

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós- Graduação em Bioquímica e Imunologia

PAPEL DA ENZIMA 5-LIPOXIGENASE NA
PATOGENESE DA ARTRITE SÉPTICA EXPERIMENTAL

Daiane Boff

Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Belo Horizonte

2013

Daiane Boff

PAPEL DA ENZIMA 5-LIPOXIGENASE NA
PATOGENESE DA ARTRITE SÉPTICA EXPERIMENTAL

Dissertação 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 obtenção do título de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Belo Horizonte

2013

Dedico este trabalho,

À minha mãe Geneci, pelo apoio e carinho dedicados a mim, por acreditar e incentivar meu trabalho e por ser responsável por tudo que sou hoje.

Aos meus tios Valdemar e Zeli e minha avó Líbera pelo carinho, dedicação e pelos exemplos de vida e honestidade.

Ao meu namorado Gabriel pelo amor, carinho, dedicação, compreensão dedicados a mim e por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todo grupo Imunofarmacologia pela colaboração e pelo aprendizado. Ao professor Mauro Martins Teixeira por ter me recebido no laboratório, pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho e ainda pelas discussões e sugestões. Ao meu orientador Flávio Almeida Amaral pela paciência e dedicação, por ter me ensinando grande parte do que sei, pelo incentivo e por ter sempre acreditado no meu trabalho. As alunas de iniciação científica Vívian e Isabela pela disponibilidade, dedicação, responsabilidade e grande ajuda em todos os experimentos. A Izabela, companheira de projetos, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e pelo apoio. A Flávia por compartilhar de suas experiências, pelo auxílio nos experimentos e confecção deste trabalho. A Aninha pela companhia no preparo de soluções e pelo auxílio nos experimentos. A Cristiana e Luciana pelo auxílio no cultivo e preparo dos inóculos bacterianos, pela ajuda nos demais experimentos e pelo apoio. Ao Celso pelo auxílio no preparo das histologias e pela análise das mesmas. Aos demais integrantes do laboratório Braulio, Rafael e Lívia pelo apoio. Ao Hermes e Pedro, funcionários do Biotério do laboratório de Imunofarmacologia pelo cuidado com os animais. As técnicas Ilma e Frank pelo apoio e por tornar nosso trabalho possível.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia pela oportunidade e pelo conhecimento prestado. Aos professores e colegas de bases pelo conhecimento e aprendizado compartilhado.

Agradeço meu professor de graduação Mateus Batista Fucks pelo auxílio e suporte em microbiologia.

Agradeço os professores Gustavo Batista de Menezes, Helton da Costa Santiago e Fabiana Simão Machado por aceitarem participar da banca.

Agradeço a agência de fomento Capes, pelo suporte financeiro.

Agradeço a minha família que mesmo distante sempre me deu apoio, incentivo e acreditou no meu trabalho. Ao meu namorado Gabriel e sua família, principalmente seus pais Cynthia e Vanilson pelo apoio, carinho e dedicação.

RESUMO

A artrite séptica é uma patologia articular classificada como infecciosa, pois para sua ocorrência é necessário que um microrganismo seja capaz de adentrar a articulação causando a infecção. O *Staphylococcus aureus* é a principal bactéria causadora da artrite séptica, sendo responsável por cerca de 40-60% dos casos. Vários tipos celulares participam da resposta imunológica ao *S. aureus* na articulação, principalmente os neutrófilos devido ao seu arsenal de combate a este patógeno. Leucotrienos são mediadores lipídicos com importante função na ativação e recrutamento celular. Para a biossíntese destes mediadores o precursor ácido araquidônico é liberado de fosfolipídios da membrana e metabolizado pela enzima 5-lipoxigenase (5-LO). O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da enzima 5-LO na patogênese da artrite séptica experimental. Para a padronização do modelo, foi realizado um inóculo resposta (10^4 a 10^8 UFC de *S. aureus*; i.a.) acompanhado de uma cinética (1, 7, 14 e 28 dias após a infecção) para avaliação de variados parâmetros inflamatórios. O principal ponto de escolha foi a utilização de um inóculo de 10^7 UFC com as análises realizadas após 7 dias da infecção, quando os animais apresentaram maior recrutamento de células inflamatórias para a cavidade, principalmente neutrófilo, assim como maior escore histopatológico e maior perda de proteoglicano. Em todos os tempos estudados foi possível recuperar bactérias da articulação e observar aumento da hipernocicepção. Animais deficientes para a enzima 5-LO (5-LO^{-/-}) apresentaram menor recrutamento celular para a cavidade articular, juntamente com menor carga bacteriana, menor escore histopatológico, menor perda de proteoglicano e menor hipernocicepção quando comparados aos animais selvagens. Assim, a ausência da enzima 5-LO pode ser considerada um fator importante para os controles da inflamação e crescimento da bactéria na articulação, em que o bloqueio farmacológico dessa enzima pode representar uma importante estratégia terapêutica.

ABSTRACT

Septic arthritis is a joint disease classified as infectious pathology, for instance because it is necessary that a microorganism is capable of penetrating the joint causing the infection. The *Staphylococcus aureus* is the main cause of septic arthritis, accounting for about 40-60% of cases. Several cell types participate in the immune response to *S. aureus* in the joint, but neutrophils play an important role in controlling infection due to its arsenal to combat this pathogen. Leukotrienes are lipid mediators with important role in the activation and recruitment of neutrophils. For the biosynthesis of these mediators, the precursor arachidonic acid released from membrane phospholipids and metabolized by the enzyme 5-lipoxygenase (5-LO). This study aimed to evaluate the role of 5-LO in the pathogenesis of experimental septic arthritis. To standardize the model, was performed a response inoculum (10^4 to 10^8 CFU of *S. aureus* i.a) accompanied by a kinetic (1, 7, 14 and 28 days after infection) for evaluation of various inflammatory parameters. The main point of choice is the use of an inoculum of 10^7 CFU to the analysis conducted after 7 days of infection, when the animals had higher recruitment of inflammatory cells into the cavity, particularly neutrophils, as well as histopathologic score higher and higher loss of proteoglycan . At all times studied was able to recover bacteria from joint and observe increased hypernociception. Mice deficient for the enzyme 5-LO ($5\text{-LO}^{-/-}$) demonstrated less cell recruitment into the joint cavity, together with lower bacterial load, lower histopathological score, lower loss of proteoglycan and hypernociception lower when compared to wild animals. Thus, the absence of the enzyme 5-LO may be considered an important factor in the control of inflammation and bacterial growth in the joint, in that the pharmacological blockade of this enzyme may represent an important therapeutic strategy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Caracterização da estrutura das articulações sinoviais.....	19
Figura 2: Rota de entrada do patógeno na cavidade articular.	20
Figura 3: Processo de migração do neutrófilo para o espaço extracelular.....	31
Figura 4: Biossíntese dos leucotrienos a partir de fosfolipídios.....	33
Figura 5: Aparato utilizado para medida de hipernocicepção pelo método de von Frey eletrônico.....	44
Figura 6: Método para a avaliação da perda de proteoglicano presente na articulação.. ..	46
Figura 7: Padronização do modelo experimental de artrite séptica em camundongos.....	48
Figura 8: Cinética do recrutamento celular e carga bacteriana no modelo experimental de artrite séptica em camundongos.....	50
Figura 9: Perfil de citocinas e hipernocicepção da cinética da resposta inflamatória no modelo experimental de artrite séptica em camundongos.. ..	51
Figura 10: Análise histológica da cinética do modelo experimental de artrite séptica em camundongos.	53
Figura 11: Participação da 5-lipoxigenase no recrutamento de células inflamatórias e crescimento bacteriano articular após a injeção de <i>S. aureus</i>	56

Figura 12: Perfil de quimiocinas e hipernocicepção em animais deficientes para 5-LO e selvagens após injeção de *S. aureus* 57

Figura 13: Análise histológica do modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes em 5-LO e WT após injeção de *S. aureus* 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais bactérias associadas ao desenvolvimento de artrite séptica..... 22

Tabela 2: Antibióticos utilizados no tratamento empírico para artrite séptica. 28

Tabela 3: Efeito de LTB4 em algumas células do sistema imune..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitro

μm: Micrometro

5-LO^{-/-}: Deficiente pra 5-lipoxigenase

5-LO: 5- lipoxigenase

AA: Ácido araquidônico

ANOVA: Análise de variância

ATCC: American Type Culture Collection- Coleção de cultura Americana

BHI: Brain heart infusion- infusão de coração e cérebro

BSA: Bovine serum albumin- albumina sérica bovina

CCL(): quimiocina ligante com motivo CC

CD (): cluster of differentiation- agrupamento de diferenciação

CLP: Perfuração e ligação cecal

cm: Centímetro

Cna: Proteína de adesão ao colágeno

CNS: *Staphylococcus* coagulase negativos

CR: Receptor de complemento

CXCL (): quimiocina ligante com motivo CXC

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay- Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima

EPM: Erro padrão da média

Fib: Proteína ligante de fibrinogênio

FLAP: Proteína ativadora de 5- lipoxigenase

fMLP: Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine- peptídeos formilados originados de proteínas de bactérias ou mitocôndrias

FnBPA: Proteína ligante de fibronectina A

FnBPB: Proteína ligante de fibronectina B

g: grama

HIV: Human immunodeficiency vírus- Vírus da imunodeficiência humana

ICAM: Intercellular adhesion molecule- moléculas de adesão intracelulares

IFN: Interferon

IgG: Imunoglobulina G

IL (): Interleucina

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

LTA₄: Leucotrieno A₄

LTB₄: Leucotrieno B₄

Ltb4r1^{-/-}: Deficiente para receptor 1 de leucotrieno B₄

LTC₄: Leucotrieno C₄

LXA₄: Lipoxina A₄

M: molar

MAMPS: Microbe-associated molecular patterns- Padrões moleculares associados aos microrganismos

mg/Kg: Miligrama por quilo

mg/L: Miligramas por litro

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mm/h: Milímetro por hora

mM: Micromolar

mm: Milímetro

MPO: Mieloperoxidase

MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MSCRAMMs: Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules- componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas adesivas da matriz

NETs: Neutrophil extracellular traps - armadilhas extracelulares de neutrófilos

nm: Nanômetro

PAF: Fator ativador de plaquetas

PAMP: Pathogen-associated molecular patterns- padrão molecular associado a patógeno

PBS: Phosphate buffered saline- tampão fosfato-salino

PCR: Polymerase chain reaction- reação em cadeia de polimerase

pg/mL: Picogramas por mililitro

PSGL-1: P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 - glicoproteína ligante de P selectina

PVL: Leucocidina de Panton- Valentine

ROS: Reactive oxygen species- espécies reativas de oxigênio

rpm: Rotações por minuto

TLR2: Toll- like receptor 2 - receptor semelhante ao Toll tipo 2

TNF: Fator de necrose tumoral

UFC: Unidade formadora de colônia

VCAM: Vascular cell adhesion molecule- proteína de adesão celular vascular

WT: Animal selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Artrite séptica.....	17
1.2 Neutrófilos e resposta imune inata ao <i>S. aureus</i>	29
1.3 5- Lipoxigenase e Leucotrieno B ₄	33
2. OBJETIVOS	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
2.2.1 Padronizar o modelo de artrite séptica experimental em camundongos	37
2.2.2 Avaliar a participação da enzima 5-lipoxigenase na resposta inflamatória induzida pela injeção intra-articular de <i>S. aureus</i>	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Animais.....	39
3.2 Bactéria.....	39
3.3. Estratégia experimental	40
3.4 Contagem total e diferencial de células inflamatórias	41
3.5 Recuperação do <i>S. aureus</i> do tecido articular.....	41
3.6 Processamento do tecido articular e ensaio de ELISA.....	41
3.7 Hipernocicepção.....	42
3.8 Histologia.....	44
3.9 Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS	47
4.1 Padronização do modelo experimental de artrite séptica	47

4.2 Cinética da resposta inflamatória após a injeção intra-articular de <i>S. aureus</i>	49
4.2.1 Análise histológica da articulação após a injeção intra-articular de <i>S. aureus</i>	52
4.3 Participação de 5-Lipoxigenase na resposta inflamatória da artrite séptica experimental. 53	
4.3.1 Avaliação histológica da articulação em animais 5-LO ^{-/-} após a injeção intra-articular de <i>S. aureus</i>	58
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO 1	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Artrite séptica

A artrite séptica é uma patologia articular classificada como infecciosa, pois para sua ocorrência é necessário que um microrganismo seja capaz de adentrar a articulação causando a infecção. O termo artrite séptica abrange denominações como artrite piogênica, artrite supurativa, artrite purulenta e em crianças recém-nascidas é conhecida como artrite de Tom Smith (NADE, 2003).

