIS NO TECIDO SINOVIAL.	26
1.3 ARTRITE INFECCIOSA INDUZIDA POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>.....	27
FIGURA 7: DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ROTAS DE INFECÇÃO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO NO DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE INFECCIOSA CAUSADA PELO <i>S. AUREUS</i>.	29
1.4 JUSTIFICATIVA	30
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAL E METODOS.....	32
3.1 ANIMAIS	32
3.2 MODELO DE INDUÇÃO DE IMUNIDADE TREINADA <i>IN VIVO</i> E INFECÇÃO POR <i>S. AUREUS</i>	32
3.3 TRATAMENTO COM RAPAMICINA	32
3.4 MEDIDA DE NOCICEPÇÃO MECÂNICA	33
3.5 HISTOLOGIA, IMUNOHISTOQUÍMICA E COLORAÇÃO TRAP	33
3.6 ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS SINOVIAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO	34

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<u>4. RESULTADOS</u>	<u>37</u>
4.1 A INFLAMAÇÃO ARTICULAR PRÉVIA AGRAVA A INFLAMAÇÃO TECIDUAL LOCAL APÓS A INFECCÃO POR <i>S. AUREUS</i>	37
FIGURA 8: A INFLAMAÇÃO ARTICULAR PRÉVIA PROMOVE AUMENTO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR APÓS A INFECCÃO COM <i>S. AUREUS</i>.	38
FIGURA 9: A INFLAMAÇÃO ARTICULAR PRÉVIA PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO DE GENES INFLAMATÓRIOS APÓS A INFECCÃO COM <i>S. AUREUS</i>.	39
FIGURA 10: O DUPLO ESTÍMULO ARTICULAR PROMOVE AUMENTO DOS MARCADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS NA POPULAÇÃO DE FIBROBLASTOS SINOVIAIS.	40
FIGURA 11: ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA CAVIDADE SINOVIAL PROMOVIDAS PELA INFECCÃO POR <i>S. AUREUS</i>.	42
FIGURA 12: O DUPLO ESTÍMULO LPS + <i>S. AUREUS</i> INDUZ MAIOR DANO ÓSSEO, MAIOR PRESENÇA DE OSTEOCLASTOS E MAIOR QUANTIDADE DE MACRÓFAGOS EXPRESSANDO RANKL	43
FIGURA 13: A DUPLA ESTIMULAÇÃO LPS + <i>S. AUREUS</i> MANTÉM MAIOR RESPOSTA NOCICEPTIVA.	44
FIGURA 14: A DUPLA ESTIMULAÇÃO LPS + <i>S. AUREUS</i> NÃO CONTRIBUI NA ELIMINAÇÃO DE <i>S. AUREUS</i>.	45
FIGURA 15: A INFLAMAÇÃO PRÉVIA COM O LIGANTE CX3CL1 NÃO PROMOVE ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS NA INFLAMAÇÃO APÓS A INFECCÃO POR <i>S. AUREUS</i>.	47
4.2 INFLAMAÇÃO ARTICULAR PRÉVIA PROMOVE IMUNIDADE TREINADA EM MACRÓFAGOS SINOVIAIS CX3CR1⁺	48
FIGURA 16: A INFLAMAÇÃO ARTICULAR PRÉVIA PROMOVE IMUNIDADE TREINADA EM MACRÓFAGOS SINOVIAIS CX3CR1⁺	49
FIGURA 17: MACRÓFAGOS SINOVIAIS CX3CR1⁺ TREINADOS APRESENTAM AUMENTO NA EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA GLICOLÍTICA E DO MARCADOR EPIGENÉTICO H3K4ME3.	51
4.3 A INIBIÇÃO DA VIA DE mTOR REDUZ A INFLAMAÇÃO PROVENIENTE DA DUPLA ESTIMULAÇÃO	52
FIGURA 18: A INIBIÇÃO DA VIA DE mTOR PROMOVE DIMINUIÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM MACRÓFAGOS SINOVIAIS CX3CR1⁺	53
FIGURA 19: A INIBIÇÃO DA VIA DO mTOR PROMOVE DIMINUIÇÃO DO DANO ÓSSEO APÓS A INFECCÃO POR <i>S. AUREUS</i>.	54
<u>5. DISCUSSÃO</u>	<u>55</u>

6. CONCLUSÃO	60
---------------------------	-----------

FIGURA 20: RESUMO DO PROCESSO DA IMUNIDADE TREINADA NA ARTICULAÇÃO SINOVIAL.....	60
---	-----------

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
--	-----------

8. ANEXOS	75
------------------------	-----------

CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA)	75
--	-----------

FIGURA 2: ESTRATÉGIA DE “GATTING” DA FIGURA 10	77
---	-----------

FIGURA 3: ESTRATÉGIA DE “GATTING” DA FIGURA 16	78
---	-----------

FIGURA 4: ESTRATÉGIA DE “GATTING” DA FIGURA 17	79
---	-----------

FIGURA 5: ESTRATÉGIA DE “GATTING” DA FIGURA 18	80
---	-----------

1.INTRODUÇÃO

1.1 Imunidade treinada

A imunidade treinada descreve o processo imunológico pelo qual as células imunes inatas adquirem uma memória imunológica após a exposição primária de certos estímulos. Com isso, as células imunes inatas ajustam a sua resposta aos estímulos subsequentes, resultando em uma resposta aprimorada contra agentes infecciosos (Netea et al., 2011; Hajishengallis et al., 2023; M. M. Jeljeli & Adamopoulos, 2023; Ochando et al., 2023) (**Figura 1**). Este conceito foi inicialmente demonstrado em 2012 através dos efeitos protetores não específicos da vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Através da vacinação de indivíduos saudáveis, foram isolados monócitos circulantes e em seguida infectados com *Candida albicans*. Em resposta a infecção, houve aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF e IL-1 β , e aumento da expressão de marcadores de ativação, como CD11b e receptor Toll-like 4. Além disso, a vacinação com BCG induziu proteção independente da resposta de células T e B em camundongos SCID (camundongos imunodeficientes em células T e B) e protegeu contra a infecção sistêmica por *Candida albicans* (100% de sobrevivência em camundongos vacinados com BCG vs. 30% em camundongos controle). Esses efeitos do treinamento foram induzidos através do receptor NOD2 e mediados pelo aumento da trimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3) (Kleinnijenhuis et al., 2012).

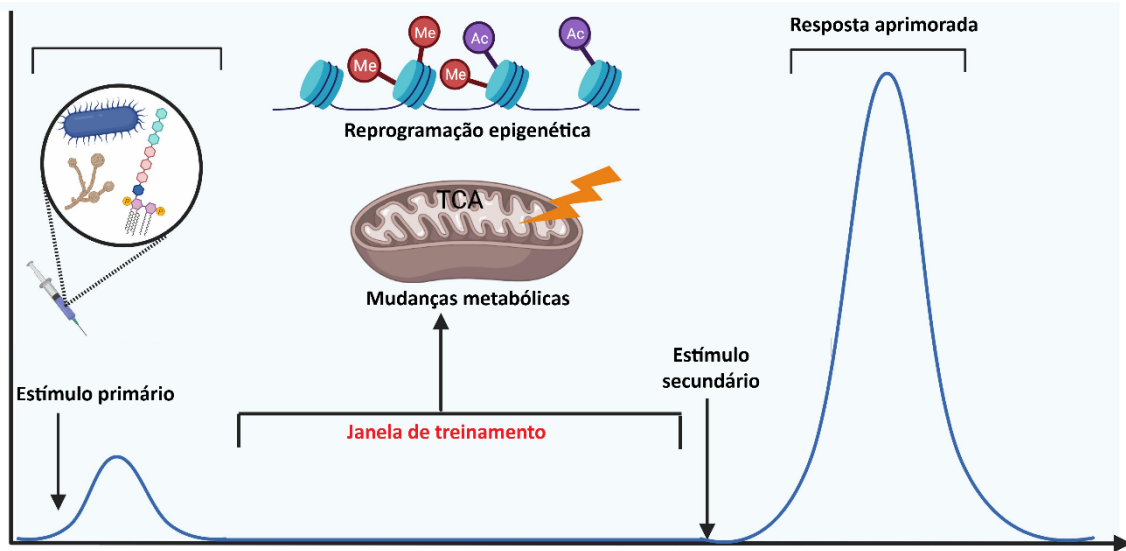


Figura 1: Panorama geral da imunidade treinada.

Estímulos primários, como β -glucano, LPS e ox-LDL são capazes de se ligar a receptores de reconhecimento de padrões moleculares e induzem alterações metabólicas e epigenéticas duráveis em células imunes inatas. A reprogramação epigenética da célula permite a rápida acessibilidade dos fatores de transcrição às regiões promotoras e potencializadoras de genes pró-inflamatórios após a reestimulação, facilitando a expressão gênica. O aumento da atividade metabólica da célula proporciona rápido fornecimento de energia e metabólitos necessários para montar uma resposta imune robusta. Após o estímulo secundário, com a combinação dos efeitos epigenéticos e metabólicos promovidos pela estimulação primária, ocorre uma maior responsividade à uma estimulação secundária com o mesmo ligante ou um ligante diferente e pode até mesmo proteger contra uma infecção subsequente (Adaptado de Joseph, 2022).

A indução da imunidade treinada é baseada em dois pontos principais: a reprogramação epigenética e alterações metabólicas de células imunes inatas. Após a estimulação com certos ligantes, como β -glucanos (Ciarlo et al., 2020; Dominguez-Andres & Netea, 2019; Keating et al., 2007), ox-LDL (Christ et al., 2018) e LPS (lipopolissacarídeo) (de Laval et al., 2020; Owen et al., 2022), essas células imunes sofrem mudanças de reprogramação funcional que permitem maior capacidade de resposta sob estimulação subsequente (Arts et al., 2016; de Laval et al., 2020; Netea et al., 2011; Saeed et al., 2014).

O LPS é um potente estimulador da imunidade inata do hospedeiro e seu reconhecimento por células hospedeiras ocorre através dos receptores TLR4 (*toll like receptor* 4) (Lu et al., 2008). O TLR4 é um tipo de receptor expresso por células do sistema imunológico inato que pode ser estimulado por moléculas presentes bactérias, vírus e fungos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Akira et al., 2006; Janeway & Medzhitov, 2002). O eixo LPS – TLR4 sofre oligomerização e recruta seus adaptadores através de interações com os domínios TIR (receptor Toll-interleucina-1). Os domínios TIR contêm três regiões altamente conservadas, que medeiam as interações proteína-proteína entre o TLR4 e as proteínas adaptadoras de transdução de sinal. Existem cinco proteínas adaptadoras contendo domínio TIR: MyD88 (gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88), TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR, semelhante ao adaptador MyD88) e TRIF (adaptador contendo domínio TIR induzido do IFN- β) (O'Neill & Bowie, 2007). Consequentemente, o MyD88 recruta e ativa a proteína quinase IRAK-4 (quinase-4 associada ao receptor IL-1), que medeia a transmissão de sinais e a indução de citocinas pró-inflamatórias, além de desempenhar um papel na estabilidade do mRNA de certas citocinas e quimiocinas, como TNF α e CXCL1 (Kim et al., 2007). Após a ativação de IRAK-4, ocorre a ativação de TRAF6 (fator 6 associado ao receptor TNF), que por sua vez, ativa TAK1 (transformador da quinase ativada por fator de crescimento 1 β) que desempenha a ativação das proteínas IKK (I κ B quinase) e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (Gohda et al., 2004; Keating et al., 2007; Kim et al., 2007). Essas proteínas, por sua vez, promovem a ativação e translocação do fator de transcrição NF- κ B, que exerce importante controle da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como as citocinas IL-6 e IL-1 β (Page et al., 2022; Park et al., 2009; Tan & Kagan, 2014) (**Figura 2**). Como exemplo, a estimulação de monócitos e macrófagos com LPS induz a imunidade treinada, provocando reprogramação epigenética duradoura nos promotores de genes inflamatórios e mudanças metabólicas significativas, além de promover o aumento da resposta inflamatória após a segunda estimulação (M. Jeljeli et al., 2019; Lundahl et al., 2022; Owen et al., 2022).

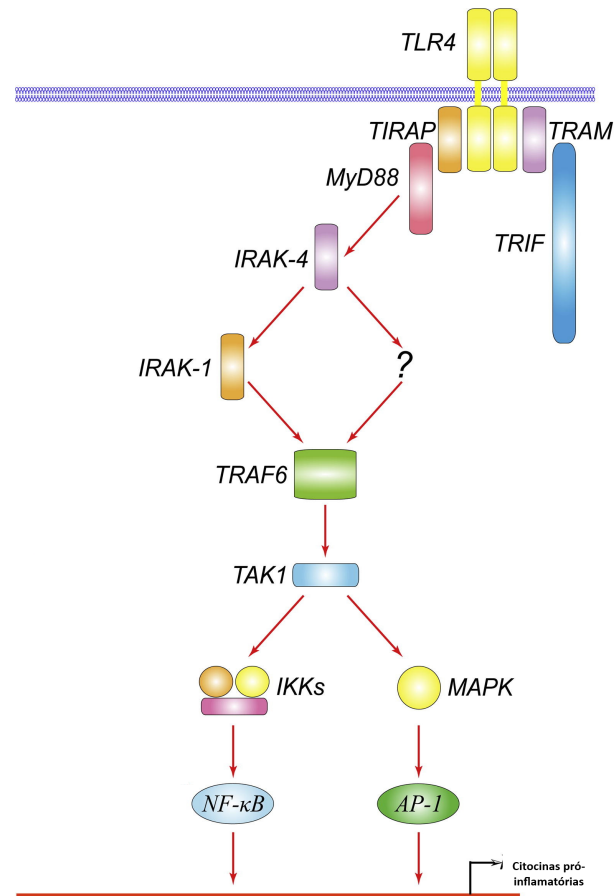


Figura 2: Desenho esquemático da sinalização intracelular mediada por LPS.

O eixo LPS - TLR4 ativa a via dependente de MyD88, que por sua vez promove o recrutamento e ativação das proteínas IRAKs/TRAF6, bem como o fator de transcrição NF-κB. Esse fator de transcrição induz a expressão de genes que transcrevem citocinas pró-inflamatórias (Adaptado de Lu et al., 2008).

1.1.2 Reprogramação epigenética e sua relação com a imunidade treinada

O genoma humano contém ~3 bilhões de pares de bases (pb), dividido em 46 cromossomos em células diploides que ocupam territórios discretos no núcleo. Dentro desses territórios, ~147 pb de DNA cromossômico são enrolados em torno de octâmeros de histonas que consistem em dois dímeros de variantes de histona H3-H4 e H2A-H2B. Essas histonas ligadas ao DNA, ou nucleossomas, podem ser reconhecidas por proteínas que abrigam domínios de ligação à histona que podem “ler”, “escrever” ou “apagar” marcadores epigenéticos nas caudas que se estendem para fora dos octâmeros das histonas (Zhang et al., 2015).

A estimulação de células imunes inatas envolve a ativação de diversas vias intracelulares que resultam na regulação da transcrição de genes pró-inflamatórios e na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Liu et al., 2017). Para isso, a maquinaria celular deve ser capaz de acessar regiões do genoma que contêm os elementos reguladores dos genes envolvidos nesses processos. Isso é orquestrado através de várias modificações epigenéticas estáveis e duráveis, que desdobram a cromatina e expõem regiões promotoras e potenciadoras que regulam os genes relacionados a resposta imune, tornando-os acessíveis aos fatores de transcrição (Klemm et al., 2019). Dois grupos de proteínas catalisam as modificações epigenéticas na cromatina, que são as proteínas do grupo Trithorax (Trx) e Polycomb (PcG). Especificamente, o complexo Trx catalisa a deposição da trimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3), que é uma marca de cromatina promotora ativa. Em contraste, as proteínas PcG catalisam a metilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me1), que induz o silenciamento de genes (Geisler & Paro, 2015).

A imunidade aumentada observada em monócitos treinados é acompanhada pelo acúmulo estável de marcadores epigenéticos em dezenas de genes imune-inatos e de elementos potenciadores. Especificamente, há o acúmulo do marcador H3K4me3 nos promotores de genes imunes e a alteração dos marcadores epigenéticos H3K4me1 e H3K27Ac nos potenciadores (Novakovic et al., 2016; Quintin et al., 2012). Os níveis de H3K4me3 estão diretamente correlacionados à robustez transcricional, com níveis mais altos do promotor H3K4me3 associados a fortes respostas transcricionais que são uniformes entre as populações celulares (Lauberth et al., 2013). O treinamento de células com β -glucano promove a reprogramação epigenética com a deposição do marcador H3K4me3, que, por sua vez, medeia a transcrição de genes de forma mais forte e robusta (Quintin et al., 2012) (**Figura 3**).

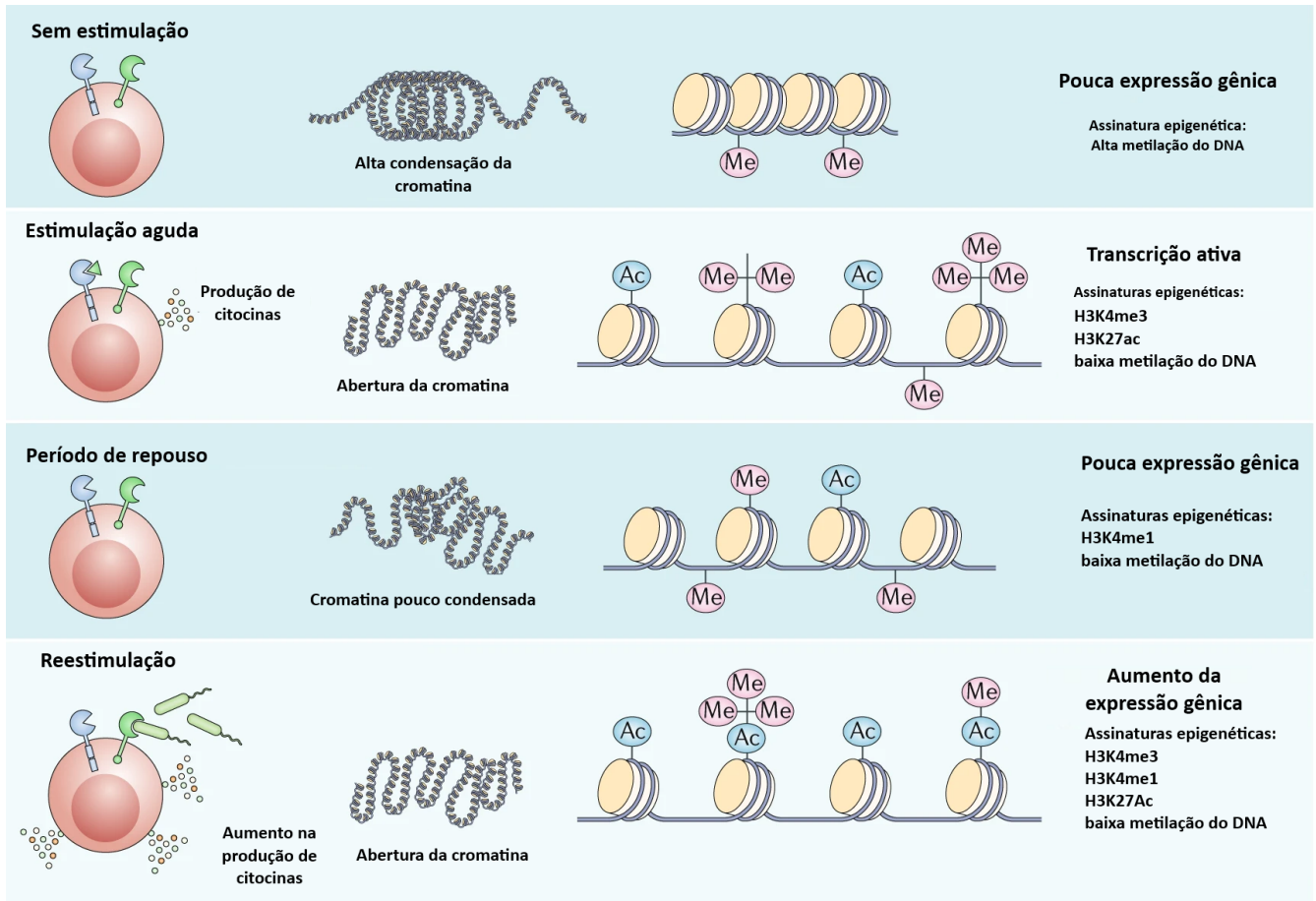


Figura 3: Desenho esquemático do processo de remodelação da cromatina durante o processo de treinamento imunológico de células imunes inatas.

As células imunes inatas em estado estacionário possuem alta condensação da cromatina, com pouca expressão gênica e altos níveis de metilação do DNA. Diante de um estímulo primário agudo, ocorre a abertura da cromatina devido à deposição de marcadores epigenéticos, como a trimetilação da lisina 4 (H3K4me3) e acetilação da lisina 27 (H3K27ac) da histona H3. Após o período de resolução da inflamação, as células imunes inatas treinadas entram em um estado de repouso, com a cromatina pouco condensada e com a deposição do marcador epigenético H3K4me1. Durante a reestimulação, o processo inflamatório promove a abertura da cromatina, com a deposição dos marcadores H3K4me3, H3K27ac e H3K4me1, que resulta no aumento da expressão gênica e produção de citocinas pro-inflamatórias (Adaptado de Netea et al., 2020).

1.1.3 Alterações metabólicas envolvidas na imunidade treinada

As células imunes em estado estacionário possuem baixa atividade biossintética e suas necessidades energéticas são predominantemente atendidas por meio da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e da oxidação de ácidos graxos (FAO). Após a ativação celular, a demanda energética das células imunes inatas promove o aumento da glicólise aeróbica, da glutaminólise, do metabolismo do colesterol e da síntese de ácidos graxos. Intermediários metabólicos, como acetil-CoA, fumarato, succinato, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e mevalonato são produzidos como resultado das alterações metabólicas e servem como substratos para a regulação epigenética (Dai et al., 2020; Fanucchi et al., 2021).

O treinamento imunológico promove alterações metabólicas em macrófagos treinados, o que inclui o aumento na glicólise aeróbica em comparação a macrófagos não treinados, que é dependente da ativação do alvo mamífero da rapamicina (mTOR) através da via de sinalização Akt-HIF-1 α (Cheng et al., 2014; Horng, 2015; Tannahill et al., 2013). O mTOR detecta níveis celulares de nutrientes, oxigênio e energia e, em seguida, ativa reguladores transcricionais (HIF1 α , proteína repressora transcricional YY1 e co-ativador do receptor proliferador de peroxissoma γ 1- α (PCG1 α)), que estimulam a glicólise e o metabolismo oxidativo mitocondrial (Cheng et al., 2014; Laplante & Sabatini, 2012; Nagao et al., 2019; Tannahill et al., 2013; YANG et al., 2021) (**Figura 4**).