Para a definição dos casos de artrite séptica usualmente são utilizados os critérios modificados de Newman, sendo necessário um dos quatro seguintes pontos: isolamento do patógeno da articulação afetada; isolamento do patógeno de outro tecido com sinais clínicos de artrite séptica; sinais clínicos típicos e fluido articular apresentando turbidez na presença de tratamento prévio com antibióticos; *post mortem* ou sinais patológicos suspeitos de artrite séptica (MATHEWS et al., 2010). Entretanto a artrite séptica é uma patologia complexa, sua sintomatologia e dificuldade de diagnóstico podem levar a uma subestimação de sua incidência (BRENNAN; HSU, 2012).

Estima-se que a incidência anual varia de 2 a 10 casos para cada 100.000 indivíduos na população em geral e de 30 a 70 por 100.000 indivíduos em pacientes com artrite reumatóide e próteses articulares. A perda irreversível da articulação ocorre em 25 a 50% dos pacientes, sendo que de 5 a 15% dos casos são fatais, pois desenvolvem a forma grave da doença (GOLDENBERG, 1998). Indivíduos de todas as idades podem ser afetados, porém a artrite séptica é mais comum em crianças e idosos, bem como em indivíduos do sexo masculino em relação ao sexo feminino. Em crianças a incidência é de 5 a 12 casos por

100.000 indivíduos por ano, sendo mais comum em crianças menores de 2 anos de idade (GARCÍA-ARIAS; BALSÁ; MOLA, 2011).

O principal fator de risco para artrite séptica são doenças articulares já existentes. Abrange condições reumatológicas como artrite reumatóide, osteoartrite, gota, pseudogota, trauma recente e lúpus eritematoso sistêmico (KHERANI; SHOJANIA, 2007; ROSS, 2005). Dentre tais patologias, a artrite reumatóide possui maior associação à infecção articular, como demonstrado em estudo onde 32% dos pacientes atendidos em um Centro de Reumatologia na Itália apresentaram artrite reumatóide e séptica concomitantemente (FAVERO et al., 2008). Em função dos avanços em reumatologia, cirurgias prostéticas têm sido amplamente usadas no tratamento de algumas condições articulares. Uma das complicações frequentes destas cirurgias é o desenvolvimento de artrite séptica, que ocorre em 0,1 a 3,5% dos casos (DONATTO, 1998).

A idade também é um fator de risco para o desenvolvimento da patologia. Em crianças a artrite séptica pode causar sequelas permanentes, como demonstrado em estudo realizado em um Hospital Universitário no Taiwan onde 17% das crianças (média de 3 anos) com artrite séptica apresentaram sequelas como limitações de movimento, discrepância no comprimento dos membros e crescimento ósseo anormal (WANG et al., 2003). Por outro lado, pacientes idosos também são mais susceptíveis ao desenvolvimento de artrite séptica. Em estudo em Centro de Reumatologia na França, cerca de 61,4% dos pacientes que apresentaram artrite séptica possuíam 60 anos ou mais e 12,5 % apresentavam 80 anos ou mais (GAVET et al., 2005).

O uso de drogas injetáveis também está associado ao desenvolvimento de artrite séptica assim como a infecção pelo vírus HIV tipo I. A artrite séptica neste caso ocorre em função de patógenos oportunistas como fungos, comuns devido à imunossupressão destes

pacientes (PÉREZ, 1999; SARAUX et al., 1997). Outros fatores de risco incluem diabetes, falência renal, cirrose, uso de drogas imunossupressoras, hemodiálise, câncer, alcoolismo, hemofilia, transplante de órgãos e hipogamaglobulinemia (GARC, 2009).

As articulações sinoviais são aquelas que apresentam grande amplitude de movimento e se caracterizam pela presença de uma cápsula articular responsável pela união entre os ossos. Nesse tipo de articulação estão presentes superfícies ósseas articulares; cartilagem; uma cápsula que é constituída de membrana fibrosa externa e membrana sinovial interna; de uma cavidade articular e líquido sinovial, conforme demonstrado na Figura 1 (DUARTE, 2009).

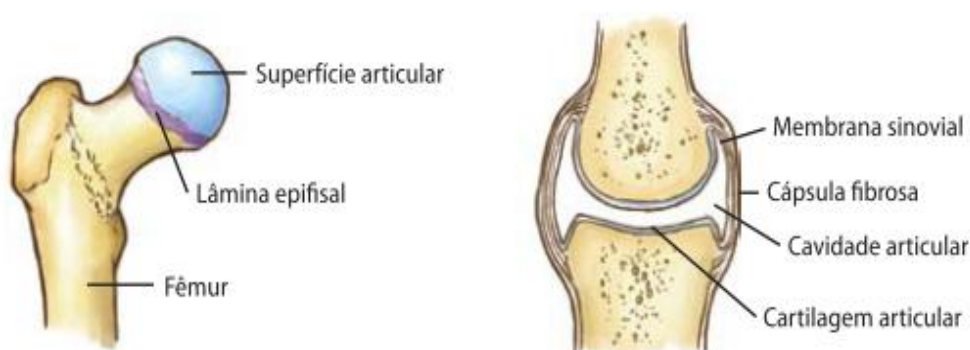


Figura 1: Caracterização da estrutura das articulações sinoviais. Retirado de (DUARTE, 2009)

A membrana sinovial interna, denominada íntima contém um revestimento celular único composto por sinoviócitos com 1 a 3 camadas de profundidade. A íntima é separada da cápsula articular por uma camada subíntima, esta camada possui muitos vasos sanguíneos, é inervada e em função de sua morfologia pode ser classificada como areolar, adiposa ou fibrosa (IWANAGA et al, 2000). As articulações sinoviais possuem uma estrutura cartilaginosa que recobre os ossos com a função de diminuir o atrito quando estes estão em movimento. A cartilagem articular é composta por uma grande matriz extracelular com uma

densa rede de fibras colágenas e proteoglicanos, não é vascularizada. Células denominadas condrócitos são responsáveis pela síntese e manutenção dos componentes da matriz (HARDINGHAM; BAYLISS, 1990; SMITH, 2011).

A entrada do patógeno na sinóvia pode ocorrer por três vias, conforme demonstrado na Figura 2: (1) hematogênica; (2) infecção adjacente ou (3) inoculação direta. A inoculação direta é menos comum e pode ocorrer durante cirurgias articulares, durante coleta de aspirado articular, aplicação local de corticosteroides ou uso de drogas injetáveis (BRENNAN; HSU, 2012; GOLDENBERG, 1998).

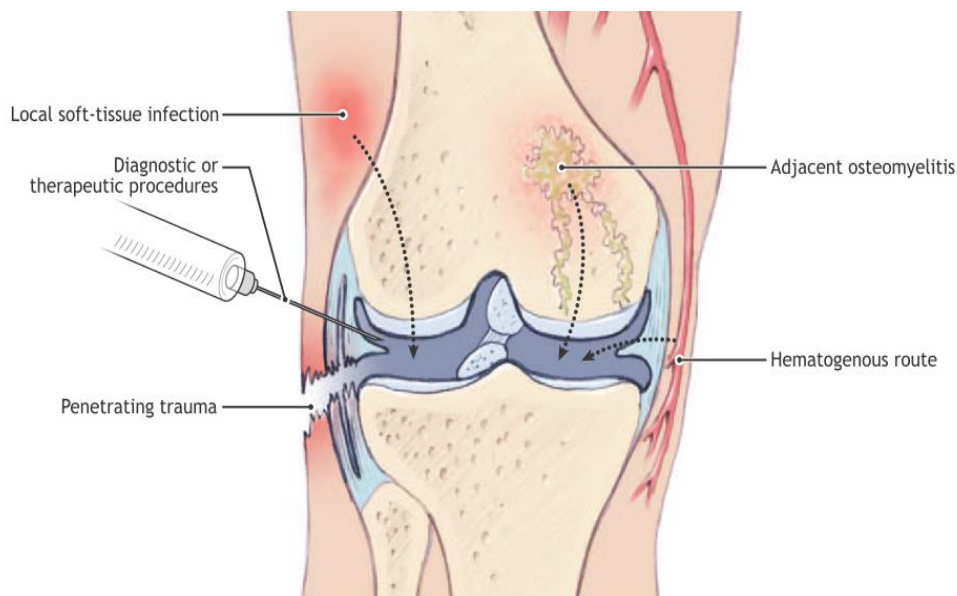


Figura 2: Rota de entrada do patógeno na cavidade articular. Retirado de (KHERANI; SHOJANIA, 2007)

A sinóvia é extremamente vascularizada, o que facilita o acesso do patógeno ao espaço sinovial. Uma vez estabelecida a infecção, ocorre um aumento da circulação de sangue na sinóvia que leva ao edema e deposição de fibrina na articulação. Leucócitos também migram para o espaço articular e liberam enzimas proteolíticas que causam dano ao proteoglicano

(ATESCHRANG et al., 2011; KHERANI; SHOJANIA, 2007). Proteoglicanos são um importante componente da matriz extracelular, ocupam os interstícios das fibras colágenas e são responsáveis por conferir resistência e compressão à articulação (KIANI et al., 2002). Proteoglicanos são carregados negativamente de forma que atraem cargas positivas e repelem cargas negativas, desta forma é mantido o equilíbrio de fluidos e eletrólitos na cartilagem articular (BHOSALE; RICHARDSON, 2008). Citocinas liberadas pelas células residentes ou recrutadas podem ativar metaloproteinases da matriz do hospedeiro levando a autodigestão da cartilagem. A degradação da cartilagem e do osso depende da virulência do organismo invasor, da resposta do hospedeiro a infecção, mas principalmente da agilidade do diagnóstico e da implementação do tratamento (POLLARD, 1999).

A artrite séptica pode ser causada por bactérias, vírus, fungos e parasitas. Os vírus *Haemophilus influenzae*, *Parvovirus B19*, da hepatite B e C, rubéola, caxumba e HIV são os mais encontrados em pacientes com artrite séptica (SMITH; PIERCY, 1995; TARKOWSKI, 2006). Os vírus podem causar artrite por seu efeito tóxico em células alvo, persistência do antígeno viral causando inflamação crônica ou imunossupressão. Alguns fungos como *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* e *Candida* e mais raramente alguns parasitas como *Filaria*, *Trichinella* e *Schistosoma* podem ser encontrados na articulação (TARKOWSKI, 2006).

Entretanto as bactérias são a principal classe de microrganismos capazes de causar artrite séptica (AXFORD, 2010). As principais bactérias envolvidas neste contexto estão demonstradas na Tabela 1. Em relação à bactéria causadora da infecção a artrite séptica pode ser categorizada em 2 grupos:

- artrite séptica gonococcal (causada por *Neisseria gonorrhoeae* ou outras espécies de *Neisseria*);

- artrite séptica não gonococcal (causada principalmente por bactérias gram positivas como *Staphylococcus aureus* e gram negativas) (POLLARD, 1999).

Tabela 1: Principais bactérias associadas ao desenvolvimento de artrite séptica.

BACTÉRIAS ASSOCIADAS COM ARTRITE SÉPTICA
<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Salmonella spp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>

Adaptado de (AXFORD, 2010)

O *S. aureus* é a principal bactéria causadora da artrite séptica em todos os grupos, sendo responsável por cerca de 40-60% dos casos (POLLARD, 1999). Microrganismos do

gênero *Staphylococcus* são cocos gram positivos difundidos na natureza. Trinta e seis espécies e oito subespécies do gênero são distinguidas baseadas na análise bioquímica e em estudos de hibridização de DNA (BOUZA; MUÑOZ, 1999). Algumas espécies podem ser distinguidas também por coagulase positiva como o *S. aureus* ou negativa como os CNS (*Staphylococcus* coagulase negativos). Podem ser encontrados na pele e mucosas de humanos e aves. Crescem facilmente em vários meios de cultura e causam β hemólise em ágar sangue (GOLDMAN, 2008).

Os *Staphylococcus* são esféricos, possuem em média 1 μ m de diâmetro e tem forma de cachos de uva irregulares. Em meios sólidos as colônias são redondas, lisas, proeminentes, brilhantes e podem apresentar coloração de amarela a dourado intenso (BROOKS et al, 2005). Além disso, são anaeróbios facultativos, requerem muitos aminoácidos e vitaminas para o seu crescimento e são tolerantes a altas concentrações de cloreto de sódio. A parede celular do gênero é composta por peptidoglicano, ácido teicóico e proteínas de superfície, tornando-a uma estrutura dinâmica e semi-rígida (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

O *S. aureus* é um patógeno oportunista e adaptável com habilidade de infectar, invadir, persistir e replicar em muitos tecidos humanos incluindo pele, ossos e órgãos viscerais (GOLDMAN, 2008). Sua persistência nestes tecidos ocorre em função de vários fatores de virulência que o tornam capaz de evadir a resposta imunológica do hospedeiro.

O *S. aureus* é um importante patógeno ósseo porque possui algumas moléculas de adesão de superfície que facilitam a ligação a matriz óssea. Estes ligantes pertencem a uma família de adesinas que interagem com componentes da matriz extracelular. Estas adesinas são conhecidas como componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas adesivas da matriz, ou por sua sigla MSCRAMMs (HUDSON; RAMP; FRANKENBURG, 1999). Os MSCRAMMs estão ancorados na parede celular e tem a habilidade de se ligar a

uma série de proteínas de matriz do hospedeiro. A proteína de adesão ao colágeno (Cna) é necessária e suficiente para ligar o *S. aureus* à cartilagem, já as proteínas ligantes de fibronectina (FnBPA e FnBPB) ligam-se à fibronectina e a proteína ligante de fibrinogênio (Fib) se liga ao fibrinogênio e o converte em fibrina (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999).

Aproximadamente 90% dos *S. aureus* isolados produzem cápsula polissacarídica que forma uma camada de peptidoglicano na superfície externa da parede celular. Podem produzir 1 de 11 sorotipos de cápsula. Cepas que não produzem cápsula possuem baixa virulência (NAIR; WILLIAMS; HENDERSON, 2000). Outros componentes da parede celular da bactéria como ácido lipoteicóico e peptidoglicano também são importantes fatores de virulência. Ambos são capazes de ligar ao receptor Toll tipo 2 (TLR2), o que faz com que o ácido lipoteicóico seja capaz de induzir a secreção de citocinas como IL-1 β e IL-6 e quimicina como IL-8, além de ativar a via alternativa do complemento. Por outro lado, o peptidoglicano induz a produção de citocinas por monócitos e causa inflamação (FOURNIER; PHILPOTT, 2005; NAIR; WILLIAMS; HENDERSON, 2000; TARKOWSKI et al., 2002).

A cogulase do *S. aureus* é uma proteína extracelular que pode ser encontrada na forma livre ou ligada à membrana. No hospedeiro esta proteína se une a protrombina formando a stafilotrombina, a qual é capaz de coagular o plasma e pode ainda inibir a fagocitose (NAIR; WILLIAMS; HENDERSON, 2000). Outra proteína conhecida como proteína A, que está ligada covalentemente ao peptidoglicano pode se ligar a porção Fc dos anticorpos IgG 1, 2 e 4 impedindo a ligação de outras proteínas a este anticorpo. Da mesma forma proteases também podem se ligar ao anticorpo levando a sua clivagem (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999).

Os principais fatores de virulência do *S aureus* são as exotoxinas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). A bactéria é capaz de produzir uma série de exotoxinas com funções biológicas diferentes. A família mais conhecida é a dos superantígenos que hipersecreção de citocinas como IL-2, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β . Algumas cepas de bactéria chegam a produzir 15 tipos de superantígeno. As toxinas podem ser do tipo α que induz formação de poros; β que leva a hemólise de hemácias, ativa proteínas quinases e fagocitose ou tipo γ que também forma poros (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; SCHLIEVERT et al., 2010). Algumas cepas de *S. aureus* são positivas para a exotoxina Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), que é capaz de causar apoptose de neutrófilos e em altas concentrações induz formação de poros na membrana do neutrófilo, levando a sua necrose (FOX et al., 2010).

Além dos mecanismos de evasão do sistema imune e os fatores que caracterizam a virulência de *S. aureus* citados, o que favorece a invasão e crescimento dessa bactéria, há ainda outro agravante sobre os problemas causados pelo *S. aureus*: a resistência a antibióticos. O uso de antibióticos em ambiente hospitalar criou pressão seletiva para *S aureus* adquirir resistência. Cepas resistentes a múltiplas drogas como β lactâmicos e outras classes de antibióticos estão se tornando cada vez mais frequentes, gerando um problema grave de saúde pública (RIGBY; DELEO, 2012).

Os sinais clínicos da artrite séptica não gonococcal são vermelhidão, inchaço, dor intensa na articulação com limitação de amplitude do movimento e febre. O joelho é a articulação mais afetada em adultos, com aproximadamente 50% dos casos, em crianças o quadril é mais comum. Além do joelho há grande incidência também no tornozelo (9%), cotovelo (8%), punho (6%) e ombro (5%). Cerca de 10 a 20% das infecções são poliarticulares com 2 a 3 articulações envolvidas (GOLDENBERG, 1998; ROSS, 2005).

A artrite séptica gonococcal inicia-se com infecções do trato geniturinário não tratado. A tríade clínica característica compreende: poliartralgia migratória, lesões dermatológicas como máculas e pápulas e tenossinovite muitas vezes afetando várias articulações simultaneamente (pulsos, dedos, tornozelos e pés) (GARC, 2009).

Com 24 a 48 horas da invasão bacteriana ocorre um grande infiltrado de neutrófilos, congestão vascular e proliferação de células no espaço articular. Após a secreção de mediadores inflamatórios, a degradação da cartilagem se inicia e se não tratada a perda completa da articulação pode ocorrer em 1 a 2 semanas (AGARWAL; AGGARWAL, 2011; KHERANI; SHOJANIA, 2007).

O padrão ouro do diagnóstico laboratorial da artrite séptica continua sendo a identificação da bactéria através da cultura do líquido sinovial e sangue. Porém há algumas limitações nas culturas que incluem: inóculos baixos, bactérias aderentes e formação de pequenas colônias variantes de *S. aureus* que podem limitar a detecção. Além disso, o tratamento com antibiótico pode impedir o crescimento bacteriano e conseqüentemente, impedir a recuperação da carga bacteriana. Outros fatores técnicos que interferem no diagnóstico incluem o mau posicionamento da agulha de aspiração ou adição de anestésico para coleta do líquido sinovial, os quais também podem complicar a identificação bacteriana (GOLDENBERG, 1998; WIDMER, 2001).

A contagem de leucócitos no sangue e marcadores sorológicos como taxa de sedimentação de eritrócitos e proteína C reativa são utilizados no diagnóstico da artrite séptica. O aumento no número de leucócitos pode indicar um processo infeccioso. A taxa de sedimentação de eritrócitos em indivíduos saudáveis é de até 17 mm/h para homens e 25 mm/h para mulheres e os níveis de proteína C reativa em torno de 12 mg/L. Pacientes com artrite séptica apresentam aumento nestes parâmetros, porém os testes apresentam uma

sensibilidade de 15 a 70% e baixa especificidade (TALEBI-TAHER et al., 2013). A análise do líquido sinovial também deve ser realizada. O fluido deve ser observado macroscopicamente quanto a sua turbidez. Uma contagem de células superior a 50.000 com mais de 90% de polimorfonucleares indica processo um infeccioso (NADE, 2003).

Exames de imagem podem ser usados somente para comprovar uma suspeita clínica e não podem ser usados como diagnóstico. Imagens radiográficas não revelam anormalidades nos primeiros dias da infecção, somente demonstram doenças articulares pré-existentes. A radiografia pode ser usada para monitorar a resposta ao tratamento e a ultrassonografia pode ser útil para confirmar efusão (derrame) articular, que corresponde a um aumento do fluido articular (SHIRTLIFF; MADER, 2002).

O diagnóstico molecular através do uso do PCR (reação em cadeia de polimerase) tem surgido como uma alternativa complementar de diagnóstico. A aplicação de técnica de PCR com primers derivados de regiões altamente conservadas de bactérias, o gene 16S rDNA, tem sido usado com sucesso na detecção de bactérias (BONILLA et al., 2011).

O tratamento para a artrite séptica é iniciado com o uso apropriado de antibióticos, sendo que enquanto o microrganismo não é identificado um tratamento empírico pode ser iniciado. A escolha do tratamento empírico deve depender da apresentação clínica da patologia, fatores de risco e conhecimento sobre a prevalência local de patógenos resistentes a alguns antibióticos (SHARFF; RICHARDS; TOWNES, 2013; WESTON et al., 1999).

Em caso de suspeita de artrite séptica gonococcal, ceftriaxona juntamente com azitromicina ou doxiciclina pode ser usado e o tratamento deve ser mantido por 7 a 14 dias (SHARFF; RICHARDS; TOWNES, 2013). Para a artrite séptica não gonococcal algumas indicações estão demonstradas na Tabela 2. Em caso de suspeita de bactéria gram negativa são indicados cefalosporinas de 3^a e 4^o geração, que agem inibindo a biossíntese de

peptídeoglicano, um componente da parede celular bacteriana (GARC, 2009; PERERA, J; GIL, H; SANTANA, 2001). Para suspeita de gram positivo cefalosporinas e penicilinas, que inibem a síntese da parede celular bacteriana e ainda lincosamidas, que inibem a síntese proteica nos ribossomos podem ser utilizadas. Em caso de suspeita de *S. aureus* resistente a algumas penicilinas como meticilina (MRSA), vancomicina é indicada (CHANDER; COAKLEY, 2011). A via de administração pode ser parenteral ou oral e o tratamento pode durar de 3 a 4 semanas (GOLDENBERG, 1998).

Tabela 2: Antibióticos utilizados no tratamento empírico para artrite séptica.

TRATAMENTO ANTIBIOTICOTERÁPICO EMPÍRICO PARA ARTRITE SÉPTICA	
Suspeita de gram negativo	Ceftriaxona, Cefepime
Suspeita de gram positivo	Clindamicina, Cefazolina, Flucloxacilina ou Gentamicina
Suspeita de MRSA	Vancomicina (em caso de alergia Linezolidina ou Daptomicina)

Adaptado de (BRANSBY-ZACHARY, 2012; GARC, 2009;

O tratamento complementar pode ser realizado com drenagem e remoção do material purulento da articulação. A drenagem por artroscopia é utilizada principalmente no joelho e

ombro, pois há melhor visualização da articulação. Quando a artroscopia não pode ser realizada, um procedimento cirúrgico é indicado (GOLDENBERG, 1998).