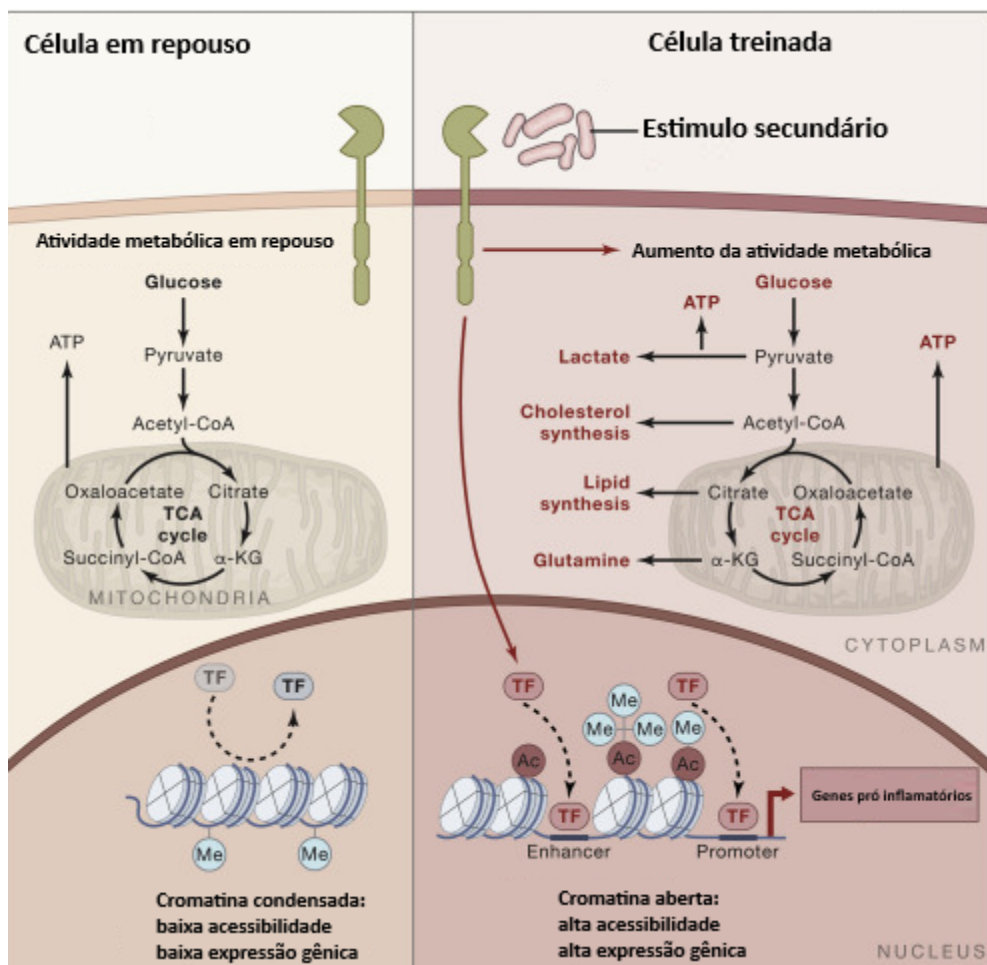


Figura 4: Desenho esquemático das alterações metabólicas promovidas pelo treinamento imunológico em células imune-inatas.

As células imune-inatas em estado de repouso apresentam baixa atividade metabólica, com maior atividade da fosforilação oxidativa para obtenção de energia. Além disso, essas células apresentam cromatina condensada e baixa expressão gênica. As células treinadas, diante de um estímulo secundário, desencadeiam uma série de sinalizações intracelulares que levam ao aumento da atividade de diferentes vias metabólicas, como a glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e o metabolismo de ácidos graxos. Essa condição proporciona a abertura da cromatina e aumento da expressão gênica, resultando na transcrição de genes que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias (Adaptado de Netea et al., 2020).

Diferentes trabalhos mostram a importante conexão entre a indução de imunidade treinada e as consequentes alterações no metabolismo celular. Em um modelo experimental de imunidade treinada induzida por β -glucano, monócitos treinados com β -glucano e reestimulados com diferentes estímulos secundários (LPS, Pam3Cys, *S. aureus* e *E. coli*) apresentaram alto consumo de glicose, alta produção de lactato e alta concentração de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+). As alterações observadas foram devidas ao aumento na via da glicólise que é dependente da ativação do alvo mamífero da rapamicina (mTOR) através da via de sinalização dectina-1-AKT-mTOR-HIF1 α (fator induzível por hipóxia-1 α). A inibição de AKT, mTOR ou HIF-1 α , com diferentes inibidores, bloqueou os efeitos de monócitos treinados. Além disso, camundongos deficientes na produção de HIF1 α foram incapazes de montar imunidade treinada em um modelo de sepse bacteriana (Cheng et al., 2014).

Outro trabalho mostrou que a indução de imunidade treinada por BCG associado à lipoproteína bacteriana (BLP) protegeu camundongos neonatais contra a sepse polimicrobiana induzida por peritonite fecal, e essa proteção estava associada ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias circulantes, aumento do recrutamento de neutrófilos e eliminação bacteriana acelerada. A estimulação *in vitro* de macrófagos murinos neonatais com o duplo estímulo BCG+BLP promoveu aumento da resposta inflamatória e da atividade antimicrobiana. Notavelmente, a estimulação BCG+BLP resultou em modificações epigenéticas caracterizadas pelo aumento de H3K4me3 e H3K27Ac nos promotores dos genes inflamatórios e aumento da glicólise, que por sua vez é necessário para a subsequente reprogramação epigenética (Zhou et al., 2022).

Estudos sobre imunidade treinada são comumente centrados na exposição sistêmica de componentes que promovem o treinamento celular via medula óssea e na circulação sanguínea por meio da vacinação ou por estímulos infecciosos. Em contrapartida, estudos relatam que a indução de imunidade treinada pode ser independente de uma estimulação sistêmica e se desenvolver em células residentes via inflamação local. No pulmão, a vacinação subcutânea com BCG induziu imunidade treinada em macrófagos alveolares residentes no pulmão e foi independente da presença de monócitos circulantes. O processo de treinamento foi dependente de alterações no eixo intestino-pulmão, que incluiu a translocação micobacteriana, aumento da disbiose e permeabilidade intestinal e alterações nos metabólitos locais e sistêmicos. Após 5 semanas do treinamento, essas células foram reestimuladas com *M. tuberculosis* e observado aumento da inflamação e alterações metabólicas que sustentaram o perfil inflamatório alterado (Jeyanathan et al., 2022). Em outro estudo, a indução de treinamento por infecção via

subcutânea com *S. aureus* promoveu modificações em macrófagos dérmicos residentes de maneira independentemente dos monócitos oriundos da medula óssea, levando a um aumento da resistência diante a uma segunda infecção com o mesmo ou diferentes patógenos (Feuerstein et al., 2020).

Entretanto, estudos com doenças que acometem as articulações e promovem uma inflamação acentuada e persistente, como no caso das artrites, ainda são escassos. Apesar disso, o entendimento dos mecanismos que levam a persistência de uma resposta inflamatória que acomete as articulações ainda não são claras. Assim, é importante avaliar se uma inflamação prévia de uma articulação pode promover alterações em células residentes e seus efeitos diante de um segundo estímulo. Nesse sentido, estudos mostram que a resposta inflamatória envolvida durante uma infecção nas articulações, denominada artrite infecciosa, ocorre de maneira mais exacerbada em pacientes que sofrem de alguma doença reumática, como artrite reumatóide e osteoartrite (Favero et al., 2008; Goldenberg, 1989). Porém, ainda não é claro se esse efeito está relacionado com o desenvolvimento de imunidade treinada em células que compõem o tecido articular ou se é devido a outros fatores, como a idade dos pacientes ou maior uso de procedimentos articulares, como farmacológicos ou cirúrgicos.

1.2 Articulação sinovial

As articulações sinoviais são conexões móveis e conservadas entre elementos esqueléticos cobertos de cartilagem que permitem a locomoção. A presença de uma cápsula fibrosa externa atua como proteção estrutural e mecânica, enquanto a presença de um tecido sinovial especializado forma uma camada interna adicional dentro dessa cápsula e isola completamente o espaço articular preenchido por líquido e a cavidade sinovial do ambiente exterior. O líquido sinovial (líquido viscoso rico em ácido hialurônico e outros glicosaminoglicanos) preenche o espaço articular e fornece nutrição, lubrificação e proteção contra choques mecânicos (Culemann et al., 2019).

A parte interna da cápsula articular abriga o tecido sinovial, uma estrutura organizada rica em células, inervação, vasos sanguíneos e linfáticos que desempenham papel fundamental na homeostase da articulação sinovial (N. Li et al., 2020; Pacifici et al., 2005) (**Figura 5**). Entretanto, essas células residentes denominadas sinoviócitos são altamente responsivas a estímulos endógenos e exógenos, com participação direta na inflamação articular, na dor e na perda da integridade das estruturas circunvizinhas, como cartilagem e ossos (N. Li et al., 2020; Pacifici et al., 2005). Este tecido é composto por duas camadas: uma camada íntima constituída

por macrófagos e fibroblastos sinoviais de revestimento e outra camada sub-íntima intersticial, composta por macrófagos e fibroblastos sinoviais intersticiais, adipócitos e uma grande rede de vasos sanguíneos e linfáticos. Embora outras células imunes, como linfócitos e mastócitos, possam ser encontradas dentro do tecido sinovial intersticial, os macrófagos são o tipo celular mais abundante (Orr et al., 2017).

As articulações sinoviais apresentam mudanças em sua microarquitetura imunológica e composição celular diante de uma inflamação. Em pacientes com artrite reumatoide (AR) ocorre a expansão da população de fibroblastos sinoviais ativados e a proliferação de macrófagos sinoviais. Estes, por sua vez, medeiam a invasão e a destruição da cartilagem e do osso articular através da produção de variados agentes, como diferentes metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias (Croft et al., 2019; McInnes & Schett, 2017). Ainda, participam diretamente da diferenciação de osteoclastos, que estão envolvidos no processo de reabsorção óssea, mediado pela expressão de RANKL. Esse processo é acentuado pela produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a IL-17 (Maruotti et al., 2011).

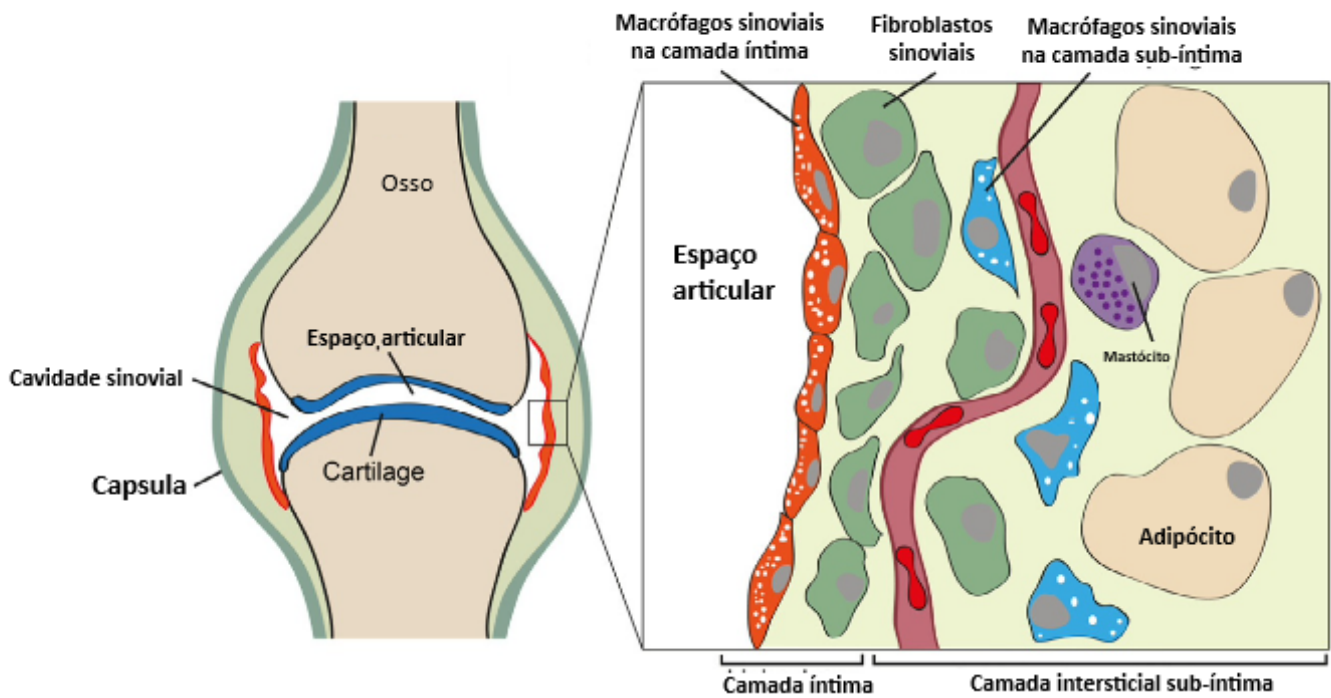


Figura 5: Desenho esquemático da arquitetura da cavidade sinovial.

A articulação tibiofemoral é constituída por uma cápsula fibrosa externa serve como proteção estrutural e mecânica, enquanto o tecido sinovial forma uma camada interna adicional dentro da cápsula e isola completamente o espaço articular (que é preenchido por líquido) e a cavidade sinovial do exterior. Este tecido sinovial pode ser subdividido em uma camada de revestimento sinovial íntimo, composto por macrófagos e fibroblastos de revestimento sinovial e camada sinovial intersticial sub-íntima, que abriga os macrófagos e fibroblastos intersticiais, adipócitos e uma grande rede de vasos sanguíneos e linfáticos (Adaptado de Culemann, 2019).

Os macrófagos sinoviais presentes na camada íntima expressam o receptor de quimiocinas CX3CR1, receptor comumente encontrado em fagócitos mononucleares e seus precursores (Culemann et al., 2019). Sua função está relacionada com a formação de uma barreira imunológica interna do revestimento sinovial que isola fisicamente a articulação (Culemann et al., 2019). Esses macrófagos apresentam características típicas de células epiteliais, incluindo a expressão de *tight junctions* e desmossomos definidos, juntamente com genes de polaridade celular como *Vangl2* e *Fat4*, tendo como objetivo de formar uma barreira que isola as estruturas articulares internas do exterior e pode, adicionalmente, controlar a tonicidade e a composição molecular do líquido sinovial (Culemann et al., 2019). A população de macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ são constantemente reabastecidos a partir de um pool de macrófagos intersticiais residentes que expressam MHCII⁺ e que são CX3CR1 negativos (Culemann et al., 2019) (**Figura 6**).

O papel protetor dos macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ é descrito como importante no controle da inflamação articular. Foi demonstrado que a indução da destruição das *tight junctions* por complexos imunes contendo autoanticorpos ativa esses macrófagos sinoviais e resultaram no influxo espontâneo de células mieloides inflamatórias nas estruturas articulares internas. Ainda, a depleção desses macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ ou a ruptura forçada dessas *tight junctions* também resultou na perda da função de barreira, promovendo o desenvolvimento de inflamação articular e início precoce e exacerbado da artrite experimental em modelo de transferência de soro (K/BxN) (Culemann et al., 2019). Diante do importante papel dos sinoviócitos no processo inflamatório, avaliamos se essas células são permissíveis a modificações promovidas pelo treinamento imunológico e as consequências promovidas pela indução de uma artrite infecciosa por *S. aureus*.

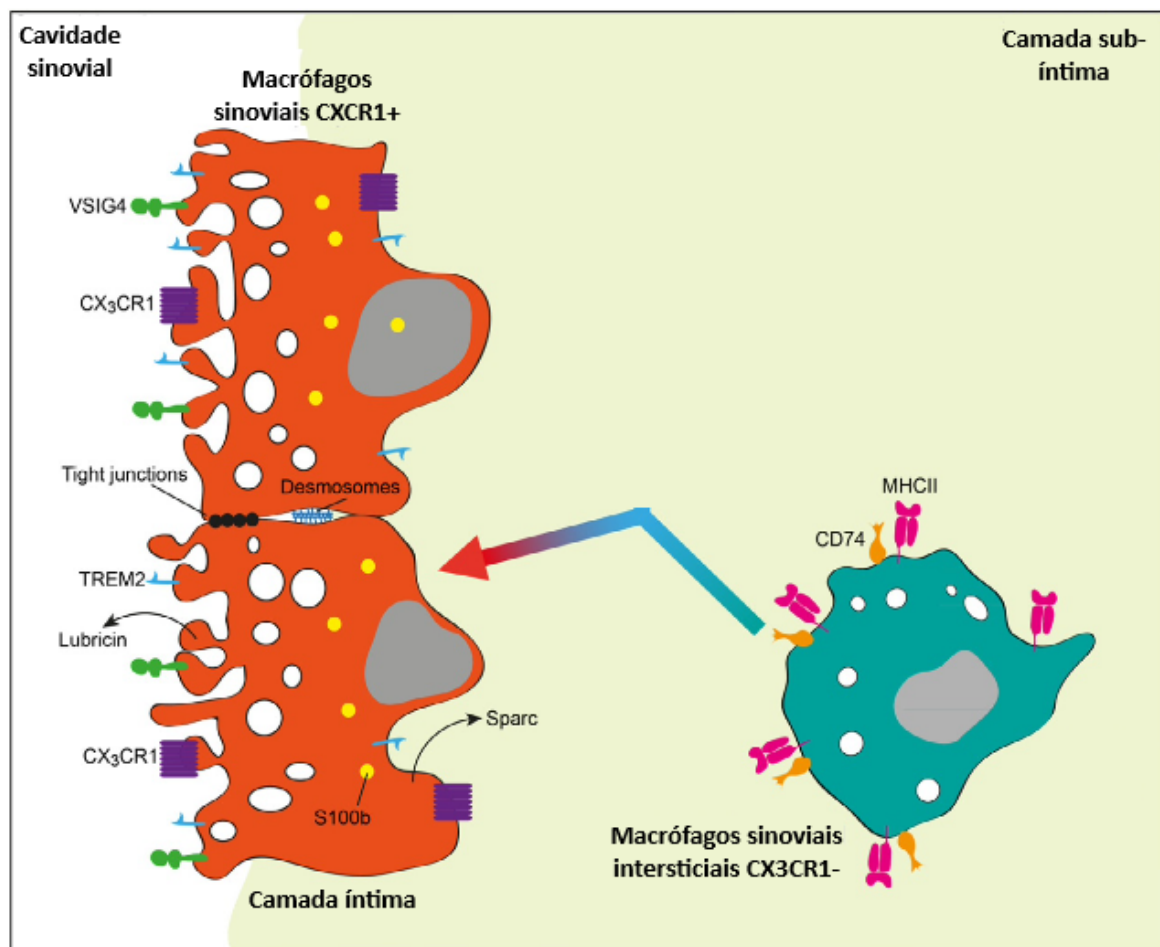


Figura 6: Desenho esquemático da dinâmica das populações de macrófagos sinoviais no tecido sinovial.

Os macrófagos sinoviais que expressam CX3CR1 contidos na camada íntima do tecido sinovial exibem características típicas de células epiteliais, como a expressão de *tight junctions* e desmossomos, formando uma barreira que isola as estruturas articulares internas, além de controlar a tonicidade e a composição molecular do líquido sinovial. Os macrófagos sinoviais intersticiais contidos na camada sub-íntima do tecido sinovial formam uma população homogênea que serve como fonte de reabastecimento dos macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ (Adaptado de Culeman et al., 2019).

1.3 Artrite infecciosa induzida por *Staphylococcus aureus*

A artrite infecciosa é um distúrbio inflamatório causado por agentes infecciosos, como bactérias, vírus, fungos e protozoários, que afeta principalmente as articulações sinoviais (Dunlop et al., 2003; Firestein & McInnes, 2017). O agente infeccioso mais comumente encontrado e estudado na artrite séptica é a bactéria gram positiva *S. aureus*, uma espécie constituinte da microbiota da pele humana e frequentemente causadora de doenças (Jung et al., 2018; Kennedy et al., 2015; McBride et al., 2020; Ross, 2017). As principais causas de infecção por *S. aureus* consistem em rupturas na pele ou nas mucosas, mordidas de animais e uso errôneo de medicamentos injetáveis que permite o acesso do *S. aureus* presente na pele à corrente sanguínea (Boff, Crijns, et al., 2018; Ross, 2017).

A incidência anual da artrite infecciosa varia de 1 a 35 casos por 100.000 indivíduos em diferentes países (Cohen et al., 2020; He et al., 2023; Holzmeister et al., 2021; Montgomery & Epps, 2017; Nossent et al., 2021; Okubo et al., 2017; Safdieh et al., 2019; Welling et al., 2018) tendo os Estados Unidos com uma taxa de 4 a 10 casos por 100.000 indivíduos (Erkilinc et al., 2021; Montgomery & Epps, 2017; Okubo et al., 2017; Swarup et al., 2020). A incidência da artrite infecciosa em grandes articulações é maior do que em pequenas articulações (Ilharreborde, 2015; Mathews et al., 2010) e com maior incidência em crianças e idosos (Donders et al., 2022; Erkilinc et al., 2021; Montgomery & Epps, 2017). Além disso, indivíduos cujo sistema imunológico comprometido por doenças debilitantes, como HIV/AIDS, e pacientes com quimioterapia, doenças e procedimentos prévios, como diabetes mellitus, artrite reumatoide, cirurgia articular recente, injeções intra-articulares no passado, histórico de infecções de pele ou úlceras cutâneas, são mais susceptíveis para o desenvolvimento de uma artrite infecciosa (Horowitz et al., 2011; Margaretten et al., 2007). Alguns fatores são limitantes na obtenção de um parâmetro completo da artrite infecciosa aguda, como a obtenção de dados devido à raridade da doença e pelas dificuldades no estabelecimento de um diagnóstico preciso (He et al., 2023).

Uma vez em contato com a articulação do hospedeiro, o *S. aureus* se fixa à matriz celular através dos chamados Componentes da Superfície Microbiana Reconhecedores de Moléculas Adesivas da Matriz (MSCRAMMs - *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Após seu estabelecimento na articulação, o *S. aureus* se prolifera rapidamente e desencadeia uma resposta inflamatória aguda, com hiperplasia de células da membrana sinovial e influxo de células inflamatórias (Boff, Crijns, et al., 2018).