1.2 Neutrófilos e resposta imune inata ao *S. aureus*

Ao infectar o tecido, *S. aureus* é capaz de desencadear a resposta imune inata. Esta resposta inicial consiste no processo inflamatório com secreção de citocinas, proteínas do complemento, participação de fagócitos e principalmente ação de neutrófilos (TOSI, 2005). Neutrófilos são granulócitos de vida curta derivados de células tronco pluripotentes da medula óssea. Após a maturação, os neutrófilos são liberados na circulação e tem meia vida de 10 a 24 horas. Porém ao migrarem para o tecido a meia vida destes leucócitos aumenta consideravelmente e dependendo do estímulo eles podem sobreviver por mais 1 ou 2 dias. Em condições fisiológicas os neutrófilos podem ser encontrados na medula óssea, baço, fígado, pulmão e sangue onde representam a maior população de leucócitos (60-70%) (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; RIGBY; DELEO, 2012).

No início do processo de diferenciação as células desenvolvem a capacidade fagocítica, microbicida dependente de radicais de oxigênio, aumento da adesão, motilidade e resposta quimiotática. A habilidade dos neutrófilos de migrar rapidamente para o sítio inflamatório bem como a capacidade de fagocitar corpos estranhos foi descrita no início do século XX. Estudos nos anos 80 e 90 caracterizaram em detalhes essa capacidade dos neutrófilos incluindo a ativação de fagócitos e função das proteínas de seus grânulos (RIGBY; DELEO, 2012).

Para exercer suas funções o neutrófilo precisa migrar através do endotélio vascular para o sítio inflamatório. Estímulos quimiotáticos são necessários para o início deste processo.

As respostas quimiotáticas são direcionais e ocorrem quando a célula é exposta a um gradiente de sinal e migra através do aumento na concentração destes estímulos. Muitos quimioatraentes são gerados pelo hospedeiro e incluem: proteína C5a do complemento, metabólitos da via do ácido araquidônico como o Leucotrieno B₄, fator ativador de plaquetas (PAF), neuropeptídeos e quimiocinas específicas (HARVATH, 1991).

Na maioria dos tecidos, a cascata de recrutamento dos neutrófilos envolve ligação ao endotélio, rolamento, adesão, rastejamento (crawling) e transmigração, conforme demonstrado na Figura 3. Estímulos bacterianos como LPS, peptídeos formilados originados de proteínas de bactérias ou mitocôndrias (fMLP) e citocinas produzidas pelo hospedeiro como o TNF- α , IL-1 β e IL-17 induzem as células endoteliais a produzirem moléculas de adesão como P selectinas, E selectinas e integrinas, como as moléculas de adesão intracelulares (ICAMs). Em resposta o neutrófilo expressa duas proteínas em sua superfície que reconhecem os estímulos do endotélio, a glicoproteína ligante de P-selectina 1(PSGL-1) e L selectina (AMULIC et al., 2012).

Em seguida os neutrófilos rolam no endotélio e este rolamento exige a formação e quebra de pontes de ligação. O rolamento facilita seu contato com quimiocinas do endotélio e induzem sua ativação. Quimiocinas da família CXC tem um papel essencial na ativação de neutrófilos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Após o rolamento os neutrófilos aderem fortemente ao endotélio através de sua ligação a integrinas β 2 do endotélio. Uma vez aderido o neutrófilo realiza um processo denominado rastejamento, que lhe permite se mover sobre o endotélio a procura do melhor sítio para migração. Quando o neutrófilo chega próximo a junção celular endotelial ocorre o processo de transmigração, que é dependente das integrinas ICAM 1 e 2 e VCAM 1(proteína de adesão celular vascular) (AMULIC et al., 2012).

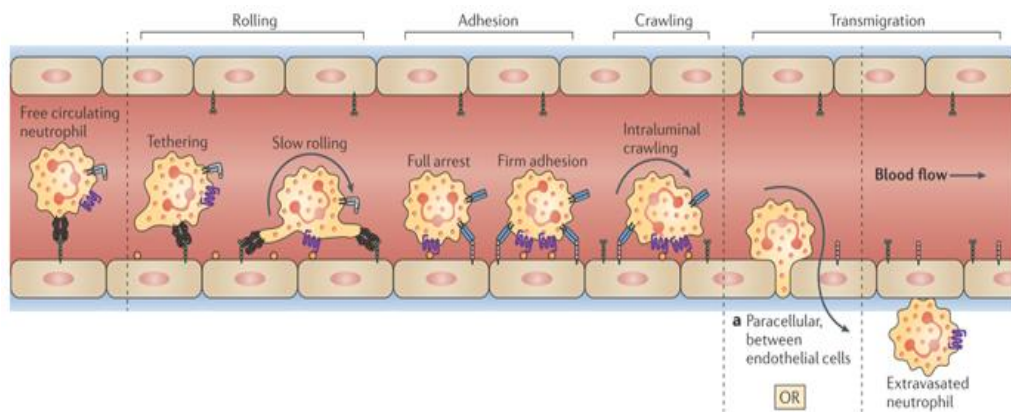


Figura 3: Processo de migração do neutrófilo para o espaço extracelular.

Retirado de (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013)

N

O

tecido inflamado, os neutrófilos podem exercer suas funções através da liberação de grânulos, vesículas, enzimas, espécies reativas, mediadores inflamatórios e netose (BORREGAARD, 2010). O neutrófilo possui três tipos de grânulos: os primários ou azurofílicos, que contém mieloperoxidase (MPO), enzimas proteolíticas (catepsinas, proteinase-3 e elastase) e defensas. Grânulos secundários incluem flavocitocromo, lactoferrina, colagenase, receptores para peptídeos quimiotáticos, citocinas, opsoninas e proteínas de adesão. Os grânulos de gelatinase ou terciários contém alguns antimicrobianos e é local de armazenamento de gelatinase e leucolisina (PHAM, 2006).

Após a ativação, os neutrófilos mobilizam grânulos que se fundem com a membrana plasmática ou fagossomos e seu conteúdo é secretado no ambiente. Três tipos de produtos antimicrobianos podem ser secretados: peptídeos catiônicos e proteínas que ligam a membrana do microrganismo; enzimas e ainda proteínas capazes de privar os microrganismos de nutrientes. Além disso, neutrófilos podem produzir espécies reativas de oxigênio (ROS)

em um processo chamado de “burst” respiratório (AMULIC et al., 2012). Neutrófilos também possuem vesículas secretórias que são criadas por endocitose durante a maturação destas células na medula óssea e são ricas em fosfatase alcalina e em receptores associados à membrana como β 2-integrinas CD-11b/CD-18, receptor 1 do complemento (CR1) e CD14. A incorporação das vesículas na superfície dos neutrófilos ocorre em resposta a vários agentes quimiotáticos (BORREGAARD, 2010).

Em condições inflamatórias, neutrófilos podem secretar estruturas intracelulares compostas por cromatina, histonas e proteínas granulares para o meio extracelular. Estas estruturas são denominadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). As NETs contém histonas antimicrobianas, MPO e proteases ativas sendo desta forma capazes de causar a morte do microrganismo (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Há evidências de distintos fenótipos e subtipos de neutrófilos com diversos papéis em infecções, processos inflamatórios e câncer. Estes subtipos podem ser identificados através da expressão de marcadores moleculares, porém suas características funcionais ainda não estão bem elucidadas (BEYRAU; BODKIN, 2012; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

O recrutamento de neutrófilos da vasculatura para os tecidos é essencial para o sucesso da resposta do hospedeiro a microrganismos, mas o acúmulo excessivo de tais neutrófilos nestes locais pode causar dano ou destruição do tecido. Uma vez ativadas estas células liberam vários mediadores como proteases, grânulos e proteínas capazes de causar a lesão tecidual (VERDRENGH; ERLANDSSON-HARRIS; TARKOWSKI, 2000).

1.3 5- Lipoxigenase e mediadores lipídicos

Mediadores lipídicos, como leucotrienos e lipoxinas, tem importante função na ativação, recrutamento celular e resolução do processo inflamatório. Conforme demonstrado na figura 4, para a biossíntese destes mediadores o precursor ácido araquidônico (AA) é liberado de fosfolípidios da membrana e metabolizado pela enzima 5-Lipoxigenase (5-LO) juntamente com a proteína ativadora de 5-LO (FLAP). 5-LO converte o AA em Leucotrieno (LT) A₄ que pode depois ser convertido em LTB₄ pela LTA₄ hidrolase, conjugado com glutationa para formar o LTC₄ através da LTC₄ sintase ou ainda ser metabolizado em lipoxina (LX) A₄ e B₄ (PERGOLA; WERZ, 2010). A expressão de 5-LO ocorre principalmente em neutrófilos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos B, juntamente com a expressão de FLAP. Eritrócitos, plaquetas, células endoteliais e linfócitos T não expressam a enzima (WERZ, 2002).

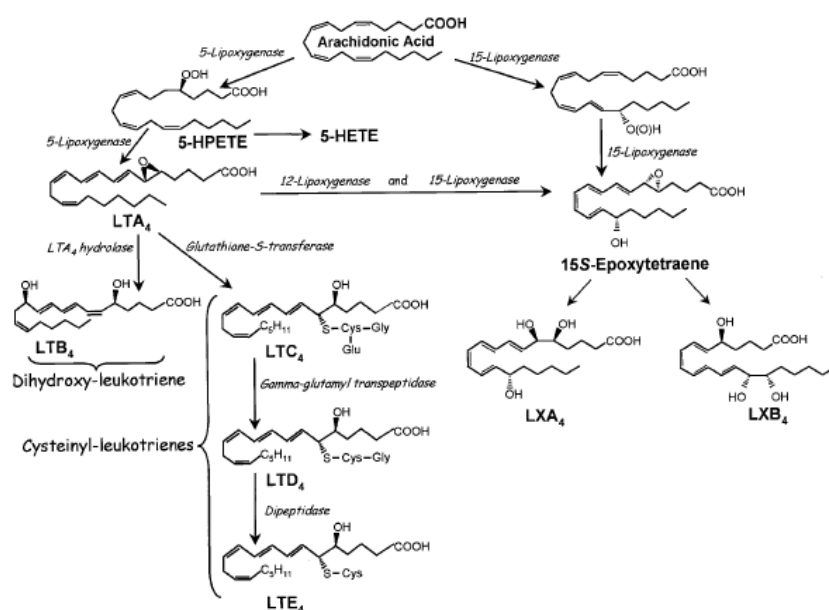


Figura 4: Biossíntese dos leucotrienos a partir de fosfolípidios.

O LTB₄ possui ação em várias células do sistema imune conforme demonstrado na Tabela 3. Em neutrófilos estimula a quimiotaxia bem como aumenta a interação destas células com o endotélio, além de auxiliar na sua ativação e conseqüente degranulação e secreção de mediadores (BUSSE, 1998). Neutrófilos possuem dois receptores para LTB₄. O receptor BLT-1 possui alta afinidade por LTB₄ e medeia as ações pro- inflamatórias e quimioatraentes. O outro receptor é o BLT 2 que possui baixa afinidade pelo LTB₄ e suas funções são pouco conhecidas em comparação ao BLT1 (PETERS-GOLDEN; HENDERSON, 2007).

Tabela 3: Efeito de LTB₄ em algumas células do sistema imune.

CÉLULA	EFEITO DE LTB₄
Eosinófilo	Quimiotaxia Ativação de NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
Macrófago	Quimiotaxia Produção de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α Produção de peróxido de hidrogênio
Neutrófilo	Quimiotaxia Adesão a parede endotelial Secreção de enzimas lisossomais e geração de radicais superóxidos Produção de IL-8

Adaptado de (CROOKS; STOCKLEY, 1998)

Microrganismos possuem a capacidade de estimular a geração de leucotrienos por leucócitos. Isto ocorre em função da ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a microrganismos (MAMPs), a receptores de reconhecimento padrão, como receptor de manose e TLR. Essa ligação ativa uma cascata de sinalização intracelular que culmina na indução de mediadores pró- inflamatórios, dentre estes a síntese de leucotrienos (PETERS-GOLDEN et al., 2005).

Dependendo do patógeno envolvido, o LTB₄ pode apresentar várias funções em infecções. Por exemplo, em infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*, a ausência de 5-lipoxigenase (animais 5-LO^{-/-}) ou a inibição farmacológica de 5-LO, FLAP ou uso de antagonista do receptor de LTB₄ levaram a uma diminuição da fagocitose da bactéria por macrófagos alveolares (MANCUSO; NANA-SINKAM; PETERS-GOLDEN, 2001). Em estudo *in vitro* com cultura de polimorfonucleares humanos, foi demonstrado que LTB₄ é capaz de induzir a secreção de defensinas com atividade antimicrobiana por esta célula em resposta a *S. aureus* e *Escherichia coli* (FLAMAND; TREMBLAY; BORGEAT, 2007). Ainda, em modelo de sepse letal por perfuração e ligação cecal (L-CLP), foi demonstrado que animais tratados com inibidores da síntese de LTB₄ apresentaram menor recrutamento de neutrófilos e maior quantidade de bactérias na cavidade peritoneal (RIOS-SANTOS et al 2003). Assim, de acordo com o exposto acima, os produtos originados da via da 5-LO, principalmente o LTB₄, têm uma grande importância na ativação de leucócitos em diferentes contextos, principalmente em processos infecciosos, visto que estes produtos são capazes de induzir a fagocitose e consequente morte do patógeno por parte dos leucócitos.

Lipoxinas apresentam funções antagônicas ao LTB₄, sendo consideradas anti-inflamatórias e pró- resolutivas. Estes mediadores são capazes de promover um aumento de macrófagos não inflamatórios para o local da infecção, levando a resolução da inflamação e reparo tecidual. Além disso, são capazes de estimular macrófagos a fagocitar neutrófilos apoptóticos resultando em menor dano tecidual (STABLES; GILROY, 2011). Alguns estudos demonstram em vários modelos animais que lipoxinas são capazes de diminuir níveis de citocinas inflamatórias e em algumas infecções bacterianas é capaz de reduzir os níveis bacterianos (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral: Investigar o papel da enzima 5-lipoxigenase na patogênese da artrite séptica experimental

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Padronizar o modelo de artrite séptica experimental em camundongos

a. Avaliar a resposta inflamatória após a infecção com diferentes inóculos de *S. aureus* através dos seguintes parâmetros: recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular e quantificação da carga bacteriana presente na articulação.

b. Realizar uma cinética da resposta inflamatória após a infecção por *S. aureus* e avaliar os parâmetros: recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular, quantificação de citocinas e quimiocinas no tecido periarticular, quantificação da carga bacteriana presente na articulação e avaliação da intensidade de hipernocicepção.

c. Avaliar os aspectos morfológicos da articulação através dos parâmetros histopatológicos nos diferentes tempos após a infecção com *S. aureus*.

2.2.2 Avaliar a participação da enzima 5-lipoxigenase na resposta inflamatória induzida pela a injeção intra-articular de *S. aureus*.

- a. Avaliar se animais deficientes para a enzima 5-lipoxigenase ($5\text{-LO}^{-/-}$) apresentam resposta inflamatória diferente após a infecção quando comparados com animais selvagens (WT) através dos seguintes parâmetros inflamatórios: recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular, quantificação de quimiocinas no tecido periarticular, quantificação da carga bacteriana presente na articulação e avaliação da intensidade de hipernocicepção.
- b. Avaliar os aspectos morfológicos da articulação através dos parâmetros histopatológicos entre animais WT e $5\text{-LO}^{-/-}$ após a infecção com *S. aureus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os experimentos de padronização do modelo experimental de artrite séptica, foram utilizados animais C57/Bl6 machos com idade de 6 a 8 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG, mantidos em condições adequadas com livre acesso a água e comida e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Para a avaliação da participação da enzima 5-lipoxigenase na inflamação articular induzida por *S. aureus*, foram utilizados animais selvagens da linhagem SV129 e animais deficientes para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO^{-/-}). Estes animais foram criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia. Foram utilizados com idade de 6 a 8 semanas, mantidos em condições adequadas com livre acesso a água e comida e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Todos os experimentos realizados com os animais foram feitos dentro das normas do Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG conforme protocolo nº. 236 / 2012 (Anexo 1).

3.2 Bactéria

Foi utilizada cepa ATCC 6538 de *S. aureus* cedida pelo Professor Waldiceu Verri Jr da Universidade Estadual de Londrina. A bactéria foi reconstituída em caldo BHI (infusão de coração e cérebro) e armazenada em alíquotas de 100 µL com 20 % de glicerol a -80° C. Para

a infecção uma alíquota foi semeada em placa com ágar sangue (ágar BHI com 5% de sangue de carneiro) com tempo de crescimento de 24h a 37°C. O inóculo foi preparado com diluição da bactéria crescida em tampão fosfato salino (PBS) estéril e a absorbância lida em espectrofotômetro a 625 nm e ajustada até grau de turbidez 4 da Escala de McFarland. Diluições seriadas foram realizadas até obter as diferentes concentrações (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 unidades formadoras de colônia- UFC).

3. 3. Estratégia experimental

Inicialmente os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 60 mg/kg de cetamina e 4mg/kg de xilazina. Em condições estéreis uma das articulações inferiores foi depilada e foi feita uma injeção intra-articular de *S. aureus* (10 µL). Os animais controles receberam a injeção com PBS estéril (10µL). Para a padronização foi realizado um inóculo resposta com 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC e os animais foram eutanasiados após 7 dias. Para realização da cinética do modelo experimental o inóculo utilizado foi 10^7 UFC e os animais foram eutanasiados em 1, 7, 14 e 28 dias após a injeção. Ao utilizar os animais 5- LO^{-/-} e selvagens, o inóculo utilizado foi 10^7 UFC e os animais foram eutanasiados 7 dias após a injeção.

Após a eutanásia, a cavidade articular foi lavada 2 vezes com 5 µL cada de uma solução de PBS contendo 3 % de albumina bovina metilada (aqui denominado apenas BSA 3%). O lavado foi armazenado em tubo contendo 90 µL de PBS com 3 % de BSA e, posteriormente, foi feita a contagem total e diferencial de leucócitos presentes no lavado. O tecido articular foi removido e conservado a 4° C para posterior processamento para ensaio de ELISA (Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima) e toda articulação foi dissecada para recuperação de bactéria ou análise histológica.

3.4 Contagem total e diferencial de células inflamatórias

Para a contagem total, 20 µL do lavado articular foi diluída 3 vezes em solução de lise de hemácias Turk e a contagem foi feita em câmara de Neubauer. Ao restante do lavado, foi acrescido 50 µL de BSA 3% e citocentrifugado para confeccionar as lâminas para a contagem diferencial. As lâminas foram coradas em corante panótico (Laborclin, Paraná) e a contagem diferencial de células (mononucleares e neutrófilos) foi feita em microscópio óptico em aumento de 100 vezes. Foram contadas 100 células utilizando um contador diferencial de células mecânico (Benfer, São Paulo) e feita a porcentagem dos tipos celulares estudados baseando na contagem total utilizando-se uma regra de três simples. O número de células foram plotados como o valor obtido multiplicado pela diluição (3 x) e pelo fator de correção da câmara de Neubauer (10^4).

3.5 Recuperação do *S. aureus* do tecido articular

O tecido articular foi dissecado do animal de forma estéril e macerado em cadinho com 500 µL de PBS estéril. Em seguida 100 µL desse homogenato foi semeado em placa de petri contendo ágar sangue (ágar BHI com 5% de sangue de carneiro) e incubado em estufa a 37° C por 24 horas. Após este período foi feita a contagem das colônias, sendo consideradas positivas as placas com crescimento superior a 15 colônias. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) por articulação.

3.6 Processamento do tecido articular e ensaio de ELISA

O tecido foi pesado e acrescentado solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, Cloreto de Benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20 KI de Aprotinina) na proporção de 1mL por 100mg de tecido. O tecido foi processado em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi mantido a 4° C para o ensaio de ELISA.

O ensaio de ELISA foi realizado conforme informações do fabricante. O anticorpo de captura de interesse foi adicionado a placa de 96 poços e incubado por 24h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 e bloqueadas por 2h com PBS contendo 1% de BSA à temperatura ambiente. As amostras e o padrão de interesse foram diluídos 3x (em PBS 1x contendo 0,1% BSA) e incubados por 24h a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes (com PBS contendo 0,05% Tween-20) e a placa foi incubada na presença de anticorpos de detecção. Após 2h, foi adicionada a placa uma solução contendo streptavidina ligada à peroxidase. Após 20min, as placas foram novamente lavadas e foi adicionado tampão contendo ortofenildiamina (OPD). A reação foi interrompida adicionando-se de H₂SO₄. A densidade óptica foi quantificada com o uso do leitor de placas de ELISA no comprimento de onda de 490nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

3.7 Hipernocicepção

Esta avaliação foi realizada pelo teste de pressão crescente na pata, também conhecido como método von Frey eletrônico (MÖLLER; JOHANSSON; BERGE, 1998). Os animais ficam acondicionados em caixas de acrílico que são acomodadas sobre uma estante. Esta

estante fornece como assoalho uma rede de malha que permite a utilização de um espelho acoplado 25 cm abaixo das caixas com inclinação de aproximadamente 35 graus possibilitando a visualização das patas dos animais, conforme demonstrado na Figura 5 A.

Para a realização do teste foi utilizado um analgesímetro digital que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g), com precisão de 0,1g. Para o contato do transdutor de pressão com a pata dos animais, foi adaptada uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro. Assim, uma pressão manual e linearmente crescente, realizada na região plantar da pata dos animais, foi proporcionada por intermédio desta ponteira adaptada, de maneira a produzir uma resposta característica de retirada da pata estimulada, conforme demonstrado na Figura 5 B.