Os sinoviócitos reconhecem o *S. aureus* através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) e produzem mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e lipídeos (Bekeredjian-Ding et al., 2015). As citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, IL-1 β e TNF são liberadas pelos sinoviócitos presentes na cavidade articular e estimulam a liberação de proteínas de fase aguda (proteína C reativa) que, por sua vez, ligam-se as células bacterianas e promovem a opsonização. Além disso, as quimiocinas secretadas pelos sinoviócitos promovem um influxo rápido de células fagocíticas, como neutrófilos e monócitos, para o sítio de infecção, as quais desempenham papel fundamental controle da infecção (Shirtliff & Mader, 2002). Os neutrófilos são rapidamente recrutados para a articulação por diferentes quimioatraentes, especialmente as quimiocinas CXCR1/2. Apesar de exercerem importante função no controle da carga bacteriana, os neutrófilos promovem dano tecidual, que resulta em dor intensa no local. O tratamento de camundongos a partir do início da infecção com o antagonista não competitivo do CXCR1/2, o DF2156A, foi capaz de promover a redução no acúmulo de neutrófilos, na produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido, na nocicepção articular e no dano tecidual (Boff, Oliveira, et al., 2018).

O reconhecimento dos PAMPs bacterianos se dá pelos PRRs dos neutrófilos (Mogensen, 2009). Lipoproteínas e LPS são alguns exemplos dos PAMPs reconhecidos pelos neutrófilos (Lee et al., 2003). Assim, após o reconhecimento do *S. aureus* e sua fagocitose, há a produção de diferentes mediadores pró inflamatórios, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), peptídeos antimicrobianos e enzimas líticas estocadas em grânulos específicos (Borregaard et al., 2007; Kaplan & Radic, 2012; Paiva & Bozza, 2014; SAKINIENE et al., 2003). Esses mediadores pró-inflamatórios irão coordenar as respostas subsequentes de outros tipos celulares, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos que irá proporcionar a comunicação entre as respostas imune inata e adquirida (Boff, Crijns, et al., 2018). Importante destacar que uma inflamação exacerbada pode causar danos permanentes na articulação acometida, causando perda de mobilidade e dor crônica (Colavite & Sartori, 2014; Shirtliff & Mader, 2002; Weiss, 1975) (**Figura 7**).

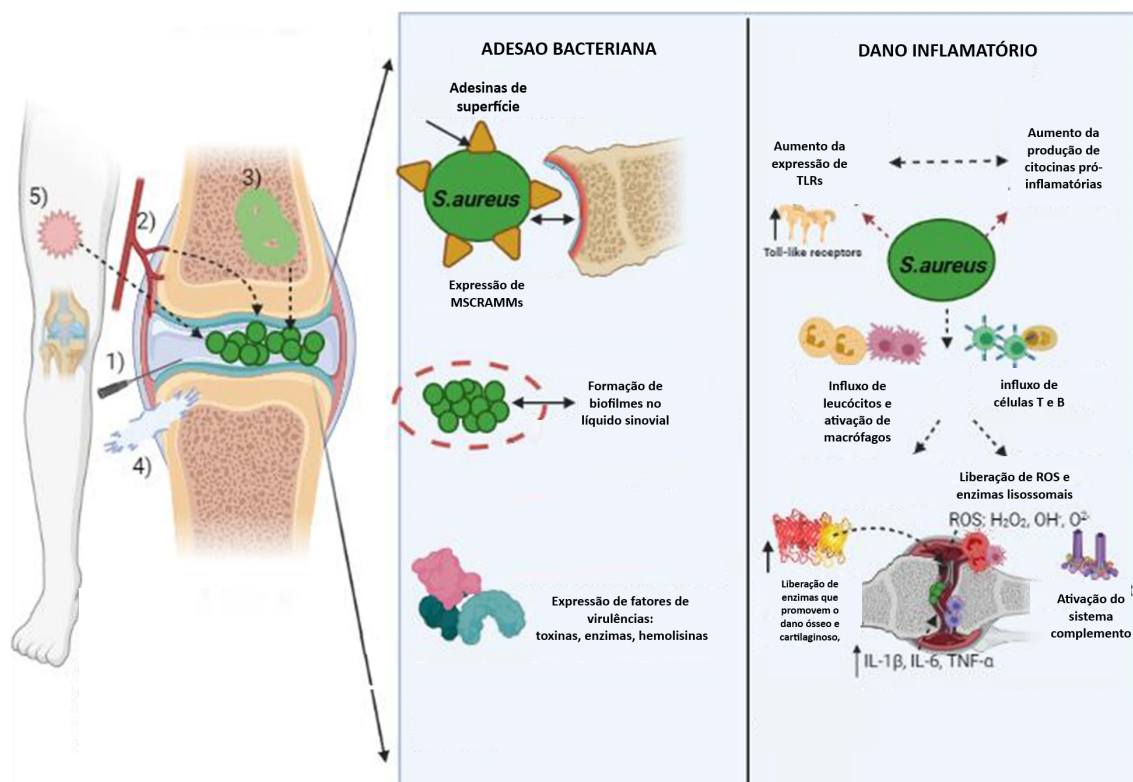


Figura 7: Desenho esquemático das rotas de infecção e o processo inflamatório no desenvolvimento da artrite infecciosa causada pelo *S. aureus*.

A bactéria pode acessar a articulação sinovial através de procedimentos diagnósticos e terapêuticos (1); circulação sanguínea em casos de sepse (2); através de ossos infectados (3); traumas (4) e de um tecido adjacente infectado (5). O *S. aureus* se estabelece na articulação através da expressão de moléculas de adesinas, através da formação de biofilmes, e da expressão de fatores de virulência. Durante o processo inflamatório, há o aumento da expressão de TLRs, que promovem o recrutamento de leucócitos e células T e B. Com isso, há a produção e liberação de moléculas efetoras e citocinas pró-inflamatórias, além da ativação do sistema complemento. O processo inflamatório contribui na liberação de enzimas que promovem dano ósseo e cartilaginoso (Adaptado de Wang & Wang, 2021).

1.4 Justificativa

As artrites causam danos nas articulações, que resultam em perda de mobilidade e dor, com impacto direto na qualidade de vida dos pacientes comprometidos. Vários pacientes apresentam surtos recorrentes e a resistência ou ineficácia de medicamentos são fatores que comprometem uma terapia adequada (McBride et al., 2020; Ross, 2017). O estudo de novas abordagens sobre o processo inflamatório e seus mecanismos torna-se importante para a compreensão da doença e para o desenvolvimento de estratégias de tratamento.

A predominância de uma inflamação prévia é um fator de susceptibilidade para o desenvolvimento de uma artrite infecciosa grave (Favero et al., 2008; Goldenberg, 1989; Jung et al., 2018). Diante disso, propusemos avaliar se a ocorrência de uma inflamação prévia articular pode proporcionar o treinamento de células residentes articulares e seus efeitos diante de um segundo estímulo infeccioso, causador da artrite séptica. O estudo da imunidade treinada é relevante na artrite inflamatória, uma vez em que a ativação inadequada do sistema imunológico pode levar uma inflamação sistêmica crônica, resultando na destruição de diferentes estruturas do tecido articular (Badii et al., 2022).

Nossa hipótese é que, diante de uma inflamação prévia, células sinoviais adquirem uma memória imune inata e passam a responder mais intensamente diante à infecção por *S. aureus*, promovendo maior inflamação, disfunção e dano articular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do treinamento imunológico em sinoviócitos e sua consequência na resposta inflamatória causada pela infecção articular por *S. aureus*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a dupla estimulação (LPS + *S. aureus*) *in vivo* promove alterações nos parâmetros inflamatórios, alterações histopatológicas e nociceptivas na articulação de camundongos;
- Avaliar se a dupla estimulação promove proteção contra a infecção por *S. aureus*;
- Caracterizar as populações de macrófagos e fibroblastos sinoviais sob as condições de treinamento imunológico ou não;
- Avaliar se a indução de imunidade treinada em macrófagos sinoviais promove alterações nos marcadores de metabolismo energético e epigenéticos;
- Avaliar se a inibição da imunidade treinada em macrófagos sinoviais reduz a na atividade celular e no dano tecidual.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6J machos de oito a doze semanas de idade foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os animais foram mantidos com água filtrada e comida *ad libitum* e mantidos em ambiente controlado. Os experimentos receberam aprovação prévia do comitê de ética animal da UFMG (CEUA 03/2021).

3.2 Modelo de indução de imunidade treinada *in vivo* e infecção por *S. aureus*

Camundongos foram previamente anestesiados (60:5 mg/kg de cetamina:xilazina injetados via intraperitoneal) estimulados, via articulação tibiofemoral, com uma solução de LPS preparada em salina (0,9 % p/v) na concentração de 200 ng/10 μ L ou CX3CL1 na concentração de 50 ng/10 μ L (#583504 – Biolegends. San Diego, CA). Para o segundo estímulo, foi utilizado o *S. aureus* ATCC 6538 previamente cultivado em ágar de infusão de cérebro e coração (BHI) suplementado com 5 % de sangue de carneiro durante 24 h a 37°C. Após 21 dias da primeira estimulação, os camundongos foram novamente anestesiados e na mesma articulação foi inoculada uma solução bacteriana preparada em solução salina na concentração de 10⁵ CFU/10 μ L. Os parâmetros inflamatórios e a carga bacteriana foram avaliados 1 e 5 dias após a injeção da bactéria.

O tecido periarticular foi coletado das articulações para avaliação da produção de citocinas. A articulação inflamada foi removida, homogeneizada e colocada em ágar infusão cérebro-coração (BHI) suplementado com sangue durante 24 h a 37°C para a verificação da carga bacteriana.

3.3 Tratamento com Rapamicina

Para os experimentos de investigação da inibição da via de mTOR, camundongos foram tratados com Rapamicina (8 mg/kg por via oral - Sirolimus - indústria farmacêutica Wyeth, São Paulo- Brasil) 1 hora antes da injeção de LPS ou 1 hora antes da injeção com *S. aureus*. Os grupos de camundongos receberam a injeção de *S. aureus* (ATCC6538 - 10⁵ UFC/10 μ L em solução salina) 21 dias após a injeção de LPS na mesma articulação como estímulo secundário.

Após 1 ou 5 dias da infecção por *S. aureus*, camundongos foram sacrificados para identificação histopatológica de marcadores de ativação de células sinoviais.

3.4 Medida de nocicepção mecânica

Os camundongos foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico (12 × 10 x 17 cm de altura) com um piso de grade de arame, numa sala com ruído controlado, durante 60 minutos. Após esse tempo, a manifestação do comportamento exploratório foi anulada e todos os camundongos permaneceram quietos, permitindo a avaliação da resposta nociceptiva. Para identificar o limiar de retirada, um algesímetro eletrônico de Von Frey (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi aplicado de acordo com os métodos previamente utilizados (Boff, Oliveira, et al., 2018; Sachs et al., 2011). Em resumo, utilizando um transdutor de força portátil, com uma ponteira de polipropileno (4,15 mm), foi aplicada uma força vertical e constante na superfície plantar central da pata do camundongo. Este procedimento tem como objetivo produzir um estímulo mecânico articular para a flexão do joelho. A força suficiente em gramas (g) para desencadear um movimento de retirada da pata, o comportamento aversivo característico para evitar o stress incidente, foi registrada por um componente eletrônico do aparelho. O limiar de retirada foi calculado através da repetição do procedimento em triplicado para cada camundongo (e as médias foram expressas em valores absolutos). A resposta nociceptiva foi observada 1 e 21 dias após a indução por LPS e 1 e 5 dias após a infecção por *S. aureus* no joelho e conduzida numa condição experimental cega.

3.5 Histologia, Imunohistoquímica e coloração TRAP

As amostras da articulação tibiofemoral foram recolhidas e fixadas em formalina tamponada a 10 % (v/v) (pH 7,4), descalcificadas durante 30 dias em EDTA a 14 %. Os tecidos foram incluídos em parafina, seccionados (5 mm) e corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Em seguida, as amostras foram examinadas e classificadas por um patologista de forma cega relativamente aos seguintes parâmetros: gravidade da hiperplasia sinovial, intensidade do infiltrado inflamatório, e alterações no osso e cartilagem. Para a análise por imunohistoquímica, as lâminas foram incubadas previamente com solução de EDTA a 0,037% (p/v) (pH 8,0). Em seguida, as amostras foram incubadas com solução de anti-p-mTOR (#2971 – Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA, 1:50), seguido de um anticorpo anti-rabbit secundário biotinilado, e a cor foi desenvolvida com DAB (3,3'-diaminobenzidina) (#11718096001 -

Sigma-Aldrich). Para a detecção de osteoclastos, foi utilizado a técnica de TRAP (fosfatase ácida resistente a tartarato) (Tsuboi, 2003). As lâminas foram incubadas com uma solução de TRAP e determinado o número de células TRAP positivas na região do osso trabecular. Ambas as técnicas foram contra coradas com hematoxilina, montadas e examinadas com um microscópio Motic (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha). O número de células p-mTOR e TRAP positivas foram avaliadas através da média da contagem de 4 fotos em cada campo.

3.6 Análise das populações de células sinoviais por citometria de fluxo

Um pool de dois tecidos sinoviais foi utilizado para cada amostra analisada por citometria de fluxo. As amostras foram incubadas com colagenase (10 mg/mL; Colagenase D – Sigma Aldrich) por 1 h a 37°C seguido da passagem por filtro celular de 70 µm para obtenção de suspensões celulares. As células obtidas foram previamente quantificadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Para a identificação da população de macrófagos, foram utilizados anti-CD45 PercP (Biolegends #103131), anti-CD11b APC-Cy7 (BD Pharmingen #562127), anti-F4/80 FITC (Biolegends #123107) e anti-CX3CR1⁺ PECy7 (Biolegends #149015). Anti-Ly6G BV421 (Biolegends #127628) foi utilizado para a identificação dos neutrófilos. Para os fibroblastos sinoviais, foram utilizados o anti-CD90 PE (Biolegends #109006) e o anti-FAP BV421 (eBioscience #BMS168). Outros marcadores de ativação celular foram: anti-RANKL PE (BD Pharmingen #560295), anti-TLR2 PE (Biolegends #148603) e anti-MHCII BV500 (BD Pharmingen #562366). Após a marcação superficial (30 min), as células foram fixadas por incubação com formol a 4% por 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas e permeabilizadas com tampão de permeabilização (True-Phos™ Perm Buffer, BD Bioscience) por 30 minutos. Após a permeabilização, as células foram marcadas intracelularmente por 30 minutos com o anticorpo primário anti-mTOR fosforilado (Cell Signaling #2971), anti-HIF1α (Cell Signaling #36169), anti-H3K4Me3 (Sigma Aldrich #9Q08JS) e anticorpo secundário anti-rabbit (BD Pharmingen Alexa 647 #560626 ou FITC #F0257). Os controles negativos foram células marcadas apenas com anticorpos anti-rabbit secundários ligados a fluorocromos. As células marcadas foram adquiridas com o analisador de células BD FACSCanto II (BD Bioscience) e analisadas com o software FlowJo (Tree Star Inc., EUA). As análises das populações celulares foram representadas pela correlação da porcentagem das populações (*frequency of total*) pelo número total de células obtidas vezes o fator da câmara de Neubauer ($\times 10^4$).

3.7 Quantificação da expressão de mRNA por RT-qPCR

O RNA total foi extraído e isolado do tecido periarticular de camundongos utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies Corporation- Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do RNA total foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific- Waltham, MA, EUA). Para a transcrição reversa de 500 ng de RNA total isolado para cDNA, uma mistura contendo a transcriptase de reserva, SuperScript III, um inibidor de ribonuclease recombinante (RNase Out; Invitrogen Life Technologies Corporation) e ditiotretol (TDT; 1 mM). A etapa de transcrição reversa foi realizada em duplicata e a concentração total de cDNA foi semelhante em todas as amostras. Para qPCR quantitativo em tempo real, o reagente Power SYBR Master Mix (Invitrogen Life Technologies Corporation) e os primers pars (Integrated DNA Technologies- Coralville, IA, EUA) mais cDNA foram colocados em uma placa de 96 poços, em duplicata, a um volume total de reação de 10 µL, utilizando o sistema StepOne™ (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) em reação programada: aquecimento inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 60 s e 48 °C por 1 min. Os dados foram analisados no software StepOne™ System e processados pelo método $2^{-\Delta CT}$. Este método utiliza diretamente as informações de CT (threshold cycle) geradas por um sistema de qPCR para calcular a expressão relativa de genes nas amostras alvo e de referência, usando um gene de referência para normalizar a RT-qPCR. As sequências de pares de primers utilizadas foram:

- Hexokinase 2 (*hk2*): foward 5'-GTGTGCTCCGAGTAAGGGTG-3' e reverse 5'-CAGGCATTCGGCAATGTGG-3';
- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*): foward 5'-ACGGCCGCATCTTCTTCTGCA-3' e reverse 5'-CGCCCAAATCCGTTTACACCG-3'
- *glut1* foward 5'-TGGCAGGCTGTGCTGTGCTC-3' e reverse 5'-CCAAGGCAGCCGTTCCAGCA-3';
- *tnf* foward, 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' e reverse 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3';
- *il-6*: foward 5'-TGTTCTCTGGGAAATCGTGAA-3' e reverse 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3';
- *il-1β*: foward 5'-CTACAGGCTCCGAGATGAACAAC-3' e reverse 5'-TCCATTGAGGTGGAGAGCTTTC-3';
- *18s*: foward 5'-CGTTCCACCAACTAAGAACG-3' e *18s* reverse 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'.

As sequências do iniciador e da sonda foram verificadas com o software BLAST™. O 18s foi usado como gene de controle de referência e os resultados foram expressos como "Fold Increase" em comparação com os grupos controle negativo injetados com solução salina.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e a normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk) utilizando o programa GraphPad Prism v9.5 (GraphPad Software Inc., CA, EUA) e expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0,05$

4. RESULTADOS

4.1 A inflamação articular prévia agrava a inflamação tecidual local após a infecção por *S. aureus*

A artrite infecciosa causada por *S. aureus* é caracterizada pelo rápido e intenso influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos, com alta produção de mediadores pró-inflamatórios nas articulações afetadas (Boff et al., 2020). Para avaliar se a inflamação prévia tem impacto na inflamação articular secundária, estabelecemos um modelo de inflamação articular de dupla estimulação, na qual o LPS foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido pela injeção de *S. aureus* na mesma articulação 21 dias depois. O intervalo de 21 dias foi escolhido devido à remissão completa de marcadores de inflamação articular após a injeção de LPS. Após 1 dia da infecção por *S. aureus*, tanto a injeção única de *S. aureus* quanto a dupla injeção de LPS + *S. aureus* apresentaram quantidade semelhante de células mieloides totais (**Figura 8 A**) e estratégia de “*gating*” no ANEXO Figura 1, embora com discreto aumento de neutrófilos no tecido sinovial nas articulações duplamente estimuladas quando comparados à injeção única de *S. aureus* (**Figura 8 B**). A dupla injeção de LPS + *S. aureus* apresentou maior número de macrófagos, incluindo uma população mais específica de células CX3CR1⁺, comumente presentes na camada íntima do tecido sinovial (Li et al., 2021), em comparação com os grupos que foram estimulados unicamente (**Figura 8 C e D**). Entretanto, é importante ressaltar a presença do elevado número desses macrófagos nas articulações estimuladas apenas com LPS (após 21 dias) quando comparadas às articulações injetadas com solução salina, momento em que não há sinais de inflamação articular. Além disso, esses macrófagos apresentaram aumento de marcadores de superfície envolvidos na resposta imunoinflamatória, como TLR2 (**Figura 8 E**) e MHCII (**Figura 8 F**) somente após a dupla injeção.

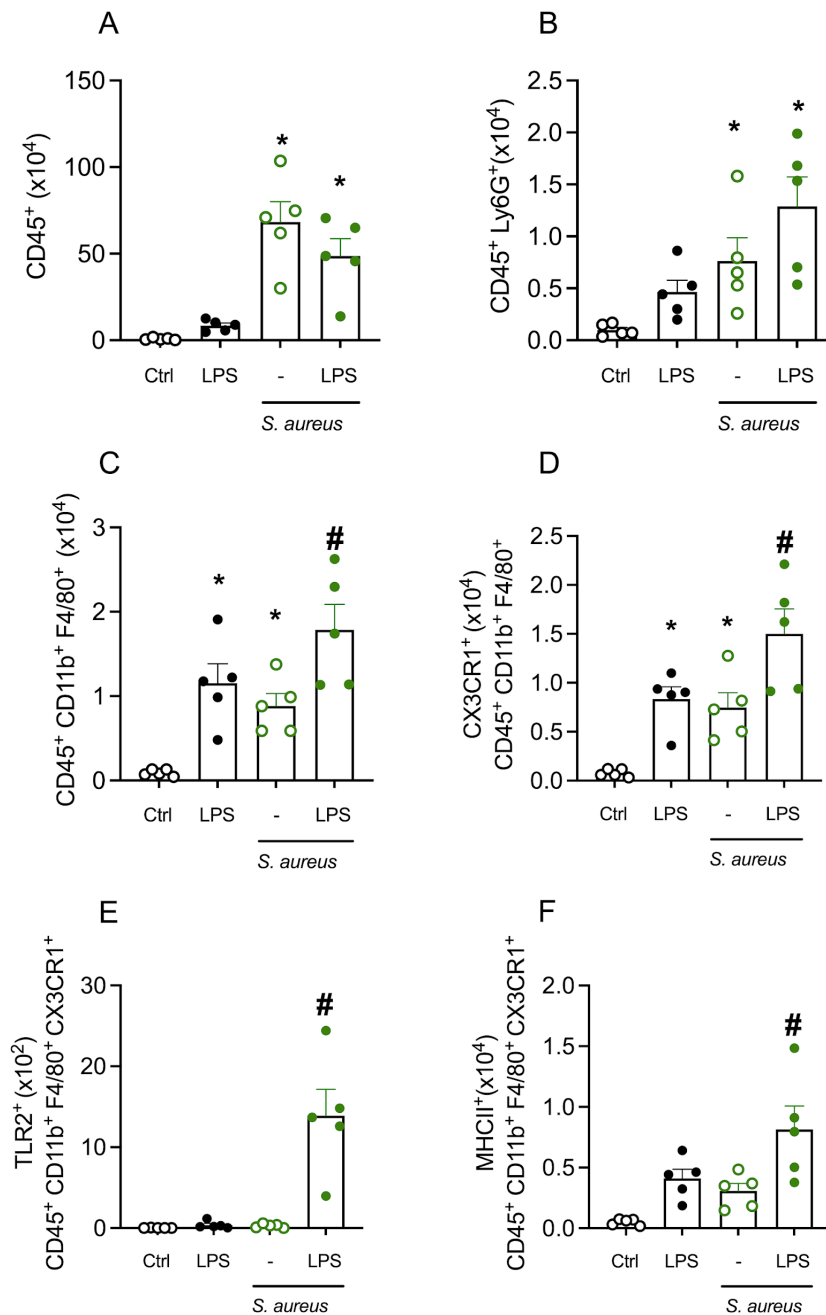


Figura 8: A inflamação articular prévia promove aumento da inflamação articular após a infecção com *S. aureus*.