3.8 Histologia

O tecido articular foi coletado e acondicionado em cassetes para histologia que permaneceram por 48 horas em solução de formol tamponado 10%. Em seguida os cassetes foram transferidos para solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 14% para descalcificação óssea por 30 dias. Neste período foi feita a troca da solução de EDTA a cada 48 horas. O processamento foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da UFMG onde o tecido foi submetido a passagens subsequentes

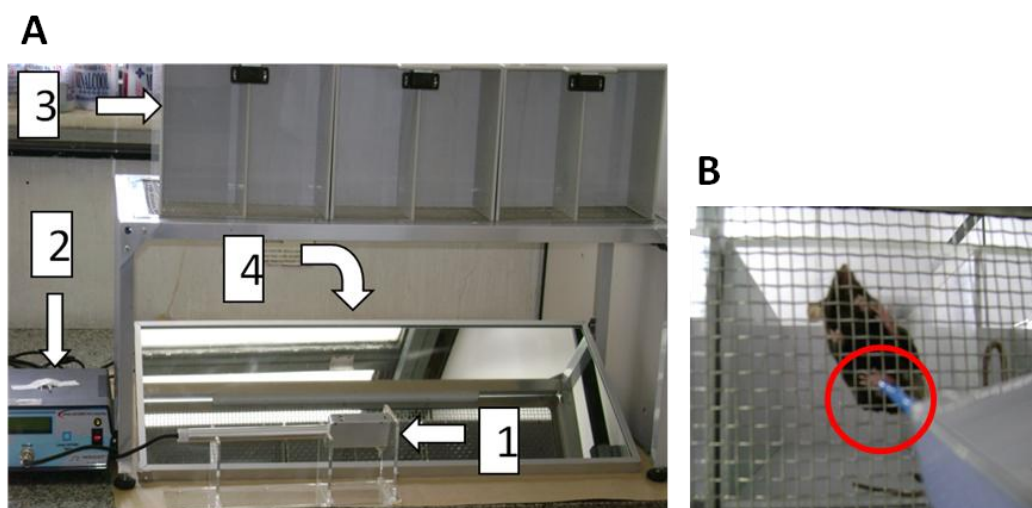


Figura 5: Aparato utilizado para medida de hipernociceção pelo método de Von Frey eletrônico. (A) O sensor de pressão (1) está conectada em um aparato (2) que informa, em gramas, a carga suportada pelos animais. Os mesmos são acondicionado nas caixas de acrílico (3) e, através da visualização da pata no espelho (4), são estimulados até que uma resposta característica de retirada da pata é observada. (B) O estímulo com a ponteira do analgesímetro ocorre através da grade.

em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 a 30 minutos cada) e incluído em parafina. Foram realizados cortes em micrótomo e confecção de duas lâminas por corte. Um corte foi corado com Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e foram observados os seguintes parâmetros: gravidade da hiperplasia sinovial (0-3), intensidade e extensão do infiltrado (0-4) e reabsorção óssea (0-2).

O segundo corte foi utilizado para avaliar o conteúdo de proteoglicano. Inicialmente o corte foi desparafinado e hidratado em xilol (1, 2 e 3) e álcool (absoluto, 70 e 50%) por 5 minutos cada e em seguida lavado também por 5 minutos em água. Posteriormente foi feita coloração com azul de toluidina(0,5% de azul de toluidina e 1% de borato de sódio) por 10 segundos, após o excesso da coloração foi retirado em álcool absoluto, 70% e xilol 1 e 2 por 5 minutos cada. Imagens da superfície articular de cada amostra foram digitalizadas e avaliadas utilizando software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda). O resultado foi expresso através da porcentagem de perda do proteoglicano que é equivalente a área não corada em relação a superfície total avaliada, conforme demonstrado na Figura 6.

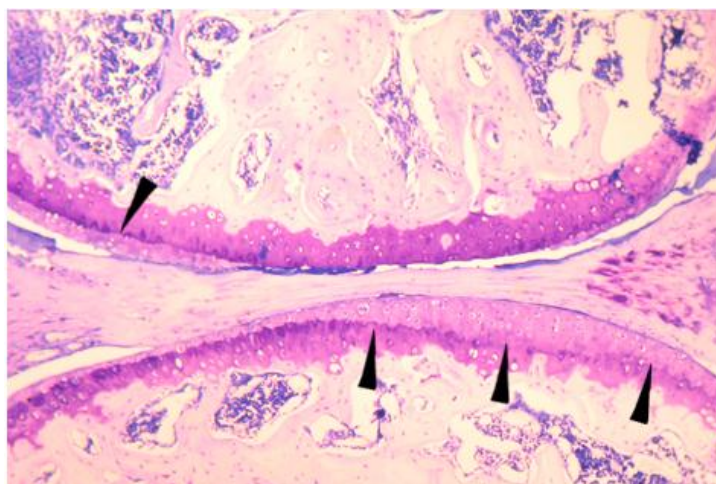


Figura 6: Método para a avaliação da perda de proteoglicano presente na articulação. Superfície articular após a coloração com azul de toluidina. As setas demonstram uma linha delimitando a parte com coloração mais clara, região que apresenta perda de proteoglicano, da região com coloração escura, onde o proteoglicano está presente.

3.9 Análise estatística

Os dados foram 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 Student-Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0.05$. Diferenças entre o grupo infectado e seu controle não infectado com $p < 0.05$ foram representadas graficamente com um asterisco (*); diferenças com $p < 0.01$ foram representadas com dois asteriscos (**) e com $p < 0.001$ com três asteriscos (***). Diferenças entre os grupos infectados com $p < 0.05$ foram representadas graficamente com um símbolo (#); diferenças com $p < 0.01$ foram representadas com dois símbolos (##) e com $p < 0.001$ com três símbolos (###).

4. RESULTADOS

4.1 Padronização do modelo experimental de artrite séptica

Para esta padronização foram utilizados os inóculos 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC de *S. aureus*. Sete dias após a injeção intra-articular de *S. aureus*, houve a eutanásia dos animais para a avaliação dos parâmetros inflamatórios. De acordo com a Figura 7, em todos os inóculos houve um aumento no número total de leucócitos (Figura 7A) na cavidade articular, incluindo número de neutrófilos (Figura 7B) e de mononucleares (Figura 7C) quando comparados aos animais não infectados. Destes, o inóculo de 10^7 UFC foi aquele que induziu um maior recrutamento celular (Figura 7 A, B e C), principalmente no número de neutrófilos (Figura 7 B). Associado ao número de células foi possível recuperar a carga bacteriana presentes na articulação (Figura 7 D), porém não houve diferença significativa entre os inóculos.

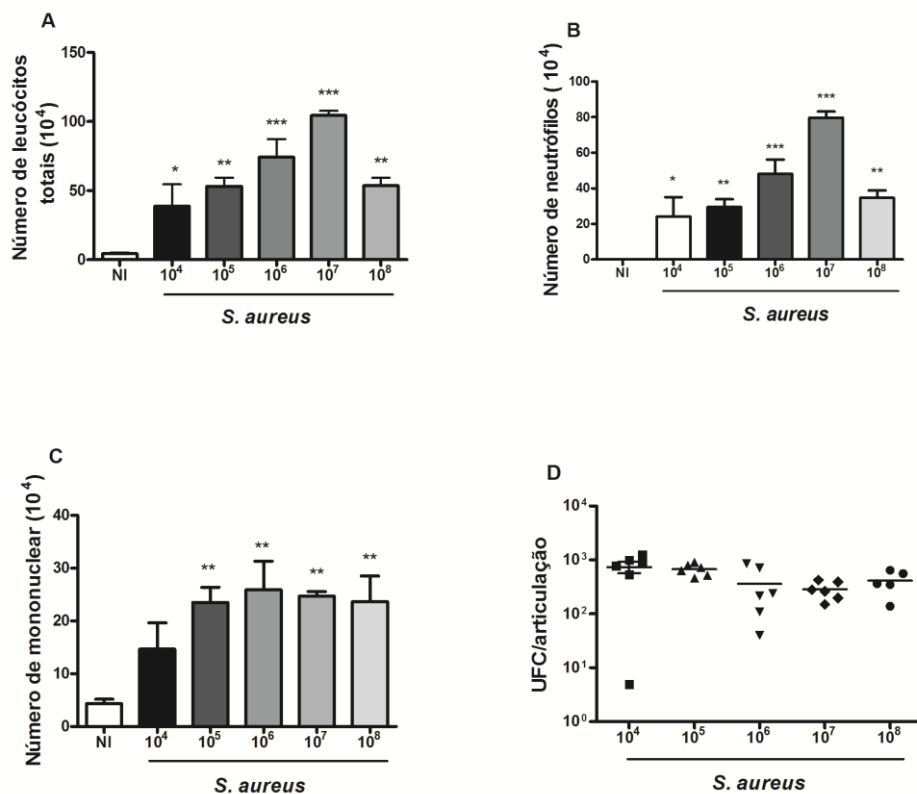


Figura 7: Padronização do modelo experimental de artrite séptica em camundongos. Foi realizado um inóculo resposta (UFC 10^4 - 10^8) com a injeção intra-articular de *S. aureus* ($10\mu\text{L}$). Sete dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a recuperação de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) e de células mononucleares (C) migrados para a cavidade articular. Ainda, foi avaliada a carga bacteriana presente na articulação (D). * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls. Foram utilizados 6 animais por grupo. UFC: unidades formadoras de colônia.

4.2 Cinética da resposta inflamatória após a injeção intra-articular de *S. aureus*

Para a realização da cinética, o inóculo utilizado foi de 10^7 UFC, uma vez que esse inóculo promoveu um maior recrutamento de células para a cavidade articular (Figura 7). Em todos os tempos avaliados, houve um aumento significativo no número de células totais (Figura 8 A), neutrófilos (Figura 8 B) e células mononucleares (Figura 8 C) para a cavidade articular em relação aos animais não infectados. O pico do número de leucócitos totais e de neutrófilos foi no sétimo dia após a infecção, ao passo que o maior número de células mononucleares ocorreu 14 dias após a infecção (Figura 8 C). Ainda, em todos os dias avaliados, foi possível recuperar bactérias da articulação (Figura 8 D) dos animais infectados com *S. aureus*. Neste caso, no primeiro dia após a infecção houve uma maior recuperação da carga bacteriana, a qual decresceu nos dias subsequentes.

Em relação à quantidade de citocinas e quimiocinas no tecido peri-articular, houve um aumento dos níveis da citocina IL-1 β (Figura 9 A) e das quimiocinas CXCL1 (Figura 9 B) e CCL2 (Figura 9 C) apenas no primeiro dia após a infecção quando comparados com os animais não infectados. Não houve aumento na quantidade desses mediadores em tempos mais tardios após a infecção. Ainda, a avaliação da hipernocicepção demonstrou que os animais infectados com *S. aureus* apresentaram um menor limiar de retirada da pata após o estímulo mecânico (von Frey eletrônico), representado assim, uma maior hipernocicepção ao longo dos 28 dias quando comparados com os animais não infectados (Figura 9 D).

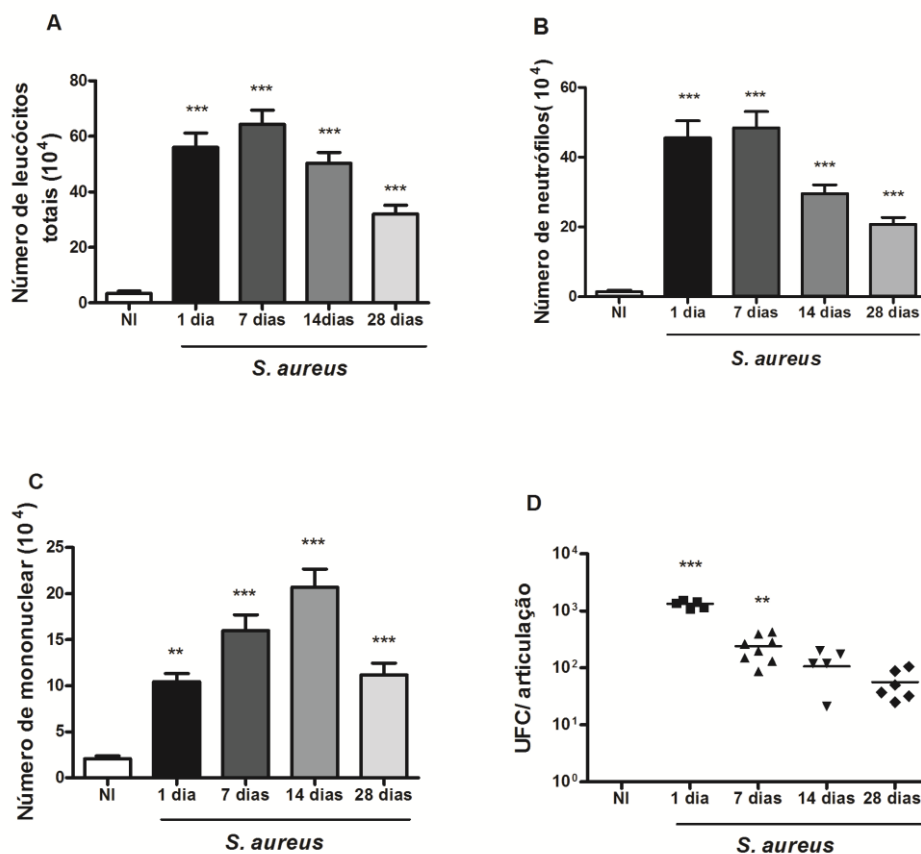


Figura 8: Cinética do recrutamento celular e carga bacteriana no modelo experimental de artrite séptica em camundongos. A análise foi realizada a partir do inóculo de 10^7 UFC com a injeção intra-articular de *S. aureus* (10 μ L). Os animais foram eutanasiados em vários tempos (1, 7, 14 e 28 dias) após a infecção, para a recuperação de leucócitos totais (A), de neutrófilos (B) e mononucleares (C) migrados para a cavidade articular. Ainda, foi avaliada a carga bacteriana presente na articulação (D). ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls. Foram utilizados 6 a 8 animais por grupo. UFC: unidades formadoras de colônia.

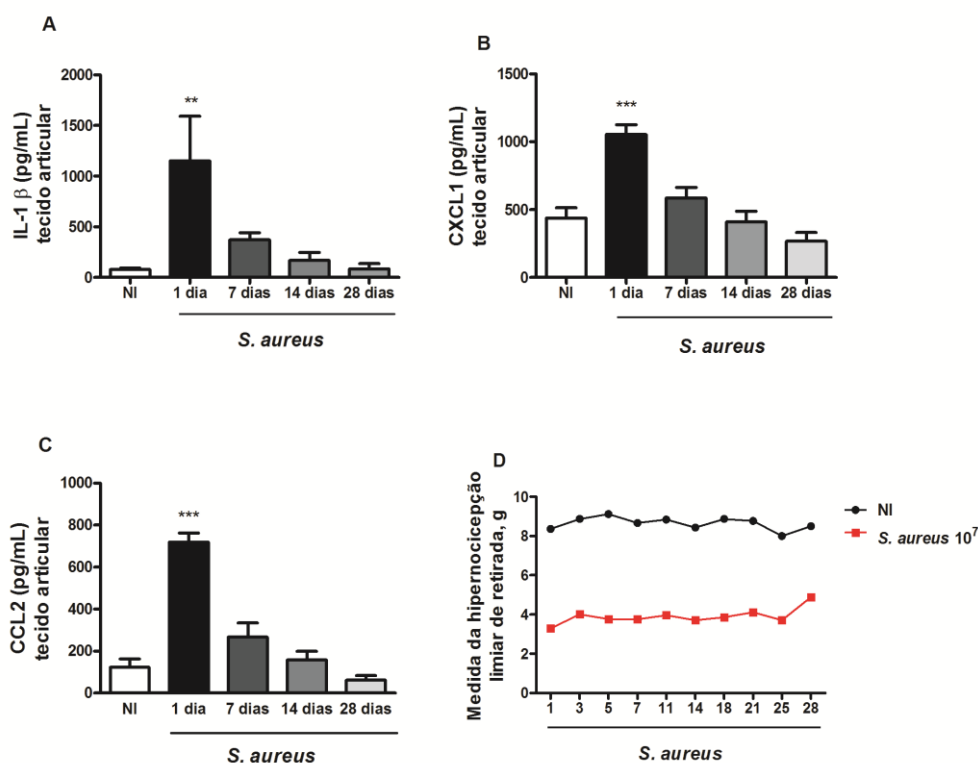


Figura 9: Perfil de citocinas e hipernociceção da cinética da resposta inflamatória no modelo experimental de artrite séptica em camundongos. A análise foi realizada a partir do inóculo de 10^7 UFC com a injeção intra-articular de *S. aureus* (10 μ L). Os animais foram eutanasiados em vários tempos (1, 7, 14 e 28 dias) e foi realizada a dosagem de citocina IL-1 β (A), quimiocinas CXCL1 (B) e CCL2 (C) presentes no tecido articular. A medida da hipernociceção a partir do limiar de retirada da pata (D) foi realizada ao longo de 28 dias após a injeção de *S. aureus*. ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls. Foram utilizados 6 a 8 animais por grupo.

4.2.1 Análise histológica da articulação após a injeção intra-articular de *S. aureus*

Os cortes histológicos foram corados com coloração de H&E, a análise foi realizada por um único patologista. Os cortes estão representados na Figura 10, sendo que as imagens localizadas a esquerda possuem aumento de 100 vezes, um local de interesse foi selecionado e está representado a direita em aumento de 400 vezes. Os animais não infectados apresentam tecido articular normal caracterizado por membrana sinovial íntegra e subíntima constituída de tecido adiposo (Figura 10 A). Sete dias após a injeção de *S. aureus* (Figura 10 B) os animais apresentaram grande infiltrado celular constituído principalmente por neutrófilos e hiperplasia da membrana sinovial. Em 28 dias após a injeção de *S. aureus* (Figura 10 C) há menor infiltrado celular comparando com os primeiros dias de infecção, de forma que o tecido é caracterizado basicamente por deposição de fibras colágenas. O escore histopatológico demonstra aumento dos parâmetros histológicos em todos os tempos avaliados quando comparado ao grupo não infectado, sendo que um aumento significativo ocorre em 7 dias em relação aos demais tempos (Figura 10 D).

Em condições fisiológicas pode ocorrer perda de proteoglicano na articulação, porém condrócitos são responsáveis por sua síntese e reparo. Já em condições patológicas o reparo é prejudicado e ocorre grande perda de proteoglicano (KNUDSON; KNUDSON, 2001). Animais em todos os tempos avaliados apresentaram perda de proteoglicano superior aos animais não infectados, sendo que a perda mais significativa ocorre em sete dias após a infecção (Figura 10 E).

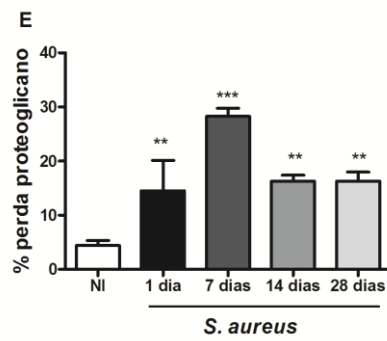
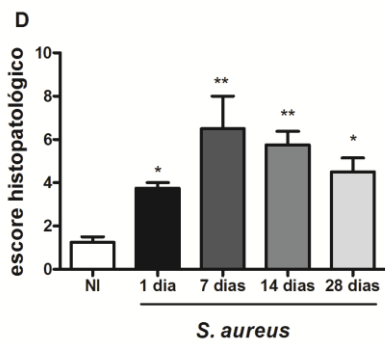
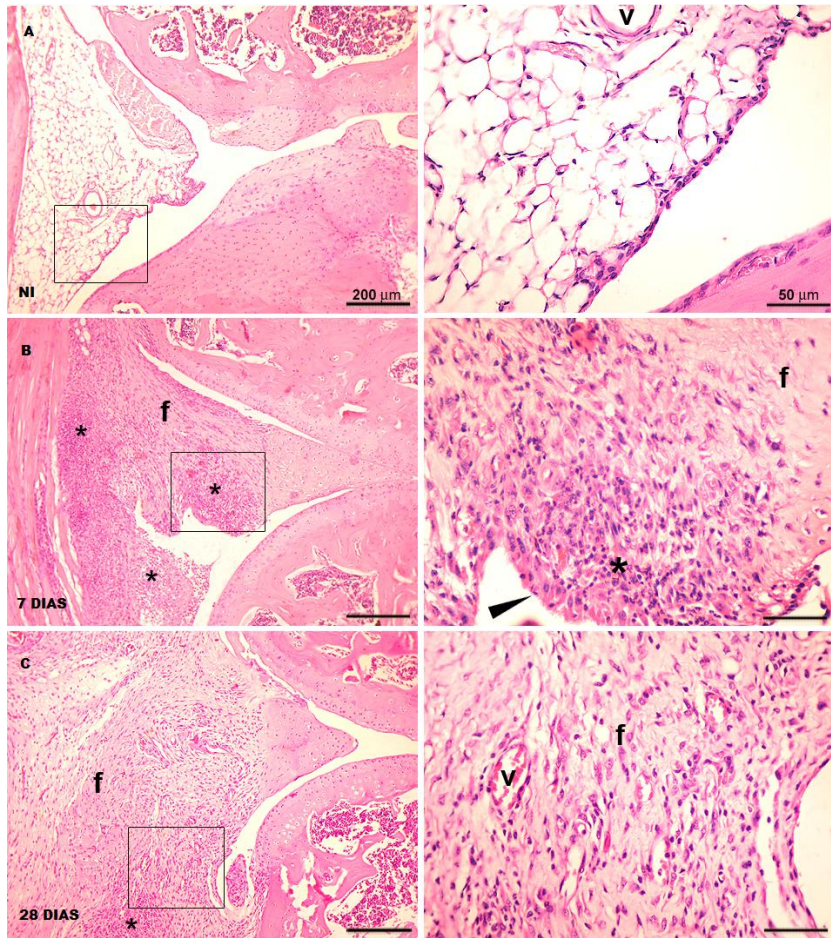


Figura 10: Análise histológica da cinética do modelo experimental de artrite séptica em camundongos. Foi realizada a partir do inoculo de 10^7 UFC com a injeção intra-articular de *S. aureus* (10 μ L). Os cortes histológicas representam animal não infectado (A), 7 dias após a injeção articular de *S. aureus* (B) e 28 dias após a injeção a articular de *S. aureus* (C). A soma dos parâmetros histológicos avaliados foi expressa como escore histopatológico (0-9) e está representado em (D). A porcentagem de perda de proteoglicano está representado em (E). As letras V apontam os vasos, f indica deposição de fibras de colágeno, * indica infiltrado celular composto principalmente por neutrófilos e a seta indica hiperplasia da sinóvia. Para as análises estatísticas * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls. Foram utilizados 4 animais por grupo.

4.3 Participação de 5-Lipoxigenase na resposta inflamatória da artrite séptica experimental

Para avaliar a participação da enzima 5-lipoxigenase, foram utilizados animais da linhagem SV129 deficientes para a enzima (5-LO^{-/-}) e selvagens (WT), que receberam injeção intra-articular do inóculo de 10⁷ UFC de *S. aureus*. Os animais 5-LO^{-/-} apresentaram diminuição dos parâmetros inflamatórios como leucócitos totais (Figura 11 A), neutrófilos (Figura 11 B) e células mononucleares (Figura 11 C), avaliados em relação aos animais WT. De maneira interessante, os animais 5-LO^{-/-} também apresentaram menor quantidade de bactérias presentes no tecido articular (Figura 11 D) quando comparados com os animais WT.

Em relação à presença de quimiocinas na articulação, foi verificado que animais 5-LO^{-/-} apresentaram menor quantidade de CXCL1 e CCL2 em comparação com animais WT após a infecção com *S. aureus* (Figura 12 A e B). Ainda, animais 5-LO^{-/-} apresentaram menor resposta hipernociceptiva em relação aos animais WT infectados (Figura 12 C).