Solução salina (10 μ L) ou LPS (200 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10⁵ CFU/ 10 μ L) na mesma articulação 21 dias depois. Tecidos sinoviais foram coletados 1 dia após a segunda injeção para análise das populações de células mieloides totais (A), neutrófilos (B) e macrófagos gerais (C) e sinoviais (D) por citometria de fluxo. Foram analisados dentro da população de macrófagos sinoviais as marcações de TLR2 (E) e MHCII (F). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos injetados com soro fisiológico duplo) e # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS.

A infecção por *S. aureus* promoveu um aumento na expressão de RNA de citocinas pró-inflamatórias na articulação em relação ao grupo controle negativo, porém em maior valor quando houve a dupla injeção de LPS + *S. aureus* em relação à grupo que recebeu injeção única de *S. aureus* (Figura 9 A-C).

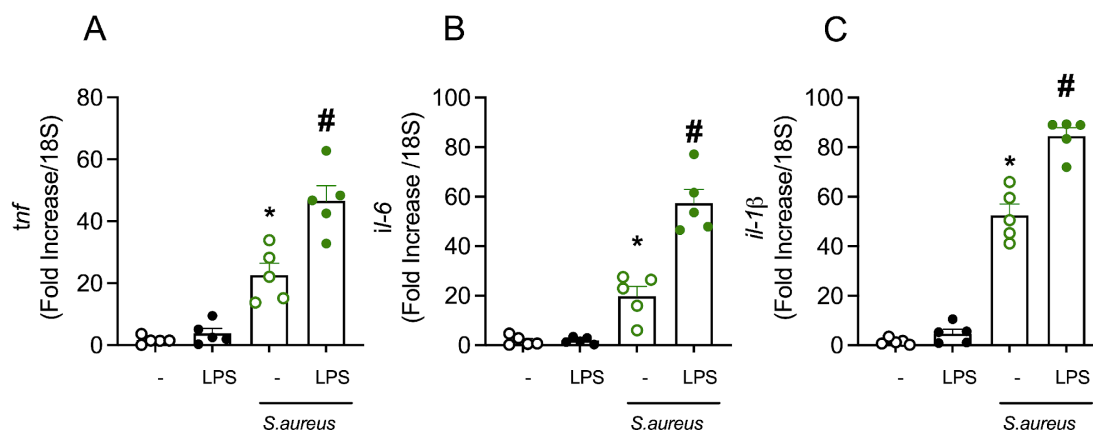


Figura 9: A inflamação articular prévia promove aumento da expressão de genes inflamatórios após a infecção com *S. aureus*.

Solução salina (10 μ L) ou LPS (200 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10^5 CFU/ 10 μ L) na mesma articulação 21 dias depois. Tecidos sinoviais foram coletados 1 dia após a segunda injeção para análise da expressão de mRNA dos genes de *tnf* (A), *il-6* (B) e *il-1β* (C) por qRT-PCR, expressos como “Fold change” em relação ao grupo 18S e controle negativo. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos injetados com soro fisiológico duplo) e # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS.

Consistente com o aumento da inflamação articular neste modelo e tendo em vista o importante papel dos fibroblastos sinoviais ativados na patogênese de diferentes condições de artrite (Croft et al., 2019; Friščić et al., 2021; Helmke et al., 2019), também houve um aumento da população de fibroblastos CD45⁻ CD90⁺ FAP⁺ no tecido sinovial no grupo que recebeu dupla injeção de LPS - *S. aureus* quando comparado ao grupo que recebeu injeção única de *S. aureus* (Figura 10 A-C) e estratégia de “gating” em ANEXO Figura 2, ainda assim com aumento da expressão de MHCII (Figura 10 D).

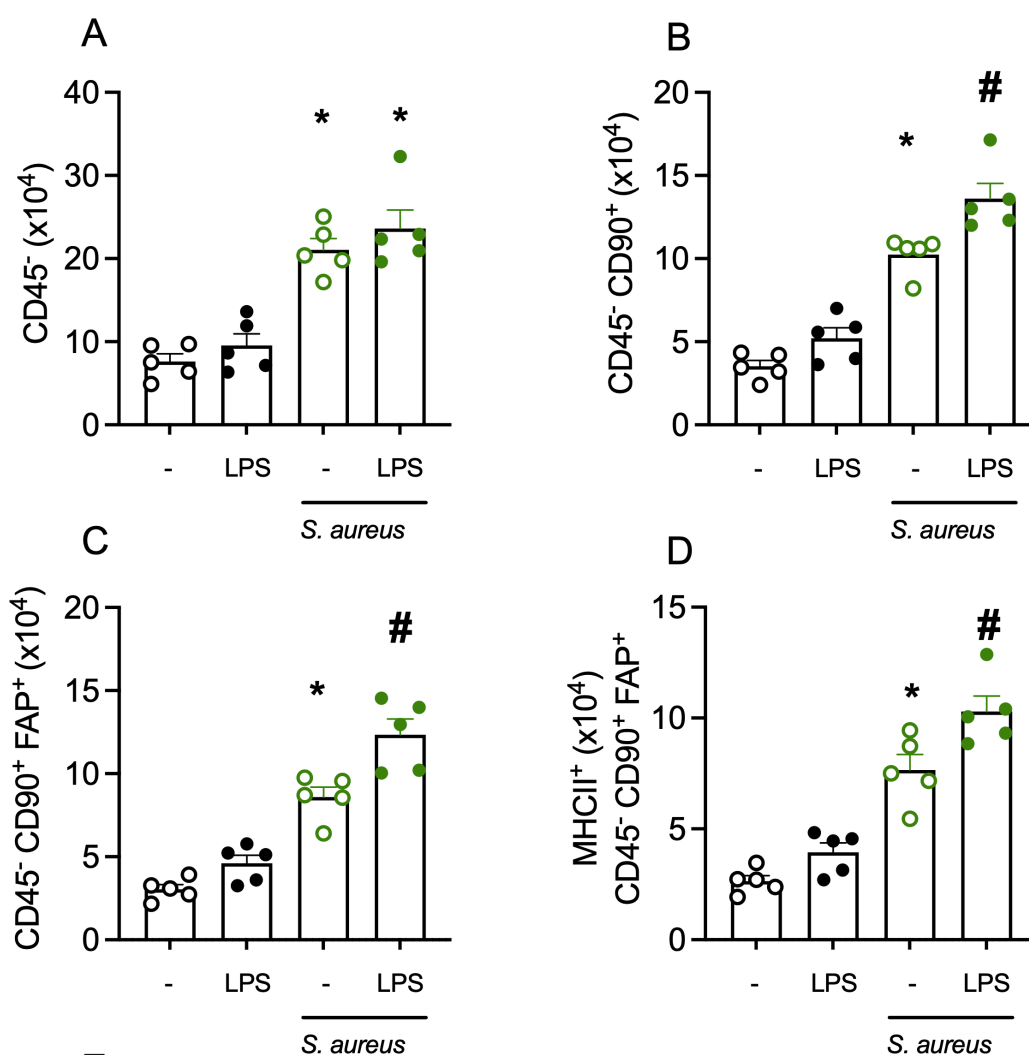


Figura 10: O duplo estímulo articular promove aumento dos marcadores pró-inflamatórios na população de fibroblastos sinoviais.

Salina (10 μ L) ou LPS (200 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10⁵ UFC/ 10 μ L) na mesma articulação por 21 dias. As células do tecido sinovial foram obtidas e analisadas por citometria de fluxo: a população de células mieloides totais (A), a população de fibroblastos sinoviais CD45⁺ CD90⁺ (B), a população de fibroblastos sinoviais que expressam FAP⁺ (C) e a população de fibroblastos sinoviais FAP⁺ que expressam MHCII (D). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos injetados com soro fisiológico duplo) e # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS.

A infecção por *S. aureus* promove alterações histopatológicas significativas na articulação tibiofemoral (Aitkens et al., 2022; George et al., 2019). Avaliamos se uma inflamação sinovial prévia piora o dano tecidual e a disfunção após a infecção por *S. aureus*. Após 1 e 5 dias da injeção de *S. aureus*, houve aumento nos marcadores importantes de inflamação articular, principalmente no 5º dia, incluindo acúmulo de células no tecido sinovial, com predomínio de neutrófilos e monócitos, bem como hiperplasia da membrana sinovial e dano ósseo (**Figura 11**). No entanto, camundongos que receberam LPS previamente apresentaram aumento no dano ósseo já no primeiro dia após a infecção por *S. aureus* quando comparados aos camundongos que receberam injeção única de *S. aureus*, diferença sustentada até o dia 5 (**Figura 11 A e B**). Corroborando esses achados, houve aumento do número de células positivas para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), enzima secretada pelos osteoclastos (Schneider et al., 2024), principalmente no osso trabecular, com maior incidência no grupo que recebeu dupla injeção de LPS - *S. aureus* em relação à infecção única por *S. aureus* (**Figura 12 A e B**). Além disso, os macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ desse do grupo duplo estimulado apresentaram expressão aumentada de RANKL (**Figura 12 C**), uma molécula crítica para a indução da osteoclastogênese (Schneider et al., 2024; Sithole et al., 2021).

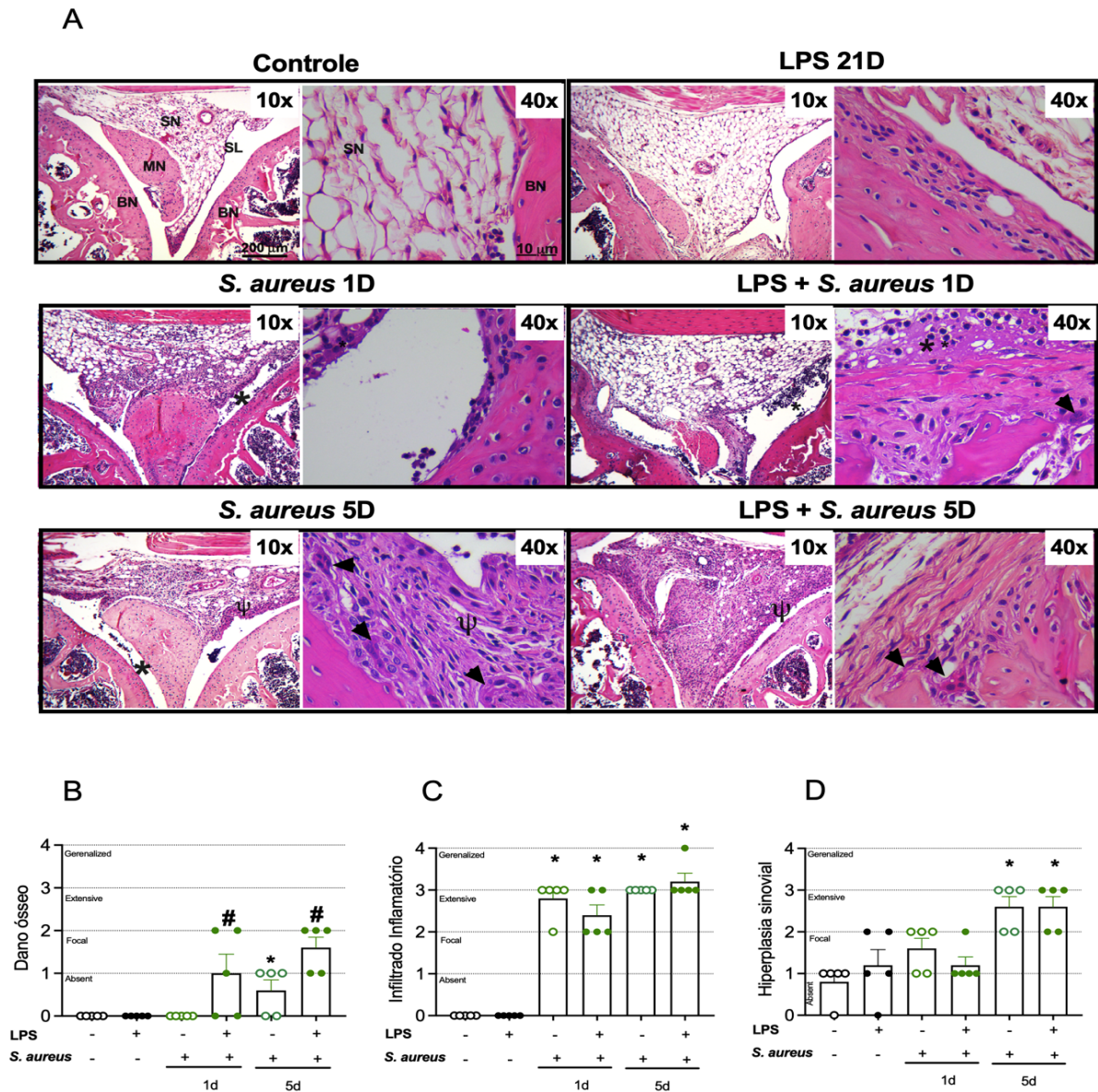


Figura 11: Alterações histopatológicas da cavidade sinovial promovidas pela infecção por *S. aureus*.

Salina (10 µL) ou LPS (200 ng/ 10 µL) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 µL) ou *S. aureus* (10^5 CFU/ 10 µL) na mesma articulação após 21 dias. A cavidade sinovial foi coletada 1 e 5 dias após a segunda injeção para a análise de H&E. Imagens representativas da cavidade sinovial (SN – tecido sinovial; LS – revestimento sinovial sub-íntima; MN – menisco; BN – osso; * - infiltrado inflamatório; cabeça de seta - dano ósseo; ψ - hiperplasia sinovial). Foram avaliados a presença de dano ósseo (A), hiperplasia sinovial (B) e infiltrado inflamatório (C). Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos com dupla injeção com salina) e # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS.

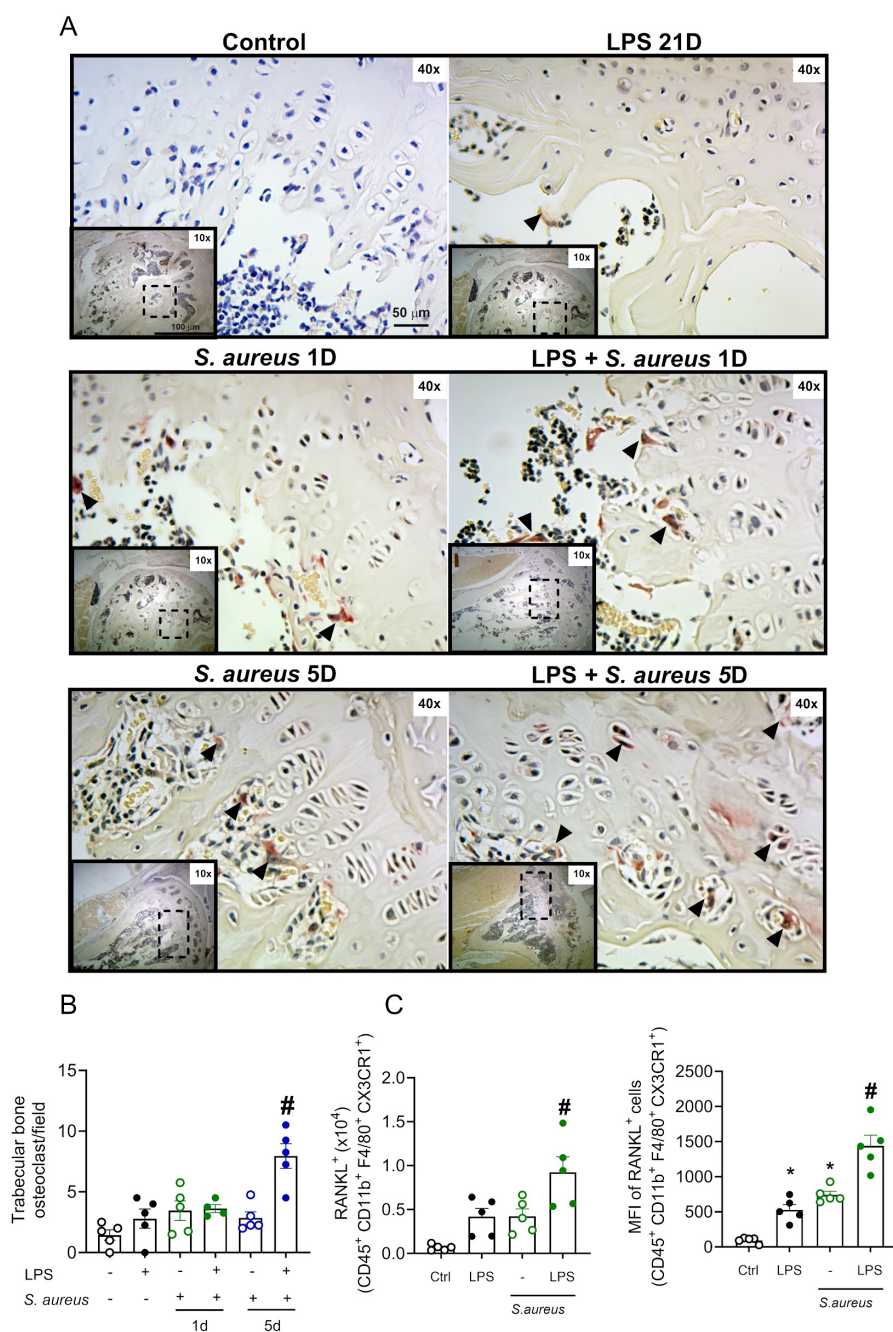


Figura 12: O duplo estímulo LPS + *S. aureus* induz maior dano ósseo, maior presença de osteoclastos e maior quantidade de macrófagos expressando RANKL.

Salina (10 μL) ou LPS (200 ng/ 10 μL) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μL) ou *S. aureus* (10⁵ CFU/ 10μL) na mesma articulação após 21 dias. A cavidade sinovial foi coletada 1 e 5 dias após a segunda injeção e analisada a presença de osteoclastos no osso trabecular pela técnica da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) nos tempos de 1 e 5 dias após a infecção por *S. aureus*. (A) Imagens representativas da cavidade sinovial (BN – osso; TB- osso trabecular; pontas de seta – osteoclastos). (B) Gráfico representativo do número de osteoclastos na região do osso trabecular. (C) Produção de RANKL por macrófagos sinoviais CX3CR1⁺. Os resultados são apresentados como a média ± SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de p<0,05. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos duplamente injetados com salina) e # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS.

Como sintoma comum na artrite em geral e no nosso modelo de infecção, a infecção por *S. aureus* promoveu alterações na nocicepção mecânica articular, como observado através da redução do limiar de retirada da pata do equipamento (**Figura 13**). Um dia após a estimulação com LPS, os camundongos apresentaram uma redução do limiar de retirada da pata, o que indica um aumento da resposta nociceptiva. Porém, após 21 dias da injeção de LPS, o limiar nociceptivo retornou ao valor basal. Em seguida, os camundongos foram reestimulados com *S. aureus* e no primeiro dia após a infecção, todos os grupos apresentaram aumento na resposta nociceptiva (1D após *S. aureus*). Entretanto, após 5 dias da infecção, o grupo controle apresentou um valor de limiar de retirada de pata maior, indicando uma redução da nocicepção quando comparado com o dia 1 (5D após *S. aureus*). Porém, os camundongos duplamente desafiados (5D dupla estimulação LPS+*S. aureus*) mantiveram os valores similares ao primeiro dia após a infecção.

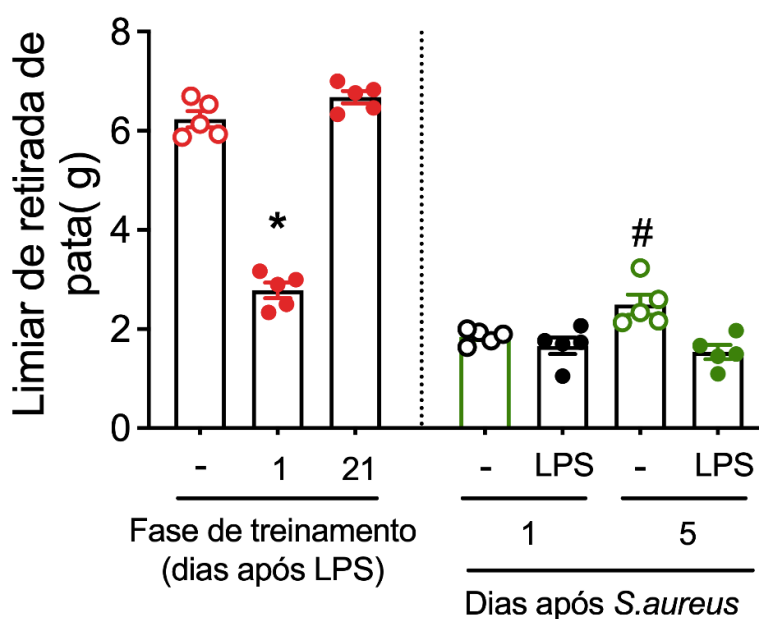


Figura 13: A dupla estimulação LPS + *S. aureus* mantém maior resposta nociceptiva.

Salina (10 μ L) ou LPS (200 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10^5 UFC/ 10 μ L) na mesma articulação após 21 dias. A resposta nociceptiva da pata foi avaliada nos tempos de 1 e 21 dias após a injeção com LPS e 1 e 5 dias após a infecção por *S. aureus*. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo negativo (camundongos injetados duplamente com solução salina) e 21 dias após o grupo LPS. # quando comparado aos grupos de injeção dupla de LPS – *S. aureus* (1 e 5 dias) e injeção única com LPS.

Por outro lado, não houve diferença na carga bacteriana recuperada das articulações infectadas entre esses grupos 1 e 5 dias após a infecção por *S. aureus*, seja com estimulação prévia com LPS ou não (**Figura 14**). Assim, esse conjunto de resultados indica que a inflamação articular prévia causada pelo LPS foi suficiente para agravar a inflamação, dano e disfunção articular após a infecção por *S. aureus*, mesmo na presença de uma carga bacteriana semelhante.

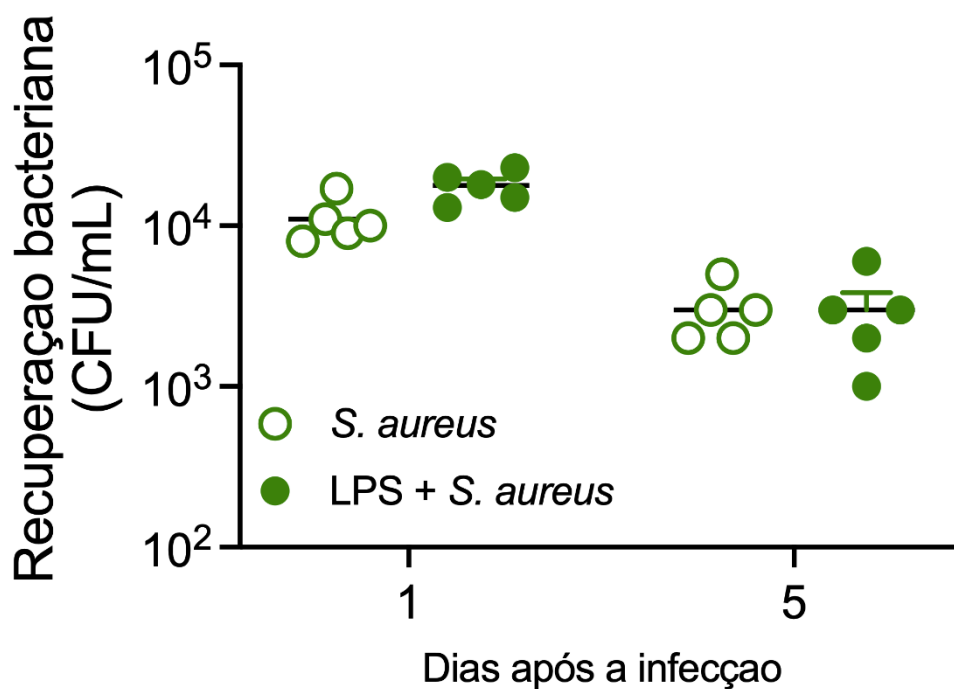


Figura 14: A dupla estimulação LPS + *S. aureus* não contribui na eliminação de *S. aureus*.

Salina (10 μ L) ou LPS (200 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10^5 CFU/ 10 μ L) na mesma articulação após 21 dias. O tecido periarticular foi coletado, processado e o homogenato cultivado em meio BHI para análise do crescimento bacteriano após 1 e 5 dias da infecção por *S. aureus*. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais.

Com as notáveis alterações inflamatórias, histopatológicas e nas populações de sinoviócitos promovidos pela dupla estimulação articular e o evidente papel dos macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ no desenvolvimento de uma inflamação agravada, avaliamos se a indução de uma inflamação prévia pelo ligante direto do receptor CX3CR1, a quimiocina CX3CL1, apresentaria um perfil inflamatório similar em comparação a inflamação promovida por LPS (**Figura 15**). Observamos que, apesar da administração intra-articular de CX3CL1 promover inflamação local, as alterações histopatológicas analisadas 1 dia após a infecção por *S. aureus*, como dano ósseo (**Figura 15 B**), hiperplasia sinovial (**Figura 15 C**) e infiltrado inflamatório (**Figura 15 D**) são similares em comparação as articulações que receberam injeção única de *S. aureus*. Esse achado é reforçado através da contagem do infiltrado leucocitário contido na articulação inflamada 1 dia após a infecção por *S. aureus* (**Figura 15 E-G**).

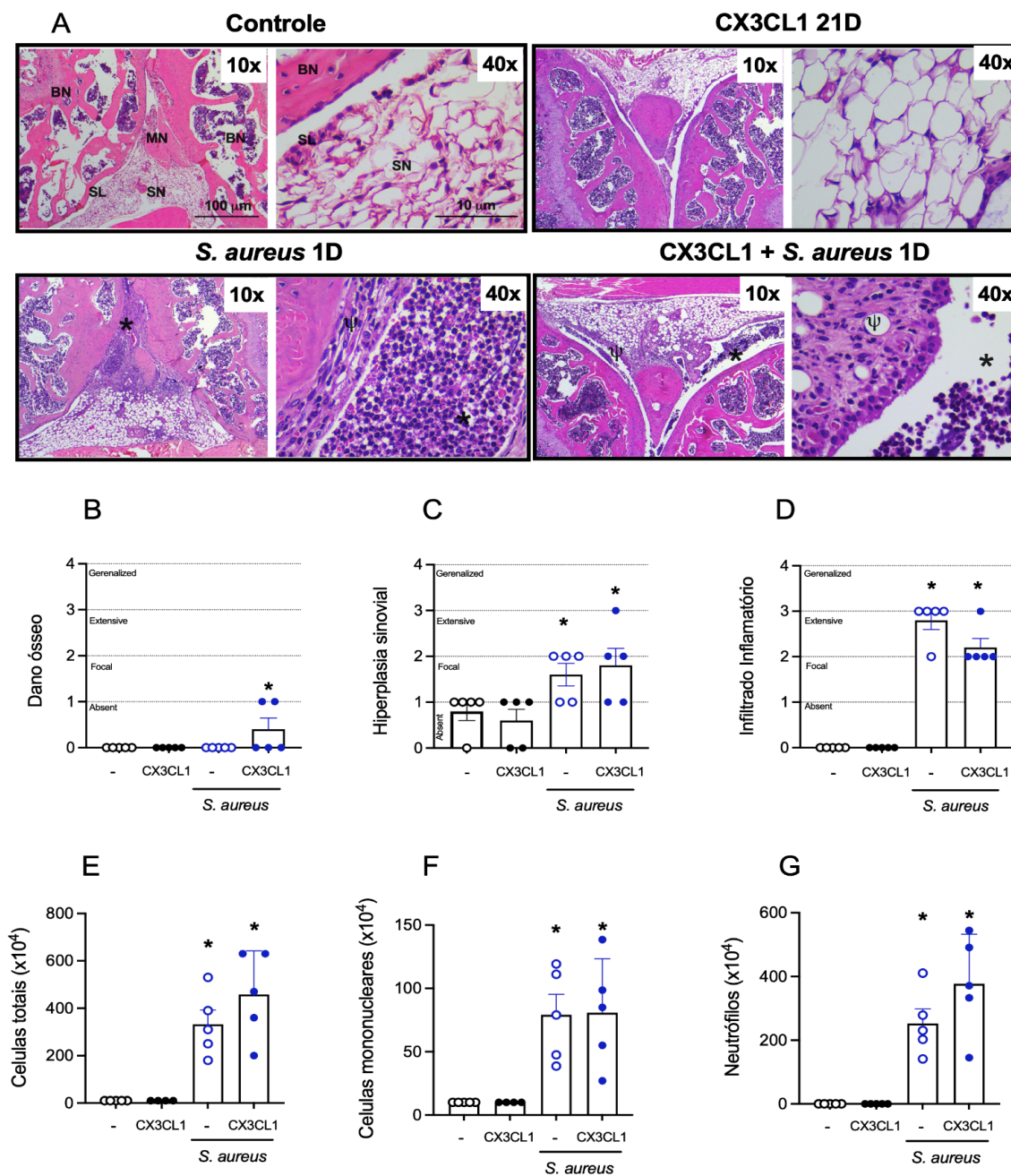


Figura 15: A inflamação prévia com o ligante CX3CL1 não promove alterações significativas na inflamação após a infecção por *S. aureus*.

Salina (10 μ L) ou CX3CL1 (50 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10^5 CFU/ 10 μ L) na mesma articulação após 21 dias e as alterações histopatológicas foram avaliadas um dia após a infecção. (A) Imagem representativa da articulação tibiofemoral (SN – tecido sinovial; LS – revestimento sinovial sub-íntima; MN – menisco; BN – osso; * - infiltrado inflamatório; ψ - hiperplasia sinovial). Foram avaliados a presença de dano ósseo (B), hiperplasia sinovial (C) e infiltrado inflamatório (D). Através do lavado intra-articular (E), foi avaliado o número de células mononucleares (E) e neutrófilos (F) recrutados em resposta a infecção por *S. aureus*. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos com dupla injeção com salina).

4.2 Inflamação articular prévia promove imunidade treinada em macrófagos sinoviais CX3CR1⁺

Diante do agravamento da inflamação articular promovido pela a exposição prévia ao LPS seguido da infecção por *S. aureus*, juntamente com o aumento da ativação dos sinoviócitos, levantamos a hipótese se essas células residentes foram submetidas ao treinamento imunológico, que é caracterizado por importantes alterações metabólicas associadas ao aumento do metabolismo glicolítico controlado pela via mTOR (AKT/mTOR/HIF1 α) (Cheng et al., 2014a; Horng, 2015; Nagao et al., 2019). Pela técnica de imunohistoquímica, foi possível evidenciar uma extensa área de mTOR fosforilada (p-mTOR) após infecção por *S. aureus*, principalmente na região íntima do tecido sinovial, com maior evidência no grupo que recebeu dupla injeção de LPS + *S. aureus* (**Figura 16 A e B; ver estratégia de “gating” em ANEXO Figura 1**). Corroborando esse achado, macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ do grupo que recebeu dupla injeção de LPS + *S. aureus* aumentaram acentuadamente a presença de p-mTOR (**Figura 16 C**) e HIF1 α (**Figura 16 D e estratégia de “gating” em ANEXO Figura 3**) em comparação com a injeção única de LPS ou *S. aureus*. Por outro lado, os fibroblastos sinoviais apresentaram expressão discreta de HIF1 α diante da dupla estimulação, sem diferenças entre os grupos infectados isoladamente (**Figura 16 E**).

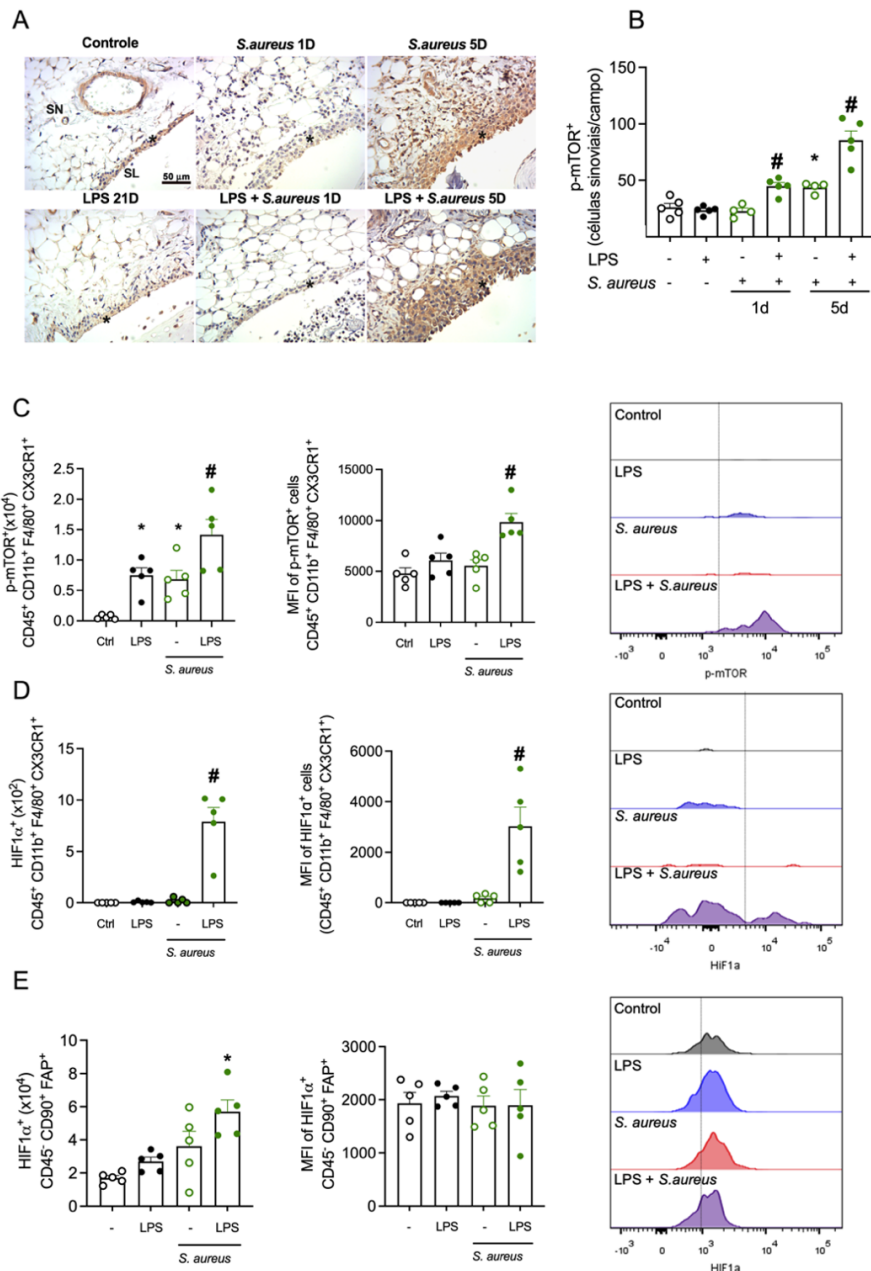


Figura 16: A inflamação articular prévia promove imunidade treinada em macrófagos sinoviais CX3CR1⁺.

Salina (10 μ L) ou LPS (200 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10⁵ CFU/ 10 μ L) na mesma articulação após 21 dias. A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para quantificar a presença de células p-mTOR positivas 1 e 5 dias após a infecção por *S. aureus*. (A) Imagem representativa do tecido sinovial (SN- tecido sinovial; LS – revestimento sinovial sub-íntima; *- células positivas marcadas com p-mTOR), (B) Gráfico representativo do número de células p-mTOR positivas. Os tecidos sinoviais foram coletados 1 dia após a segunda injeção e analisados a presença de p-mTOR (C) e HIF1 α (D-E) nas populações de macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ e de fibroblastos sinoviais por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos duplamente injetados com salina) e # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS.

Ao analisar o tecido sinovial, houve um aumento substancial da expressão de mRNA dos importantes genes associados à via glicolítica (Cheng et al., 2014a), incluindo o receptor de captação de glicose, o *glut1*, e outros dois genes envolvidos nas etapas subsequentes da via glicolítica, o *hk2* (Hexoquinase 2) e *gapdh* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) no grupo que recebeu dupla injeção de LPS + *S. aureus*, quando comparados aos outros grupos (**Figura 17 A-C**).

Outro marcador importante na imunidade treinada, a metilação de histonas, resulta em silenciamento ou ativação transcricional, dependendo do número de grupos metil adicionados. A metilação da lisina 4 sobre a histona H3 (H3K4me3) facilita a ativação de promotores e potencializadores, levando ao aumento da atividade na via glicolítica e à regulação transcricional de genes pró-inflamatórios (Aday et al., 2011; Bekkering et al., 2015; Kloc et al., 2022). Constatamos que a população de macrófagos sinoviais treinados CX3CR1⁺ também apresentou aumento do marcador H3K4me3. Importante destacar o aumento deste marcador epigenético nos grupos que recebeu uma única injeção de LPS e *S. aureus* em relação ao grupo veículo, embora tenha sido maior no grupo que recebeu dupla injeção de LPS + *S. aureus* (**Figura 17 D e estratégia de “gating” em ANEXO Figura 4**). Esse conjunto de dados indicam que a estimulação prévia com LPS promove alterações metabólicas e epigenéticas em macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ que respondem mais intensamente quando desafiados com *S. aureus*.

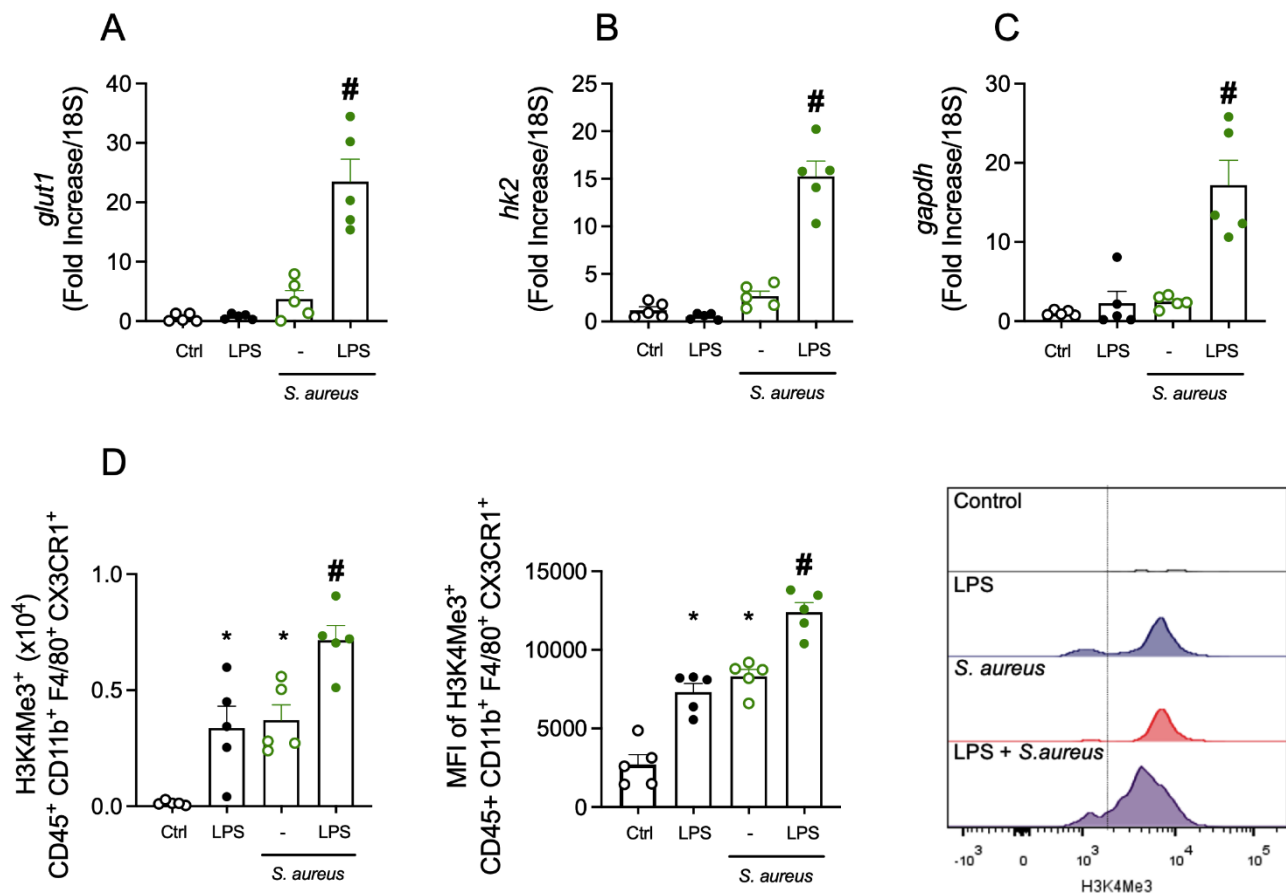


Figura 17: Macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ treinados apresentam aumento na expressão de componentes da via glicolítica e do marcador epigenético H3K4me3.

Salina (10 μ L) ou LPS (200 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos seguido por injeção de solução salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10⁵ CFU/ 10 μ L) na mesma articulação após 21 dias. Tecidos sinoviais foram coletados 1 dia após a segunda injeção para análise da expressão de mRNA de *hk2* (A), *glut 1* (B) e *gapdh* (C) por qRT-PCR. A presença do marcador epigenético H3K4me3 (D) na população de macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ foi determinada por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos duplamente injetados com salina) e # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS.

4.3 A inibição da via de mTOR reduz a inflamação proveniente da dupla estimulação

A fim de avaliar a participação da via do mTOR na ativação de macrófagos sinoviais neste modelo, camundongos foram tratados com o inibidor de mTOR Rapamicina sob duas estratégias diferentes de grupos duplamente estimulados: antes da injeção de LPS ou imediatamente antes da infecção por *S. aureus*. Houve redução no número de leucócitos totais quando a Rapamicina foi administrada antes da infecção por *S. aureus* em comparação com outras articulações afetadas, que indica uma redução da inflamação articular (**Figura 18 A e estratégia de “gating” em ANEXO Figura 5**). Entretanto, ambas as estratégias de tratamento reduziram o número de macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ (**Figura 18 C**), incluindo a expressão de MHCII (**Figura 18 D**) e p-mTOR (**Figura 18 E**). Além disso, o tratamento com Rapamicina diminuiu o dano ósseo promovido no grupo LPS + *S. aureus* após 5 dias após a infecção (**Figura 19 A e B**), apesar de não interferir no influxo de células inflamatórias e na hiperplasia sinovial (**Figura 19 C e D**). Em conjunto, nossos achados mostram que a via do mTOR é uma sinalização intracelular crítica para a memória imune inata em macrófagos CX3CR1⁺ e a inibição dessa via pode contribuir para regular a gravidade da artrite infecciosa por *S. aureus* após inflamação articular prévia.

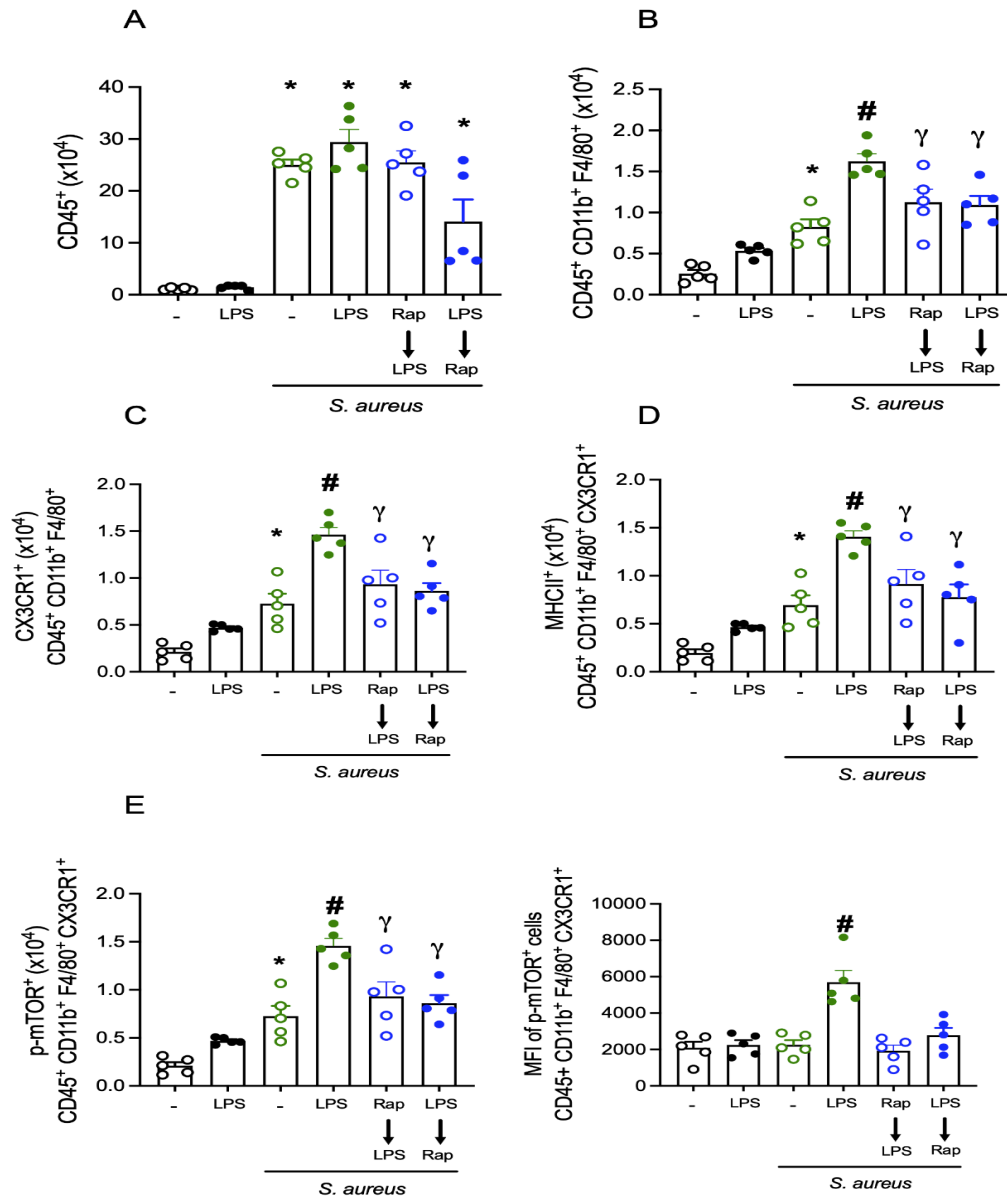


Figura 18: A inibição da via de mTOR promove diminuição de marcadores inflamatórios em macrófagos sinoviais CX3CR1⁺.

Os camundongos foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo foi previamente tratado, via oral, com Rapamicina (8mg/kg) (Rap>>LPS) e em seguida injetado LPS (200 ng/10 µL) ou solução salina (10 µL) na cavidade sinovial dos camundongos. Após 21 dias, *S. aureus* (10⁵ UFC/ 10 µL) ou solução salina (10 µL) foi injetado na mesma articulação. No segundo grupo foi injetado LPS (200 ng/ 10 µL) na cavidade sinovial de camundongos. Após 21 dias, camundongos foram tratados, via oral, com Rapamicina (8mg/kg) (LPS>>Rap) e em seguida injetado *S. aureus* (10⁵ CFU/ 10µL) na mesma articulação. Os tecidos sinoviais foram coletados 1 dia após a segunda injeção para análise das populações de células mieloides totais (A), macrófagos gerais (B) e macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ (C) que expressam MHCII (D) e p-mTOR (E) por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como a média ± SEM, com número experimental de 5 camundongos em cada grupo com duas repetições experimentais. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de p<0,05. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos duplamente injetados com salina), # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS e γ quando comparado aos grupos que receberam injeção simples de *S. aureus*, dupla injeção de LPS - *S. aureus* e injeção única de LPS.

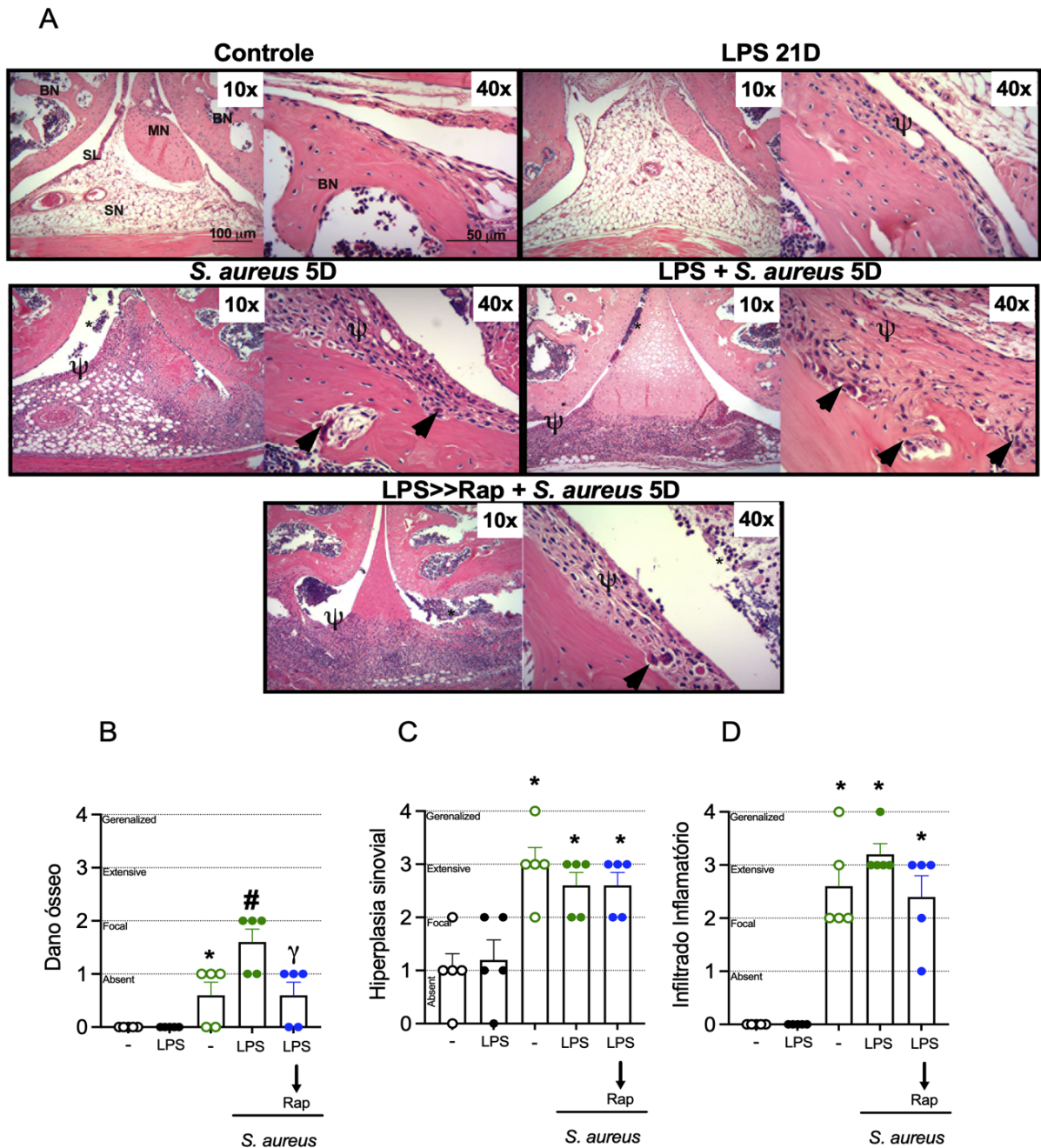


Figura 19: A inibição da via do mTOR promove diminuição do dano ósseo após a infecção por *S. aureus*.

Salina (10 μ L) ou LPS (200 ng/ 10 μ L) foi injetado na cavidade sinovial de camundongos. Após 21 dias, os camundongos foram tratados, via oral, com Rapamicina (8 mg/kg) (LPS>>Rap) e em seguida injetado salina (10 μ L) ou *S. aureus* (10^5 CFU/ 10 μ L) na mesma articulação. A cavidade sinovial foi coletada 1 e 5 dias após a segunda injeção para a análise de H&E. Imagens representativas da cavidade sinovial (SN – tecido sinovial; LS – revestimento sinovial sub-intima; MN – menisco; BN – osso; * - infiltrado inflamatório; cabeça de seta - dano ósseo; ψ - hiperplasia sinovial). Foram avaliados a presença de dano ósseo (A), hiperplasia sinovial (B) e infiltrado inflamatório (C). As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey com significância marginal de $p < 0,05$. * quando comparado com o grupo controle negativo (camundongos duplamente injetados com salina), # quando comparado com os grupos que receberam injeção única de *S. aureus* e injeção única de LPS e γ quando comparado aos grupos que receberam injeção simples de *S. aureus*, dupla injeção de LPS - *S. aureus* e injeção única de LPS.

5. DISCUSSÃO

O conceito de imunidade treinada desvenda mecanismos básicos para explicar como as células imunes inatas convencionais exibem maior responsividade a um desafio secundário, uma vez que tiveram contato prévio com um único agente imunoestimulante (Hajishengallis et al., 2021; M. M. Jeljeli & Adamopoulos, 2023; Ochando et al., 2023). Nos tecidos inflamados, as células residentes são constantemente estimuladas com o meio inflamatório, o que pode ser suficiente para provocar alterações profundas em seu metabolismo, levando ao desenvolvimento desse estado de memória inata (Badii et al., 2022; Dominguez-Andres & Netea, 2019; M. Jeljeli et al., 2019; Kloc et al., 2022). Essa condição poderia elucidar parcialmente a exacerbação do dano articular durante a artrite infecciosa em tecidos previamente afetados pela inflamação. Neste trabalho, mostramos que a inflamação desencadeada pela injeção de LPS seguido da infecção por *S. aureus* na articulação provocou profundas modificações no metabolismo dos sinoviócitos, principalmente dos macrófagos sinoviais CX3CR1⁺, consistentes com os mecanismos de imunidade treinada.

O reconhecimento de patógenos por células residentes de um tecido infectado cria rapidamente um ambiente inflamatório que é essencial para lidar com a infecção (Haslinger et al., 2003; Komatsu & Takayanagi, 2022; Rigby & DeLeo, 2012). Em caso de infecção bacteriana, como o *S. aureus*, há um intenso influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos, e a liberação de mediadores pró-inflamatórios que auxiliam na eliminação de patógenos (Boff, Crijns, et al., 2018; Boff, Oliveira, et al., 2018; Croft et al., 2019). No entanto, esses mediadores, em combinação com fatores de virulência do patógeno, potencializam a inflamação e o dano tecidual (Atcheson & Ward, 1978; Schneider et al., 2024; Zeng et al., 2020). Nas articulações sinoviais, células residentes ativadas, como os sinoviócitos, contribuem ativamente para o desenvolvimento das artrites. A hiperplasia do tecido sinovial, a expressão de proteínas de superfície e a secreção de mediadores pró-inflamatórios estão envolvidos no desenvolvimento de dor articular e dano tecidual, que, por sua vez, é desencadeado pelo processo de degradação óssea mediado por osteoclastos (W. Feng et al., 2019; Zeng et al., 2020).

Neste estudo, as articulações duplamente estimuladas exibiram um limiar de nocicepção articular prolongada e dano articular mais intenso em associação com maior ativação de sinoviócitos, como os macrófagos CX3CR1⁺, que expressaram importantes marcadores imunoestimulatórios e o RANKL, molécula fundamental no desenvolvimento de osteoclastos a partir de monócitos infiltrados. Esse achado sugere que a dupla estimulação promove

alterações nos sinoviócitos e os mesmos passam a responder mais intensamente diante de um estímulo secundário, no caso, o *S. aureus*.

O LPS é um primeiro estímulo comum utilizado nos estudos da imunidade treinada (de Laval et al., 2020; Owen et al., 2022). O motivo da espera de 21 dias entre o estímulo primário e secundário se deu pela necessidade de validação das modificações, tanto epigenéticas quanto metabólicas, após o primeiro estímulo (Cheng et al., 2014; Fanucchi & Mhlanga, 2019; Zahalka et al., 2022). Importante destacar que após o período de 21 dias da injeção de LPS, nenhum sinal de inflamação articular e nocicepção foi detectado (Figura 11 e resultados não apresentados). Esta é uma observação importante para evitar viés de somatório de mediadores inflamatórios e estimulação de fibras nociceptivas no grupo duplamente estimulado com LPS + *S. aureus*. No entanto, macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ exibiram marcadores clássicos de imunidade treinada 21 dias após a estimulação com LPS, como p-mTOR e do marcador epigenético H3K4me3, indicando que essas células, durante o período de repouso, retêm as modificações similares a uma memória inata e é potencializada após a infecção por *S. aureus*.

Diferentes publicações que investigaram como a imunidade treinada favorece um controle mais rápido das infecções geralmente se concentram nos mecanismos básicos envolvidos na ativação celular para lidar com patógenos (Badii et al., 2022; Mulder et al., 2019; Ziogas et al., 2023). Alguns exemplos vêm de estudos que mostram que indivíduos que foram vacinados BCG poderiam desenvolver formas menos graves da COVID-19 (Boppana et al., 2022; Dionato et al., 2022; Mohapatra et al., 2021; Sarfraz et al., 2021). No entanto, há menos estudos que focam na possibilidade de desenvolvimento de uma inflamação tecidual excessiva e suas consequências que levam a dano e disfunção tecidual. Mostramos que a dupla estimulação promove aumento dos marcadores inflamatórios dos sinoviócitos e acúmulo de neutrófilos no grupo LPS + *S. aureus*. Porém, o aumento da inflação não favorece a eliminação do *S. aureus* até o 5º dia, uma vez que o número de colônias bacterianas recuperadas das articulações tibiofemorais é semelhante entre os grupos com estimulação única por *S. aureus* ou duplo estimulados. O aumento da ativação celular observado resultou um efeito prejudicial na articulação inflamada, com aumento do dano tecidual e aumento da resposta nociceptiva, mostrando uma resposta imune ineficiente e não protetora contra este patógeno. Essa resistência pode ser explicada através dos mecanismos de evasão do patógeno às pressões exercidas pelo ambiente inflamatório através da formação de biofilmes, além da internalização do *S. aureus* em células profissionais e não profissionais (Chan et al., 2018), não avaliados neste trabalho. Além disso, a indução de imunidade treinada parece auxiliar na resistência do *S. aureus*. Em um modelo de mastite bovina, a indução de imunidade treinada contribuiu para a persistência

da infecção secundária por *S. aureus* no tratamento com o antibiótico rifampicina, com redução da eficácia do tratamento e aumento da gravidade da doença. A persistência da infecção por *S. aureus* foi mediada pelo acúmulo de fumarato provocado pela imunidade treinada. Com a combinação de metformina e rifampicina, houve a eliminação das populações de *S. aureus* resistentes e diminuiu a gravidade da inflamação (Lin et al., 2024).

As populações celulares contidas no tecido sinovial consistem em sinoviócitos semelhantes a macrófagos e fibroblastos, que se organizam nas camadas de revestimento íntima e sub-íntima (Culemann et al., 2019; Falconer et al., 2018; Tsaltzkan & Firestein, 2022). No nosso estudo, macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ apresentaram modificações substanciais e consistentes com o fenômeno de imunidade treinada, porém esse mesmo perfil não foi observado em na população de fibroblastos sinoviais. Os macrófagos CX3CR1⁺ estão presentes na camada íntima do tecido sinovial e parecem ser derivados da hematopoese embrionária precoce, com funções homeostáticas por formarem uma estrutura semelhante a uma barreira que isola as articulações (Culemann et al., 2019; Li et al., 2021). A população de macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ são renovados a partir da população de macrófagos sinoviais intersticiais CX3CR1⁻ contidos na camada sub-íntima, através de estímulos que medeiam a sua migração para a camada íntima, e por sua vez, passam a expressar CX3CR1⁺ (Culemann, et al., 2019).

O CX3CR1 é um receptor de quimiocinas que reconhece o ligante exclusivo CX3CL1 (Helmke et al., 2019). Avaliamos também se a injeção de CX3CL1 poderia ser suficiente para promover a imunidade treinada nesses macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ utilizando um protocolo semelhante, apenas substituindo LPS como o primeiro estímulo. Embora a estimulação previa com a quimiocina CX3CL1 tenha estimulado a migração de células mononucleares para a cavidade sinovial 1 dia após a injeção de *S. aureus*, não observamos diferenças nos aspectos da imunidade treinada no grupo duplamente estimulado CX3CL1 + *S. aureus*. O eixo CX3CL1-CX3CR1 é fundamental no tráfico de leucócitos e na sobrevivência das células imunes em certas circunstâncias (Luo et al., 2019). Como mostrado em nossos resultados, a presença de uma inflamação articular através da injeção de CX3CL1 é devido ao seu papel quimioatraente. Sendo assim, essa quimiocina parece ser ineficiente na promoção de modificações epigenéticas e metabólicas que caracterizam o fenômeno de imunidade treinada. Com isso, a condição inflamatória nas articulações, desencadeada aqui pela injeção de LPS, parece ser o componente crítico para alterar o comportamento das células sinoviais ao seu estado imunologicamente treinado.

Os altos níveis de glicólise em monócitos/macrófagos treinados são necessários para manter as células treinadas preparadas para uma produção robusta e rápida de citocinas pró-

inflamatórias devido à modificação epigenética na histona, como a trimetilação na histona H3 (H3K4me3) (Dai et al., 2020; Saeed et al., 2014). Os marcadores de histona mostraram-se importantes na imunidade treinada, sendo o marcador H3K4me3 como principal indutor de abertura da cromatina e aumento da transcrição gênica (Arts et al., 2016; Kleinnijenhuis et al., 2012). Evidenciando o papel das modificações epigenéticas no metabolismo energético, o treinamento de monócitos com BCG aumentou a presença do marcador H3K4me3 nos promotores dos genes de *mtor*, *hk2* e *pfkp*, além de estar presente nos promotores de genes inflamatórios, como *tnfa* e *il6*. No entanto, a inibição de monócitos treinados com inibidores do metabolismo da glutamina (BPTES) ou da via glicolítica e de mTOR (Rapamicina), houve reversão das alterações epigenéticas no local promotor de *tnfa* e *il6* para a condição basal, destacando que as alterações epigenéticas e metabólicas estão entrelaçadas e altamente dependentes umas das outras (Arts et al., 2015). Apesar do aumento do marcador H3K4me3 em macrófagos sinoviais CX3CR1⁺, em nosso trabalho não foi possível comprovar em quais genes inflamatórios o marcador epigenético pode estar depositado, sendo necessário a realização de experimentos, como ChIPseq, para a determinação dos genes inflamatórios envolvidos.

Com a eminente presença de uma resposta inflamatória exacerbada promovida pela população de macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ treinados, a reversão do fenótipo treinado da imunidade poderia ser útil para evitar os danos promovidos pela infecção por *S aureus*. Assim, utilizamos a Rapamicina (Sirolimus), um potente e específico inibidor de mTOR que se liga a proteína FKBP12 e atua explicitamente como um inibidor alostérico do mTORC1 (Edwards & Wandless, 2007; Wang et al., 2021). Seu uso está relacionado a inibição da imunidade treinada, através da redução dos níveis de lactato, NAD⁺/NADH e de HIF-1 α (Cheng et al., 2014; Dang et al., 2023; Laplante & Sabatini, 2012; Wang et al., 2021).

O tratamento com Rapamicina promoveu a diminuição da população de macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ e de marcadores inflamatórios. Uma das questões relevantes que tivemos foi se o tratamento com Rapamicina poderia ser feito antes do primeiro estímulo ou antes do estímulo secundário e quais seriam suas consequências. Nossos resultados mostraram que em ambas as estratégias há diminuição de marcadores inflamatórios, uma vez que a Rapamicina age diminuindo os níveis de metabólitos produzidos nas vias metabólicas, que por sua vez, são utilizados como substratos para as marcações epigenéticas, como metilação e acetilação (Dai et al., 2020; Dang et al., 2023; Fanucchi et al., 2021; Wang et al., 2021). Interessantemente, o tratamento com Rapamicina foi capaz de reduzir o dano ósseo promovido pela infecção de *S. aureus*, que realça o seu papel regulatório em respostas inflamatórias exacerbadas (Cheng et

al., 2014). Alguns trabalhos já demonstraram que o inibidor de mTOR é capaz de inibir o processo de osteoclastogênese e prevenir a reabsorção óssea mediada pela presença de altas concentrações de citocinas e da produção de RANKL (Feng et al., 2023; Huynh & Wan, 2018). Importante destacar que apesar da diminuição do dano ósseo, o tratamento não interferiu no processo inflamatório geral, já que não observamos diminuição do infiltrado inflamatório e na hiperplasia sinovial, que é importante para o controle do *S. aureus*.

6. CONCLUSÃO

O fenótipo de imunidade treinada apresentado em macrófagos sinoviais CX3CR1⁺ pareceu ser responsável pelo agravamento da inflamação tecidual e dano causado por *S. aureus*, mas sem vantagem na eliminação deste patógeno. Assim, esses achados sugerem outra possibilidade para explicar o que acontece com as células sinoviais durante a artrite, mesmo que seja uma inflamação transitória como a causada pela injeção de LPS, e como esses fatores predisõem ao agravamento de uma artrite secundária causada por um patógeno (**Figura 20**).

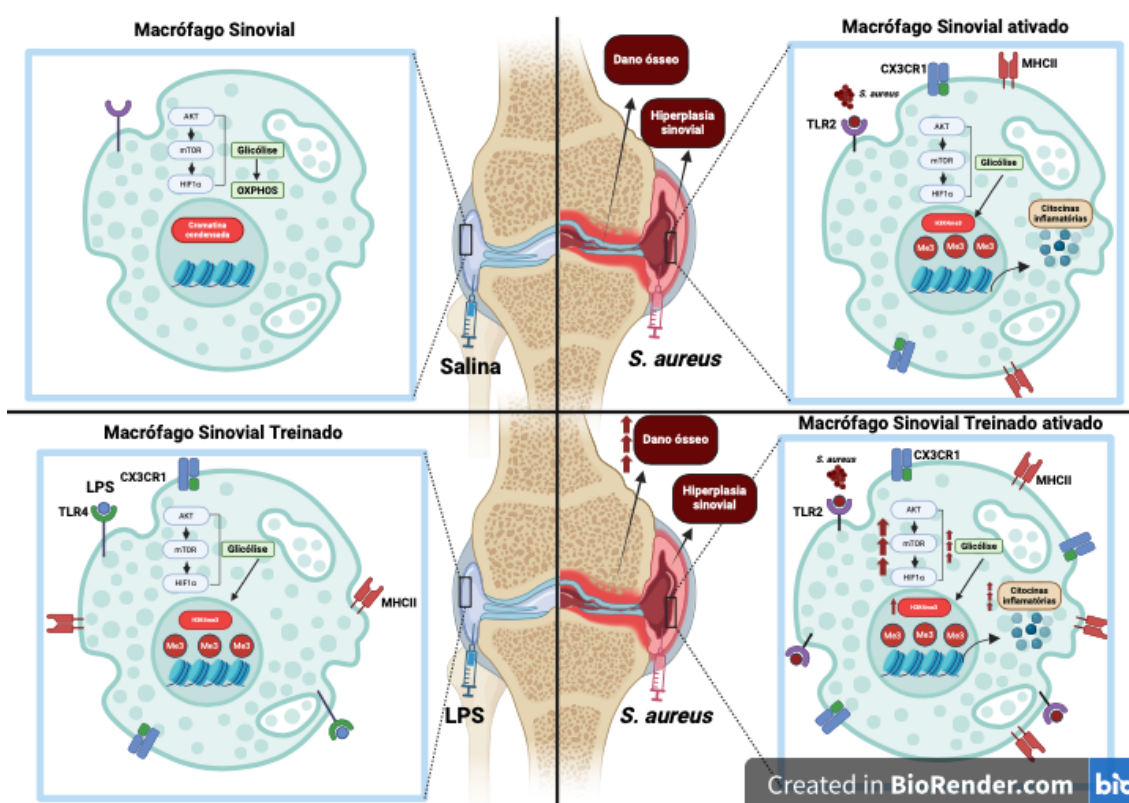


Figura 20: Resumo do processo da imunidade treinada na articulação sinovial

Os macrófagos sinoviais contidos na camada íntima em estado estacionário possuem baixa necessidade energética, com a via de obtenção de energia deslocada para a fosforilação oxidativa (OXPHOS), com alta condensação da cromatina e baixa atividade transcricional. Após 21 dias, os macrófagos estimulados com LPS mantiveram um aumento basal dos componentes da via glicolítica, com uma cromatina menos condensada, com deposição da modificação epigenética H3K4me3 e aumento dos receptores de CX3CR1 e MHCII. A ativação dos macrófagos em estado estacionário com *S. aureus* promove aumento dos componentes da via glicolítica, com abertura da cromatina e deposição de H3K4me3, que por sua vez resulta na produção de citocinas inflamatórias e aumento na expressão de MHCII, importantes em resposta aos patógenos. O treinamento com LPS e posterior infecção com *S. aureus* promove alterações significativas nos macrófagos sinoviais, com aumento dos componentes da via do mTOR, que resulta no aumento da via glicolítica e maior deposição do marcador H3K4me3. Essas alterações resultam no aumento da atividade transcricional, aumento na produção de citocinas inflamatórias e na expressão dos marcadores MHCII e TLR2 em resposta ao *S. aureus*, além do aumento da expressão de CX3CR1. Esse conjunto de alterações promove aumento no dano ósseo (Figura criada no BioRender.com).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aday, A. W., Zhu, L. J., Lakshmanan, A., Wang, J., & Lawson, N. D. (2011). Identification of cis regulatory features in the embryonic zebrafish genome through large-scale profiling of H3K4me1 and H3K4me3 binding sites. *Developmental Biology*, 357(2), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.007>
- Aitkens, L., Winn, M., Waller, J. L., Huber, L., Baer, S. L., Mohammed, A., Kheda, M., Tran, S., Siddiqui, B., Padala, S., Colombo, R. E., & Bollag, W. B. (2022). Septic Arthritis in the End-Stage Renal Disease Population. *Journal of Investigative Medicine*, 70(2), 383–390. <https://doi.org/10.1136/jim-2021-001869>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Arts, R. J. W., Blok, B. A., Aaby, P., Joosten, L. A. B., de Jong, D., van der Meer, J. W. M., Benn, C. S., van Crevel, R., & Netea, M. G. (2015). Long-term in vitro and in vivo effects of γ -irradiated BCG on innate and adaptive immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 98(6), 995–1001. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MA0215-059R>
- Arts, R. J. W., Carvalho, A., La Rocca, C., Palma, C., Rodrigues, F., Silvestre, R., Kleinnijenhuis, J., Lachmandas, E., Gonçalves, L. G., Belinha, A., Cunha, C., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Matarese, G., van Crevel, R., & Netea, M. G. (2016). Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Reports*, 17(10), 2562–2571. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.011>
- Atcheson, S. G., & Ward, J. R. (1978). Acute hematogenous osteomyelitis progressing to septic synovitis and eventual pyarthrosis. the vascular pathway. *Arthritis & Rheumatism*, 21(8), 968–971. <https://doi.org/10.1002/art.1780210814>
- Badii, M., Gaal, O., Popp, R. A., Crişan, T. O., & Joosten, L. A. B. (2022). Trained immunity and inflammation in rheumatic diseases. In *Joint Bone Spine* (Vol. 89, Issue 4). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2022.105364>
- Bekeredjian-Ding, I., Stein, C., & Uebele, J. (2015). *The Innate Immune Response Against Staphylococcus aureus* (pp. 385–418). https://doi.org/10.1007/82_2015_5004
- Bekkering, S., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Netea, M. G., & Riksen, N. P. (2015). The Epigenetic Memory of Monocytes and Macrophages as a Novel Drug Target in Atherosclerosis. *Clinical Therapeutics*, 37(4), 914–923. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.01.008>

- Boff, D., Crijns, H., Teixeira, M., Amaral, F., & Proost, P. (2018). Neutrophils: Beneficial and Harmful Cells in Septic Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 468. <https://doi.org/10.3390/ijms19020468>
- Boff, D., Oliveira, V. L. S., Queiroz Junior, C. M., Galvão, I., Batista, N. V., Gouwy, M., Menezes, G. B., Cunha, T. M., Verri Junior, W. A., Proost, P., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2020). Lipoxin A₄ impairs effective bacterial control and potentiates joint inflammation and damage caused by *Staphylococcus aureus* infection. *The FASEB Journal*, 34(9), 11498–11510. <https://doi.org/10.1096/fj.201802830RR>
- Boff, D., Oliveira, V. L. S., Queiroz Junior, C. M., Silva, T. A., Allegretti, M., Verri, W. A., Proost, P., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2018). CXCR2 is critical for bacterial control and development of joint damage and pain in *Staphylococcus aureus* -induced septic arthritis in mouse. *European Journal of Immunology*, 48(3), 454–463. <https://doi.org/10.1002/eji.201747198>
- Boppana, T. K., Mittal, S., Madan, K., Mohan, A., Hadda, V., & Guleria, R. (2022). Tuberculosis endemicity and BCG vaccination: Protection against COVID-19. *Monaldi Archives for Chest Disease*. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2022.2281>
- Borregaard, N., Sørensen, O. E., & Theilgaard-Mönch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology*, 28(8), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.06.002>
- Chan, L. C., Rossetti, M., Miller, L. S., Filler, S. G., Johnson, C. W., Lee, H. K., Wang, H., Gjertson, D., Fowler, V. G., Reed, E. F., Yeaman, M. R., Bayer, A. S., Chan, L. C., Chang, Y.-L., Filler, S. G., Fowler, V. G., Gjertson, D., Hoffmann, A., Medie, F., ... Yeaman, M. R. (2018). Protective immunity in recurrent *Staphylococcus aureus* infection reflects localized immune signatures and macrophage-conferred memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.1808353115>
- Cheng, S.-C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., Saeed, S., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Martens, J. H. A., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Manjeri, G. R., Li, Y., Ifrim, D. C., Arts, R. J. W., van der Veer, B. M. J. W., Deen, P. M. T., Logie, C., O'Neill, L. A., Willems, P., ... Netea, M. G. (2014a). mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345(6204). <https://doi.org/10.1126/science.1250684>
- Cheng, S.-C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., Saeed, S., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Martens, J. H. A., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Manjeri, G. R., Li, Y., Ifrim, D. C., Arts, R. J. W., van der Veer, B. M. J. W., Deen, P. M. T., Logie, C., O'Neill, L. A.,

- Willems, P., ... Netea, M. G. (2014b). mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345(6204). <https://doi.org/10.1126/science.1250684>
- Christ, A., Günther, P., Lauterbach, M. A. R., Duewell, P., Biswas, D., Pelka, K., Scholz, C. J., Oosting, M., Haendler, K., Baßler, K., Klee, K., Schulte-Schrepping, J., Ulas, T., Moorlag, S. J. C. F. M., Kumar, V., Park, M. H., Joosten, L. A. B., Groh, L. A., Riksen, N. P., ... Latz, E. (2018). Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell*, 172(1–2), 162–175.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.013>
- Ciarlo, E., Heinonen, T., Théroude, C., Asgari, F., Le Roy, Di., Netea, M. G., & Roger, T. (2020). Trained Immunity Confers Broad-Spectrum Protection against Bacterial Infections. *Journal of Infectious Diseases*, 222(11), 1869–1881. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz692>
- Cohen, E., Katz, T., Rahamim, E., Bulkowstein, S., Weisel, Y., Leibovitz, R., Fruchtman, Y., & Leibovitz, E. (2020). Septic arthritis in children: Updated epidemiologic, microbiologic, clinical and therapeutic correlations. *Pediatrics & Neonatology*, 61(3), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2020.02.006>
- Colavite, P., & Sartori, A. (2014). Septic arthritis: immunopathogenesis, experimental models and therapy. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-19>
- Croft, A. P., Campos, J., Jansen, K., Turner, J. D., Marshall, J., Attar, M., Savary, L., Wehmeyer, C., Naylor, A. J., Kemble, S., Begum, J., Dürholz, K., Perlman, H., Barone, F., McGettrick, H. M., Fearon, D. T., Wei, K., Raychaudhuri, S., Korsunsky, I., ... Buckley, C. D. (2019). Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature*, 570(7760), 246–251. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1263-7>
- Culemann, S., Grüneboom, A., & Krönke, G. (2019). *Origin and function of synovial macrophage subsets during inflammatory joint disease* (pp. 75–98). <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2019.08.006>
- Culemann, S., Grüneboom, A., Nicolás-Ávila, J. Á., Weidner, D., Lämmle, K. F., Rothe, T., Quintana, J. A., Kirchner, P., Krljanac, B., Eberhardt, M., Ferrazzi, F., Kretzschmar, E., Schicht, M., Fischer, K., Gelse, K., Faas, M., Pfeifle, R., Ackermann, J. A., Pachowsky, M., ... Krönke, G. (2019). Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature*, 572(7771), 670–675. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1471-1>
- Dai, Z., Ramesh, V., & Locasale, J. W. (2020). The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nature Reviews Genetics*, 21(12), 737–753. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0270-8>

- Dang, B., Gao, Q., Zhang, L., Zhang, J., Cai, H., Zhu, Y., Zhong, Q., Liu, J., Niu, Y., Mao, K., Xiao, N., Liu, W.-H., Lin, S., Huang, J., Huang, S. C.-C., Ho, P.-C., & Cheng, S.-C. (2023). The glycolysis/HIF-1 α axis defines the inflammatory role of IL-4-primed macrophages. *Cell Reports*, 42(5), 112471. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112471>
- de Laval, B., Maurizio, J., Kandalla, P. K., Brisou, G., Simonnet, L., Huber, C., Gimenez, G., Matcovitch-Natan, O., Reinhardt, S., David, E., Mildner, A., Leutz, A., Nadel, B., Bordi, C., Amit, I., Sarrazin, S., & Sieweke, M. H. (2020). C/EBP β -Dependent Epigenetic Memory Induces Trained Immunity in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 26(5), 657-674.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.017>
- Dionato, F. A. V., Jalalizadeh, M., Buosi, K., Visacri, M. B., Dal Col, L. S. B., Giacomelli, C. F., Leme, P. A. F., Maia, C. L., Moriel, P., & Reis, L. O. (2022). BCG vaccine safety in COVID-19 convalescent adults: BATTLE a randomized controlled trial. *Vaccine*, 40(32), 4603–4608. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.06.039>
- Divangahi, M., Aaby, P., Khader, S. A., Barreiro, L. B., Bekkering, S., Chavakis, T., van Crevel, R., Curtis, N., DiNardo, A. R., Dominguez-Andres, J., Duivenvoorden, R., Fanucchi, S., Fayad, Z., Fuchs, E., Hamon, M., Jeffrey, K. L., Khan, N., Joosten, L. A. B., Kaufmann, E., ... Netea, M. G. (2021). Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nature Immunology*, 22(1), 2–6. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00845-6>
- Dominguez-Andres, J., & Netea, M. G. (2019). Long-term reprogramming of the innate immune system. In *Journal of Leukocyte Biology* (Vol. 105, Issue 2, pp. 329–338). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-104R>
- Donders, C. M., Spaans, A. J., van Wering, H., & van Bergen, C. J. (2022). Developments in diagnosis and treatment of paediatric septic arthritis. *World Journal of Orthopedics*, 13(2), 122–130. <https://doi.org/10.5312/wjo.v13.i2.122>
- Dunlop, D. D., Manheim, L. M., Yelin, E. H., Song, J., & Chang, R. W. (2003). The costs of arthritis. *Arthritis Care & Research*, 49(1), 101–113. <https://doi.org/10.1002/art.10913>
- Edwards, S. R., & Wandless, T. J. (2007). The Rapamycin-binding Domain of the Protein Kinase Mammalian Target of Rapamycin Is a Destabilizing Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13395–13401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700498200>
- Erkilinc, M., Gilmore, A., Weber, M., & Mistovich, R. J. (2021). Current Concepts in Pediatric Septic Arthritis. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 29(5), 196–206. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-20-00835>

- Falconer, J., Murphy, A. N., Young, S. P., Clark, A. R., Tiziani, S., Guma, M., & Buckley, C. D. (2018). Review: Synovial Cell Metabolism and Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 70(7), 984–999. <https://doi.org/10.1002/art.40504>
- Fanucchi, S., Domínguez-Andrés, J., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., & Mhlanga, M. M. (2021). The Intersection of Epigenetics and Metabolism in Trained Immunity. In *Immunity* (Vol. 54, Issue 1, pp. 32–43). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.011>
- Fanucchi, S., & Mhlanga, M. M. (2019). Lnc-ing Trained Immunity to Chromatin Architecture. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00002>
- Favero, M., Schiavon, F., Riato, L., Carraro, V., & Punzi, L. (2008). Rheumatoid arthritis is the major risk factor for septic arthritis in rheumatological settings. *Autoimmunity Reviews*, 8(1), 59–61. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.07.018>
- Feng, C., Liu, Y., Zhang, B.-Y., Zhang, H., Shan, F.-Y., Li, T.-Q., Zhao, Z.-N., Wang, X.-X., & Zhang, X.-Y. (2023). Rapamycin Inhibits Osteoclastogenesis and Prevents LPS-Induced Alveolar Bone Loss by Oxidative Stress Suppression. *ACS Omega*, 8(23), 20739–20754. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01289>
- Feng, W., Guo, J., & Li, M. (2019). RANKL-independent modulation of osteoclastogenesis. *Journal of Oral Biosciences*, 61(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.job.2019.01.001>
- Feuerstein, R., Forde, A. J., Lohrmann, F., Kolter, J., Ramirez, N. J., Zimmermann, J., de Agüero, M. G., & Henneke, P. (2020). Resident macrophages acquire innate immune memory in staphylococcal skin infection. *ELife*, 9, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.55602>
- Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, 46(2), 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>
- Frišćić, J., Böttcher, M., Reinwald, C., Bruns, H., Wirth, B., Popp, S.-J., Walker, K. I., Ackermann, J. A., Chen, X., Turner, J., Zhu, H., Seyler, L., Euler, M., Kirchner, P., Krüger, R., Ekici, A. B., Major, T., Aust, O., Weidner, D., ... Hoffmann, M. H. (2021). The complement system drives local inflammatory tissue priming by metabolic reprogramming of synovial fibroblasts. *Immunity*, 54(5), 1002–1021.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.003>
- Geisler, S. J., & Paro, R. (2015). Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Development*, 142(17), 2876–2887. <https://doi.org/10.1242/dev.120030>
- George, J., Chandy, V. J., Premnath, J., Hariharan, T. D., Oommen, A. T., Balaji, V., & Poonnoose, P. M. (2019). Microbiological Profile of Septic Arthritis in Adults: Lessons Learnt and Treatment Strategies. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 37(1), 29–33. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_19_134

- Gohda, J., Matsumura, T., & Inoue, J. (2004). Cutting Edge: TNFR-Associated Factor (TRAF) 6 Is Essential for MyD88-Dependent Pathway but Not Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β (TRIF)-Dependent Pathway in TLR Signaling. *The Journal of Immunology*, 173(5), 2913–2917. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2913>
- Goldenberg, D. L. (1989). Infectious arthritis complicating rheumatoid arthritis and other chronic rheumatic disorders. *Arthritis & Rheumatism*, 32(4), 496–502. <https://doi.org/10.1002/anr.1780320422>
- Hajishengallis, G., Li, X., & Chavakis, T. (2021). Immunometabolic control of hematopoiesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 77, 100923. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100923>
- Hajishengallis, G., Netea, M. G., & Chavakis, T. (2023). Innate immune memory, trained immunity and nomenclature clarification. In *Nature Immunology* (Vol. 24, Issue 9, pp. 1393–1394). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01595-x>
- Haslinger, B., Strangfeld, K., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., & Sinha, B. (2003). Staphylococcus aureus α -toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor- α and the mitochondrial death pathway. *Cellular Microbiology*, 5(10), 729–741. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00317.x>
- He, M., Arthur Vithran, D. T., Pan, L., Zeng, H., Yang, G., Lu, B., & Zhang, F. (2023). An update on recent progress of the epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of acute septic arthritis: a review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1193645>
- Helmke, A., Nordlohne, J., Balzer, M. S., Dong, L., Rong, S., Hiss, M., Shushakova, N., Haller, H., & von Vietinghoff, S. (2019). CX3CL1–CX3CR1 interaction mediates macrophage-mesothelial cross talk and promotes peritoneal fibrosis. *Kidney International*, 95(6), 1405–1417. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.12.030>
- Holzmeister, A., Frazzetta, J., Yuan, F. F. N., Cheronas, A., Summers, H., Cohen, J., & Lack, W. D. (2021). Evaluation for septic arthritis of the native adult knee is aided by multivariable assessment. *The American Journal of Emergency Medicine*, 46, 614–618. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.11.048>
- Horng, T. (2015). mTOR trains heightened macrophage responses. *Trends in Immunology*, 36(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.11.004>
- Horowitz, D. L., Katzap, E., Horowitz, S., & Barilla-LaBarca, M.-L. (2011). Approach to septic arthritis. *American Family Physician*, 84(6), 653–660.
- Huynh, H., & Wan, Y. (2018). mTORC1 impedes osteoclast differentiation via calcineurin and NFATc1. *Communications Biology*, 1(1), 29. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0028-4>

- Ilharreborde, B. (2015). Sequelae of pediatric osteoarticular infection. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 101(1), S129–S137. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2014.07.029>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jeljeli, M. M., & Adamopoulos, I. E. (2023). Innate immune memory in inflammatory arthritis. In *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41584-023-01009-0>
- Jeljeli, M., Riccio, L. G. C., Doridot, L., Chêne, C., Nicco, C., Chouzenoux, S., Deletang, Q., Allanore, Y., Kavian, N., & Batteux, F. (2019). Trained immunity modulates inflammation-induced fibrosis. *Nature Communications*, 10(1), 5670. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13636-x>
- Jeyanathan, M., Vaseghi-Shanjani, M., Afkhami, S., Grondin, J. A., Kang, A., D'Agostino, M. R., Yao, Y., Jain, S., Zganiacz, A., Kroezen, Z., Shanmuganathan, M., Singh, R., Dvorkin-Gheva, A., Britz-McKibbin, P., Khan, W. I., & Xing, Z. (2022). Parenteral BCG vaccine induces lung-resident memory macrophages and trained immunity via the gut–lung axis. *Nature Immunology*, 23(12), 1687–1702. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01354-4>
- Joseph, J. (2022). Trained Immunity as a Prospective Tool against Emerging Respiratory Pathogens. *Vaccines*, 10(11), 1932. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111932>
- Jung, S.-W., Kim, D.-H., Shin, S.-J., Kang, B.-Y., Eho, Y.-J., & Yang, S.-W. (2018). Septic arthritis associated with systemic sepsis. *International Orthopaedics*, 42(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00264-017-3565-4>
- Kaplan, M. J., & Radic, M. (2012). Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2689–2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
- Kaufmann, E., Sanz, J., Dunn, J. L., Khan, N., Mendonça, L. E., Pacis, A., Tzelepis, F., Pernet, E., Dumaine, A., Grenier, J.-C., Mailhot-Léonard, F., Ahmed, E., Belle, J., Besla, R., Mazer, B., King, I. L., Nijnik, A., Robbins, C. S., Barreiro, L. B., & Divangahi, M. (2018). BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell*, 172(1–2), 176–190.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.031>
- Keating, S. E., Maloney, G. M., Moran, E. M., & Bowie, A. G. (2007). IRAK-2 Participates in Multiple Toll-like Receptor Signaling Pathways to NFκB via Activation of TRAF6 Ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33435–33443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705266200>

- Kennedy, N., Chambers, S. T., Nolan, I., Gallagher, K., Werno, A., Browne, M., & Stamp, L. K. (2015). Native Joint Septic Arthritis: Epidemiology, Clinical Features, and Microbiological Causes in a New Zealand Population. *The Journal of Rheumatology*, 42(12), 2392–2397. <https://doi.org/10.3899/jrheum.150434>
- Kim, T. W., Staschke, K., Bulek, K., Yao, J., Peters, K., Oh, K.-H., Vandenburg, Y., Xiao, H., Qian, W., Hamilton, T., Min, B., Sen, G., Gilmour, R., & Li, X. (2007). A critical role for IRAK4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(5), 1025–1036. <https://doi.org/10.1084/jem.20061825>
- Kleinnijenhuis, J., Quintin, J., Preijers, F., Joosten, L. A. B., Ifrim, D. C., Saeed, S., Jacobs, C., van Loenhout, J., de Jong, D., Stunnenberg, H. G., Xavier, R. J., van der Meer, J. W. M., van Crevel, R., & Netea, M. G. (2012). Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), 17537–17542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109>
- Klemm, S. L., Shipony, Z., & Greenleaf, W. J. (2019). Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics*, 20(4), 207–220. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0089-8>
- Kloc, M., Kubiak, J. Z., Zdanowski, R., & Ghobrial, R. M. (2022). Memory Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 38. <https://doi.org/10.3390/ijms24010038>
- Komatsu, N., & Takayanagi, H. (2022). Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis — immune cell–fibroblast–bone interactions. *Nature Reviews Rheumatology*, 18(7), 415–429. <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00793-5>
- Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*, 149(2), 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Lauberth, S. M., Nakayama, T., Wu, X., Ferris, A. L., Tang, Z., Hughes, S. H., & Roeder, R. G. (2013). H3K4me3 Interactions with TAF3 Regulate Preinitiation Complex Assembly and Selective Gene Activation. *Cell*, 152(5), 1021–1036. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.052>
- Li, J., Zhou, H., Fu, X., Zhang, M., Sun, F., & Fan, H. (2021). Dynamic role of macrophage CX3CR1 expression in inflammatory bowel disease. In *Immunology Letters* (Vol. 232, pp. 39–44). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.02.001>
- Li, N., Gao, J., Mi, L., Zhang, G., Zhang, L., Zhang, N., Huo, R., Hu, J., & Xu, K. (2020). Synovial membrane mesenchymal stem cells: past life, current situation, and application in bone and joint diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 381. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01885-3>

- Lin, X.-Q., Liu, Z.-Z., Zhou, C.-K., Zhang, L., Gao, Y., Luo, X.-Y., Zhang, J.-G., Chen, W., & Yang, Y.-J. (2024). Trained immunity in recurrent *Staphylococcus aureus* infection promotes bacterial persistence. *PLOS Pathogens*, 20(1), e1011918. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011918>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Lundahl, M. LE, Mitermite, M., Ryan, D. G., Case, S., Williams, N. C., Yang, M., Lynch, R. I., Lagan, E., Lebre, F. M., Gorman, A. L., Stojkovic, B., Bracken, A. P., Frezza, C., Sheedy, F. J., Scanlan, E. M., O'Neill, L. A., Gordon, S. V., & Lavelle, E. C. (2022). Macrophage innate training induced by IL-4 and IL-13 activation enhances OXPHOS driven anti-mycobacterial responses. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.74690>
- Luo, P., Chu, S., Zhang, Z., Xia, C., & Chen, N. (2019). Fractalkine/CX3CR1 is involved in the cross-talk between neuron and glia in neurological diseases. *Brain Research Bulletin*, 146, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.11.017>
- Margaretten, M. E., Kohlwes, J., Moore, D., & Bent, S. (2007). Does This Adult Patient Have Septic Arthritis? *JAMA*, 297(13). <https://doi.org/10.1001/jama.297.13.1478>
- Maruotti, N., Grano, M., Colucci, S., d'Onofrio, F., & Cantatore, F. P. (2011). Osteoclastogenesis and arthritis. *Clinical and Experimental Medicine*, 11(3), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s10238-010-0117-2>
- Mathews, C. J., Weston, V. C., Jones, A., Field, M., & Coakley, G. (2010). Bacterial septic arthritis in adults. *The Lancet*, 375(9717), 846–855. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61595-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61595-6)
- McBride, S., Mowbray, J., Caughey, W., Wong, E., Luey, C., Siddiqui, A., Alexander, Z., Playle, V., Askelund, T., Hopkins, C., Quek, N., Ross, K., Orec, R., Mistry, D., Coomarasamy, C., & Holland, D. (2020). Epidemiology, Management, and Outcomes of Large and Small Native Joint Septic Arthritis in Adults. *Clinical Infectious Diseases*, 70(2), 271–279. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz265>
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2017). Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 389(10086), 2328–2337. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31472-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31472-1)
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>

- Mohapatra, P. R., Mishra, B., & Behera, B. (2021). BCG vaccination induced protection from COVID-19. *Indian Journal of Tuberculosis*, 68(1), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.08.004>
- Montgomery, N. I., & Epps, H. R. (2017). Pediatric Septic Arthritis. *Orthopedic Clinics of North America*, 48(2), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2016.12.008>
- Mulder, W. J. M., Ochando, J., Joosten, L. A. B., Fayad, Z. A., & Netea, M. G. (2019). Therapeutic targeting of trained immunity. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(7), 553–566. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0025-4>
- Nagao, A., Kobayashi, M., Koyasu, S., Chow, C. C. T., & Harada, H. (2019). HIF-1-dependent reprogramming of glucose metabolic pathway of cancer cells and its therapeutic significance. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20020238>
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, W. J. M., Riksen, N. P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Stabell Benn, C., Sun, J. C., Xavier, R. J., & Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>
- Netea, M. G., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Domínguez-Andrés, J., Curtis, N., van Crevel, R., van de Veerdonk, F. L., & Bonten, M. (2020). Trained Immunity: a Tool for Reducing Susceptibility to and the Severity of SARS-CoV-2 Infection. *Cell*, 181(5), 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.042>
- Netea, M. G., Quintin, J., & Van Der Meer, J. W. M. (2011). Trained immunity: A memory for innate host defense. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 9, Issue 5, pp. 355–361). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>
- Nossent, J. C., Raymond, W. D., Keen, H. I., & Inderjeeth, C. A. (2021). Septic Arthritis in Children: A Longitudinal Population-Based Study in Western Australia. *Rheumatology and Therapy*, 8(2), 877–888. <https://doi.org/10.1007/s40744-021-00307-x>
- Novakovic, B., Habibi, E., Wang, S.-Y., Arts, R. J. W., Davar, R., Megchelenbrink, W., Kim, B., Kuznetsova, T., Kox, M., Zwaag, J., Matarese, F., van Heeringen, S. J., Janssen-Megens, E. M., Sharifi, N., Wang, C., Keramati, F., Schoonenberg, V., Flicek, P., Clarke, L., ... Stunnenberg, H. G. (2016). β -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. *Cell*, 167(5), 1354–1368.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.034>

- Ochando, J., Mulder, W. J. M., Madsen, J. C., Netea, M. G., & Duivenvoorden, R. (2023). Trained immunity — basic concepts and contributions to immunopathology. *Nature Reviews Nephrology*, 19(1), 23–37. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00633-5>
- Okubo, Y., Nochioka, K., & Marcia, T. (2017). Nationwide survey of pediatric septic arthritis in the United States. *Journal of Orthopaedics*, 14(3), 342–346. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2017.06.004>
- O'Neill, L. A. J., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 353–364. <https://doi.org/10.1038/nri2079>
- Orr, C., Vieira-Sousa, E., Boyle, D. L., Buch, M. H., Buckley, C. D., Cañete, J. D., Catrina, A. I., Choy, E. H. S., Emery, P., Fearon, U., Filer, A., Gerlag, D., Humby, F., Isaacs, J. D., Just, S. A., Lauwerys, B. R., Le Goff, B., Manzo, A., McGarry, T., ... Veale, D. J. (2017). Erratum: Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(10), 630–630. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.161>
- Owen, A. M., Luan, L., Burelbach, K. R., McBride, M. A., Stothers, C. L., Boykin, O. A., Sivanesan, K., Schaedel, J. F., Patil, T. K., Wang, J., Hernandez, A., Patil, N. K., Sherwood, E. R., & Bohannon, J. K. (2022). MyD88-dependent signaling drives toll-like receptor-induced trained immunity in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1044662>
- Pacifici, M., Koyama, E., & Iwamoto, M. (2005). Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: Recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 75(3), 237–248. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20050>
- Page, M. J., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2022). The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. *Chronic Stress*, 6, 247054702210763. <https://doi.org/10.1177/24705470221076390>
- Paiva, C. N., & Bozza, M. T. (2014). Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(6), 1000–1037. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5447>
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B.-S., Lee, H., & Lee, J.-O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*, 458(7242), 1191–1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>
- Quintin, J., Saeed, S., Martens, J. H. A., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Ifrim, D. C., Logie, C., Jacobs, L., Jansen, T., Kullberg, B.-J., Wijmenga, C., Joosten, L. A. B., Xavier, R. J., van der Meer, J. W. M., Stunnenberg, H. G., & Netea, M. G. (2012). *Candida albicans* Infection

- Affords Protection against Reinfection via Functional Reprogramming of Monocytes. *Cell Host & Microbe*, 12(2), 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.006>
- Rigby, K. M., & DeLeo, F. R. (2012). Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Seminars in Immunopathology*, 34(2), 237–259. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0295-3>
- Ross, J. J. (2017). Septic Arthritis of Native Joints. *Infectious Disease Clinics of North America*, 31(2), 203–218. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.01.001>
- Sachs, D., Coelho, F. M., Costa, V. V., Lopes, F., Pinho, V., Amaral, F. A., Silva, T. A., Teixeira, A. L., Souza, D. G., & Teixeira, M. M. (2011). Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *British Journal of Pharmacology*, 162(1), 72–83. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00895.x>
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H. D., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Matarese, F., Cheng, S. C., Ratter, J., Berentsem, K., Van Der Ent, M. A., Sharifi, N., Janssens-Megens, E. M., Ter Huurne, M., Mandoli, A., Van Schaik, T., Ng, A., Burden, F., Downes, K., Frontini, M., ... Stunnenberg, H. G. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345(6204). <https://doi.org/10.1126/science.1251086>
- Safdieh, G., Silberman, J., Nguyen, J., Doyle, S. M., Blanco, J. S., Scher, D. M., Green, D. W., Widmann, R. F., & Dodwell, E. R. (2019). Pediatric Septic Arthritis and Osteomyelitis in the USA: A National KID Database Analysis. *HSS Journal* ®, 15(2), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s11420-018-9644-2>
- SAKINIENE, E., BREMELL, T., & TARKOWSKI, A. (2003). Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) aggravates *Staphylococcus aureus* septicaemia and septic arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*, 110(3), 370–377. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1997.4431456.x>
- Sarfraz, Z., Sarfraz, A., Pandav, K., Singh Makkar, S., Hasan Siddiqui, S., Patel, G., Platero-Portillo, T., Singh, B. M., Maideen, M. I. H., Sarvepalli, D., Sarfraz, M., Cardona-Guzman, J., Sanchez-Gonzalez, M. A., & Cherrez-Ojeda, I. (2021). Variances in BCG protection against COVID-19 mortality: A global assessment. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 24, 100249. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2021.100249>
- Schneider, A. H., Taira, T. M., Públio, G. A., da Silva Prado, D., Donate Yabuta, P. B., dos Santos, J. C., Machado, C. C., de Souza, F. F. L., Rodrigues Venturini, L. G., de Oliveira, R. D. R., Cunha, T. M., Alves-Filho, J. C., Louzada-Júnior, P., Aparecida da Silva, T., Fukada, S. Y., &

- Cunha, F. Q. (2024). Neutrophil extracellular traps mediate bone erosion in rheumatoid arthritis by enhancing RANKL-induced osteoclastogenesis. *British Journal of Pharmacology*, 181(3), 429–446. <https://doi.org/10.1111/bph.16227>
- Shirtliff, M. E., & Mader, J. T. (2002). Acute Septic Arthritis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 527–544. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.527-544.2002>
- Sithole, C., Pieterse, C., Howard, K., & Kasonga, A. (2021). GPR120 Inhibits RANKL-Induced Osteoclast Formation and Resorption by Attenuating Reactive Oxygen Species Production in RAW264.7 Murine Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10544. <https://doi.org/10.3390/ijms221910544>
- Swarup, I., Meza, B. C., Weltsch, D., Jina, A. A., Lawrence, J. T., & Baldwin, K. D. (2020). Septic Arthritis of the Knee in Children. *JBJS Reviews*, 8(1), e0069–e0069. <https://doi.org/10.2106/JBJS.RVW.19.00069>
- Tan, Y., & Kagan, J. C. (2014). A Cross-Disciplinary Perspective on the Innate Immune Responses to Bacterial Lipopolysaccharide. *Molecular Cell*, 54(2), 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.012>
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-Mcdermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., ... O'Neill, L. A. J. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*, 496(7444), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11986>
- Tsatskan, V., & Firestein, G. S. (2022). Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Pharmacology*, 67, 102304. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2022.102304>
- Wang, J., & Wang, L. (2021). Novel therapeutic interventions towards improved management of septic arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 22(1), 530. <https://doi.org/10.1186/s12891-021-04383-6>
- Wang, J., Yang, C., Hou, X., Xu, J., Yun, Y., Qin, L., & Yang, P. (2021). Rapamycin Modulates the Proinflammatory Memory-Like Response of Microglia Induced by BAFF. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.639049>
- Weiss, D. L. (1975). Acute bacterial arthritis. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 5(6), 452–455.
- Welling, B. D., Haruno, L. S., & Rosenfeld, S. B. (2018). Validating an Algorithm to Predict Adjacent Musculoskeletal Infections in Pediatric Patients With Septic Arthritis. *Clinical*

Orthopaedics & Related Research, 476(1), 153–159.
<https://doi.org/10.1007/s11999.00000000000000019>

- YANG, C., ZHONG, Z. F., WANG, S. P., VONG, C. T., YU, B., & WANG, Y. T. (2021). HIF-1: structure, biology and natural modulators. In *Chinese Journal of Natural Medicines* (Vol. 19, Issue 7, pp. 521–527). China Pharmaceutical University. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(21\)60051-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(21)60051-1)
- Zahalka, S., Starkl, P., Watzenboeck, M. L., Farhat, A., Radhouani, M., Deckert, F., Hladik, A., Lakovits, K., Oberndorfer, F., Lassnig, C., Strobl, B., Klavins, K., Matsushita, M., Sanin, D. E., Grzes, K. M., Pearce, E. J., Gorki, A.-D., & Knapp, S. (2022). Trained immunity of alveolar macrophages requires metabolic rewiring and type 1 interferon signaling. *Mucosal Immunology*, 15(5), 896–907. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00528-5>
- Zeng, X., Zhang, Y., Yang, Q., Wang, S., Zou, B., Tan, Y., Zou, M., Liu, S., & Li, X. (2020). Artesunate attenuates LPS-induced osteoclastogenesis by suppressing TLR4/TRAF6 and PLC γ 1-Ca²⁺-NFATc1 signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(2), 229–236. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0289-6>
- Zhang, T., Cooper, S., & Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Reports*, 16(11), 1467–1481. <https://doi.org/10.15252/embr.201540945>
- Zhou, H., Lu, X., Huang, J., Jordan, P., Ma, S., Xu, L., Hu, F., Gui, H., Zhao, H., Bai, Z., Redmond, H. P., Wang, J. H., & Wang, J. (2022). Induction of Trained Immunity Protects Neonatal Mice Against Microbial Sepsis by Boosting Both the Inflammatory Response and Antimicrobial Activity. *Journal of Inflammation Research*, Volume 15, 3829–3845. <https://doi.org/10.2147/JIR.S363995>
- Ziogas, A., Bruno, M., van der Meel, R., Mulder, W. J. M., & Netea, M. G. (2023). Trained immunity: Target for prophylaxis and therapy. *Cell Host & Microbe*, 31(11), 1776–1791. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.10.015>

8. ANEXOS

Carta de aceite do comitê de ética de uso de animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "O papel da imunidade treinada e seu envolvimento no processo inflamatório das Artrites", protocolo do CEUA: 3/2021 sob a responsabilidade de Flavio Almeida Amaral que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 22/03/2021.

Vigência da Autorização	22/03/2021 a 21/03/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	30
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	30
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	18
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	18
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	18
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Minas

Figura 1: estratégia de “gating” das Figuras 8, 12 e 16

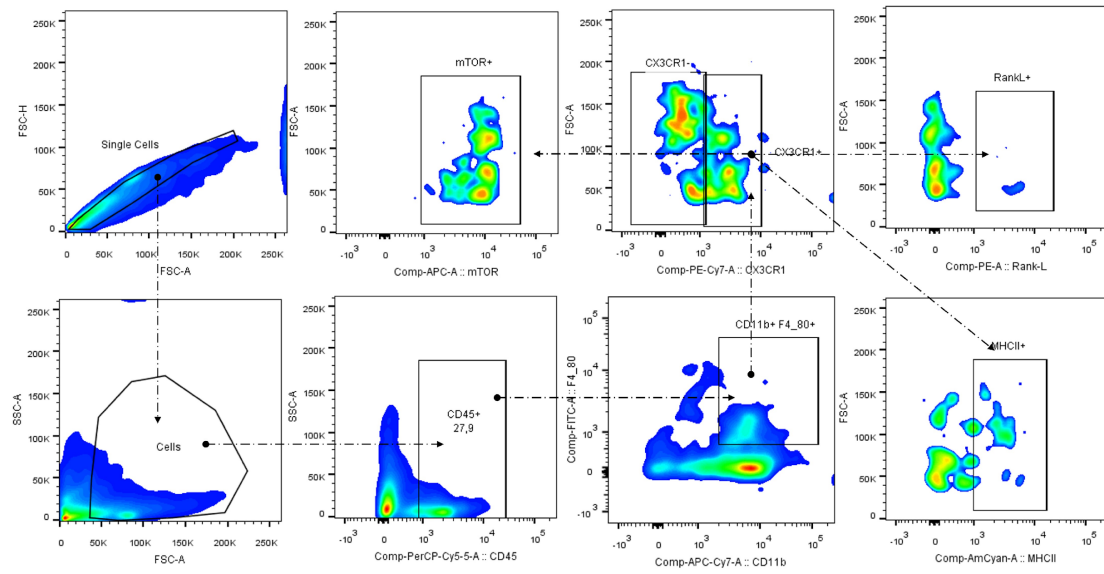


Figura 2: estratégia de “gating” da Figura 10

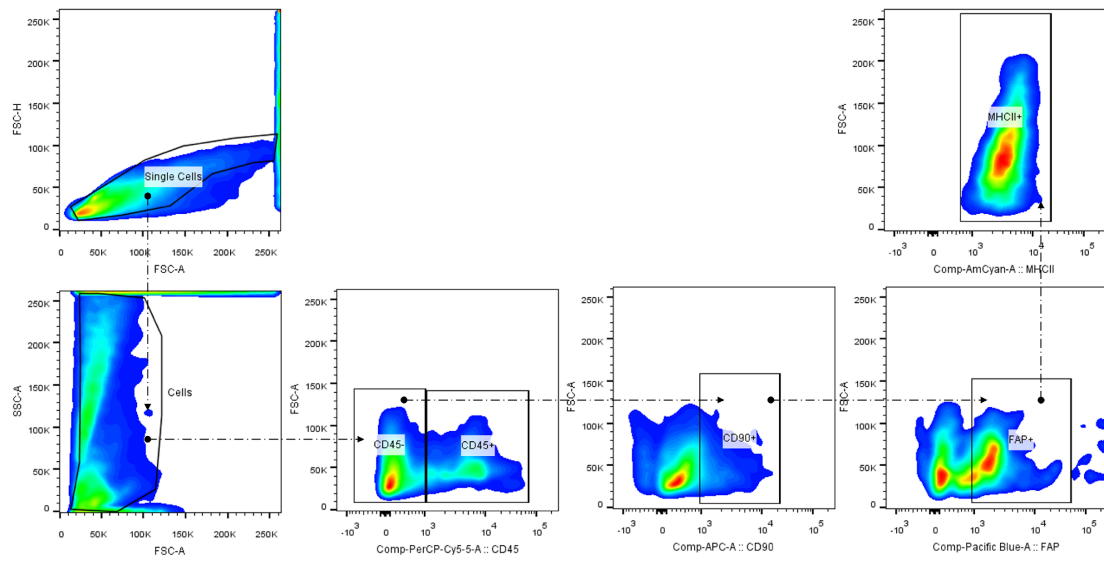


Figura 3: estratégia de “gating” da Figura 16

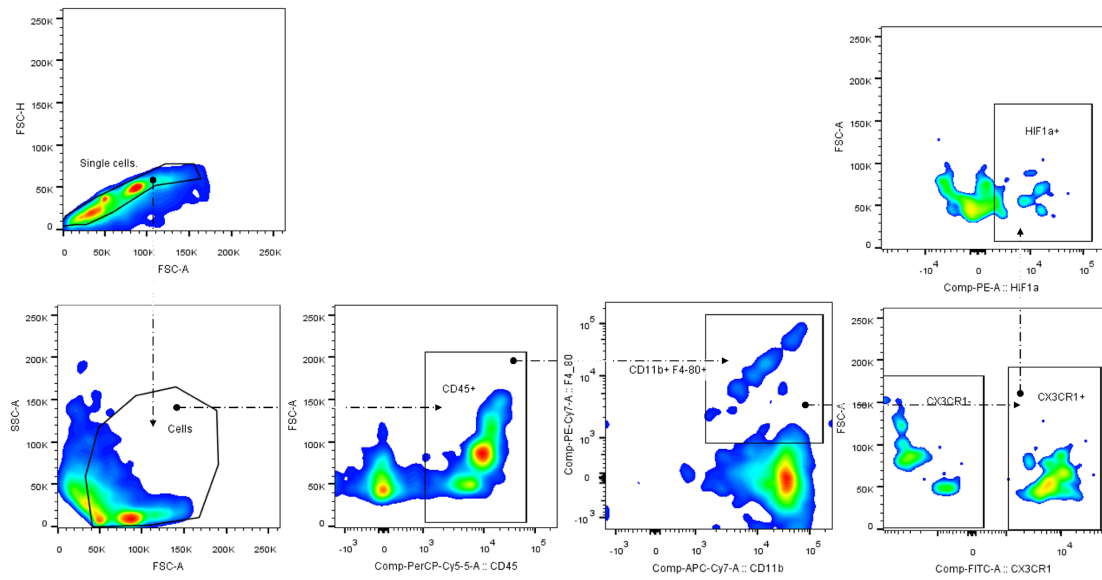


Figura 4: estratégia de “gating” da Figura 17

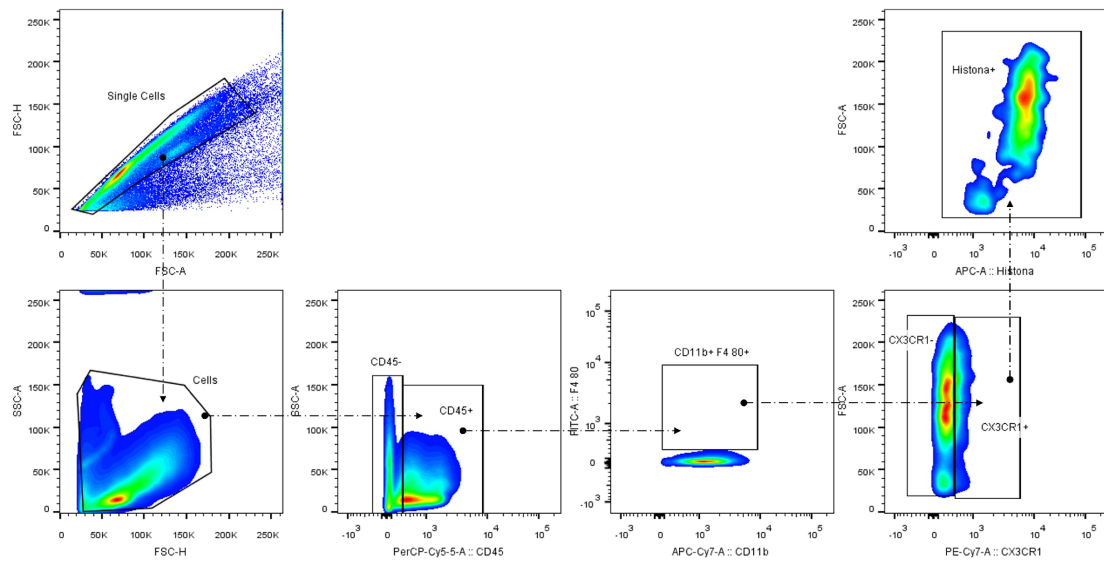


Figura 5: estratégia de “gating” da Figura 18