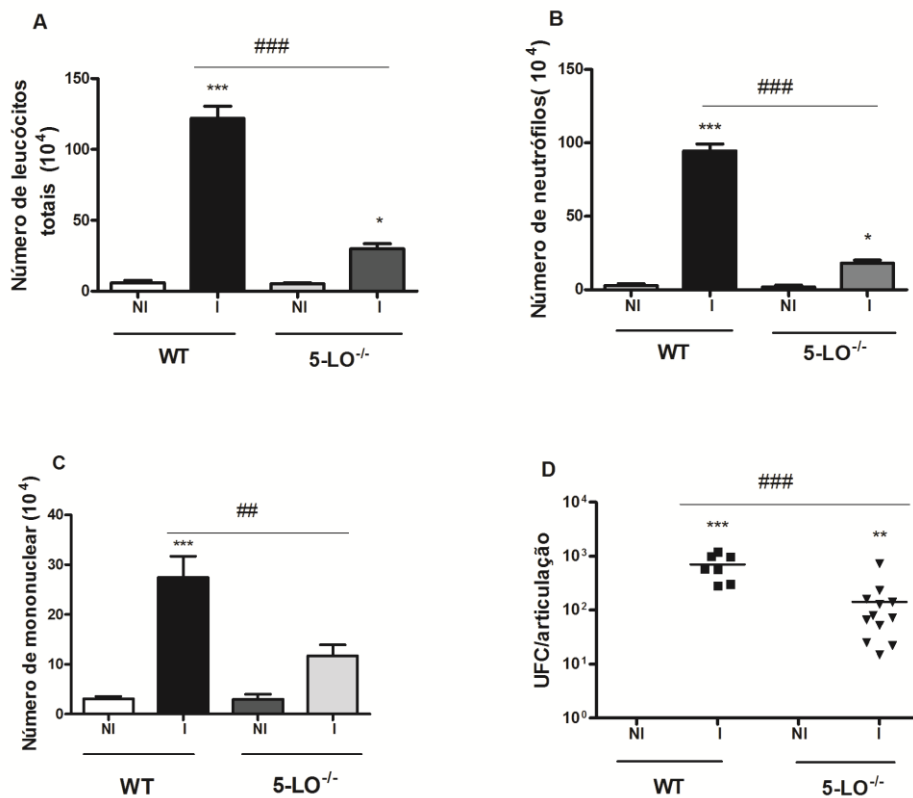


Figura 11: Participação da 5-lipoxigenase no recrutamento células inflamatórias e crescimento bacteriano articular após a injeção de *S. aureus*. Modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes na enzima 5-LO (5-LO^{-/-}) e selvagens (WT). Foi realizado a partir do inoculo de 10⁷ com injeção intra-articular de (10 μL). Sete dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a recuperação de leucócitos totais (A), de neutrófilos (B) e mononucleares (C) migrados para a cavidade articular. Ainda, foi avaliada a carga bacteriana presente na articulação (D). ** para p<0.01, *** para p<0.001 em relação ao grupo não infectado e ## para p<0.01, ### para p<0.001 em relação aos grupos infectados com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls. Foram utilizados 4 a 6 animais por grupo. UFC: unidades formadoras de colônia.

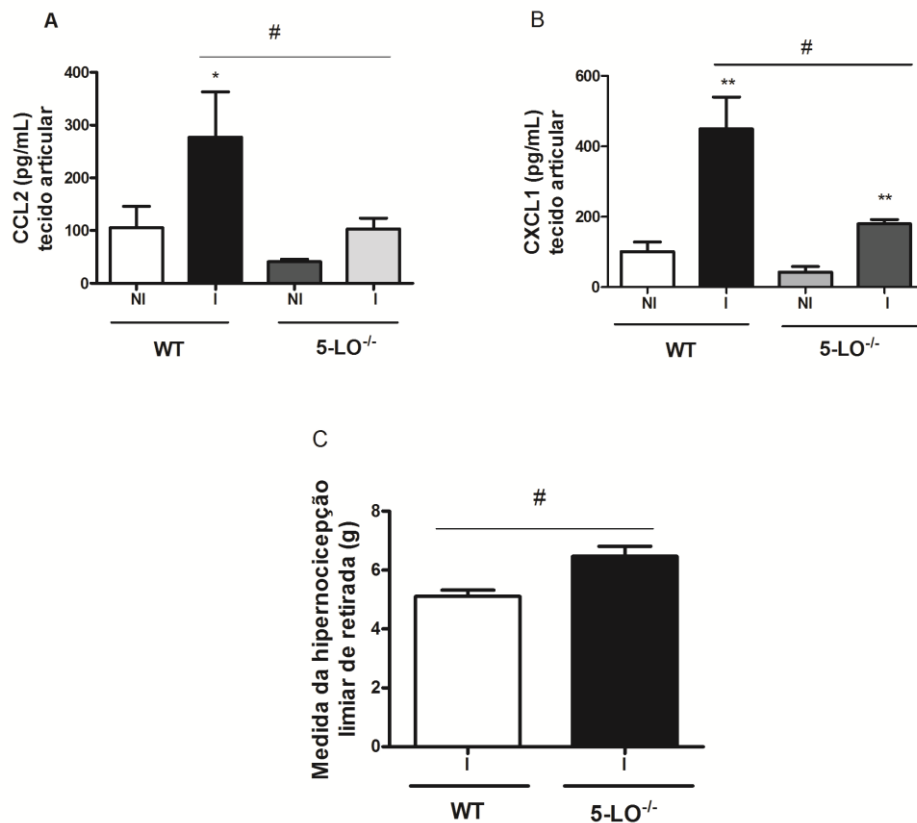


Figura 12: Perfil de quimiocinas e hipernociceção em animais deficientes para 5-LO e selvagens após a injeção de *S. aureus*. Animais deficientes para 5-LO (5-LO^{-/-}) apresentaram menor quantidade de quimiocinas e menor hipernociceção. Animais 5-LO^{-/-} e WT foram infectados com um inóculo de 10⁷ UFC de *S. aureus* (10 μL) intra-articular. Os animais foram eutanasiados em 7 dias e foi realizada a dosagem das quimiocinas CCL2 (A) e CXCL-1 (B) presentes no tecido peri-articular e avaliação da hipernociceção (C). * para p<0.05 em relação ao grupo não infectado e # para p<0.05 em relação aos grupos infectados com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls e t teste não pareado. Foram utilizados 4 a 6 animais por grupo

4.3.1 Avaliação histológica da articulação em animais 5-LO^{-/-} após a injeção intra-articular de *S. aureus*

Os cortes histológicos foram corados com coloração de H&E, a análise foi realizada por um único patologista. Os cortes estão representados na Figura 13, sendo que as imagens localizadas a esquerda possuem aumento de 100 vezes e um local de interesse nesta imagem foi selecionado e está representada a direita em aumento de 400 vezes. Os animais não infectados WT e 5-LO^{-/-} apresentam tecido articular normal caracterizado por membrana sinovial íntegra e subíntima constituída de tecido adiposo (Figura 13 A e B). Sete dias após a injeção de *S. aureus* os animais WT apresentaram intenso infiltrado inflamatório constituído principalmente por neutrófilos (Figura 13 C), em contraste animais 5-LO^{-/-} os quais apresentaram pouco infiltrado inflamatório, caracterizado por neutrófilos e mononucleares e pelo tecido da subíntima que apresentou características semelhantes aos animais não infectados (Figura 13 D). Os animais 5-LO^{-/-} apresentam ainda menor escore histopatológico (Figura 13 E) e menor perda de proteoglicano (Figura 13 F) quando comparado ao animal WT infectados.

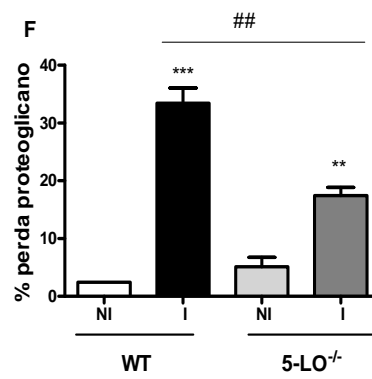
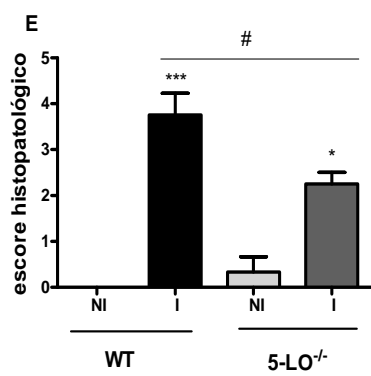
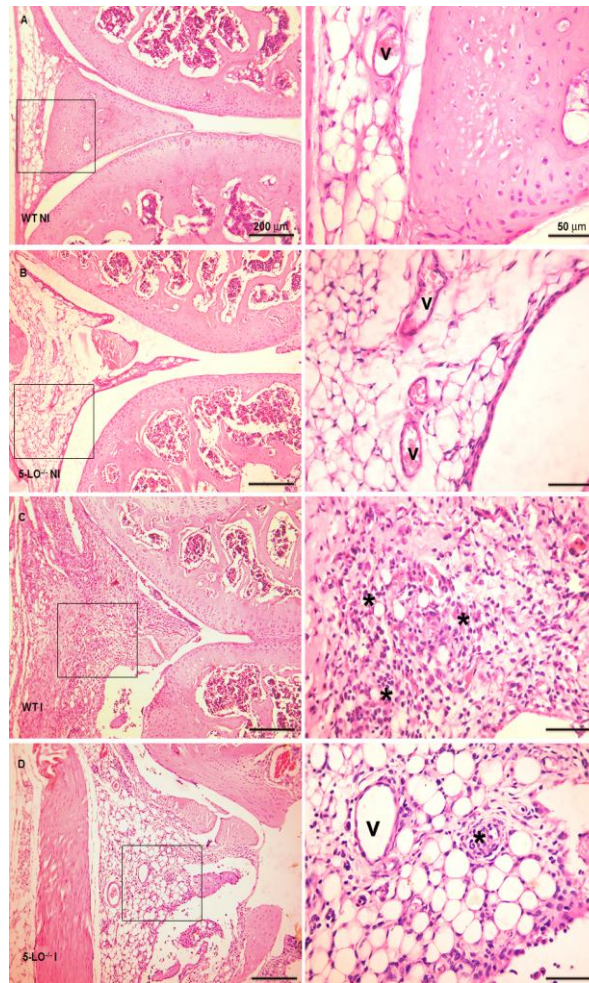


Figura 13: Análise histológica do modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes em 5-LO e WT após injeção de *S. aureus*. Foi realizada a partir do inoculo de 10^7 UFC com a injeção intra-articular de *S. aureus* (10 μ L). Os cortes histológicos foram realizados 7 dias após a injeção e representam animal WT não infectado(A), WT infectado(C), 5-LO^{-/-} não infectado (B) e 5-LO^{-/-} infectado (D). A soma dos parâmetros histológicos avaliados foi expressa como escore histopatológico (0-9) e está representado em (E). A porcentagem de perda de proteoglicano está representado em (F). As letras V apontam os vasos e * indica infiltrado celular composto por neutrófilos e mononucleares. Para as análises estatísticas * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado e # para $p < 0.05$, ## para $p < 0.01$ em relação aos grupos infectados com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls. Foram utilizados 4 animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

S. aureus é o principal patógeno humano responsável por causar significativa morbidade e mortalidade em infecções comunitárias e hospitalares (GRESHAM et al., 2000). A cavidade articular fornece condições ideais para a proliferação da bactéria, pois a cartilagem que compreende grande área de superfície da articulação é avascular, o que dificulta o extravasamento de células e proteínas do sistema imune (TARKOWSKI et al., 2002). Neste trabalho, foi padronizado um modelo experimental de artrite séptica através da injeção intra-articular de vários inóculos de *S. aureus*. O inóculo de 10^7 UFC apresentou maior recrutamento celular, principalmente de neutrófilos, que é a principal célula envolvida no combate a esta bactéria (DELEO; DIEP; OTTO, 2009). Além disso, este inóculo é amplamente utilizado em vários modelos de artrite séptica induzida por *S. aureus*, como no modelo com injeção intravenosa em camundongos (BREMELL; ABDELNOUR; TARKOWSKI, 1992) e injeção intravenosa em galinhas (RASHEED, 2011). De acordo com estes resultados, os experimentos posteriores foram realizados utilizando o inóculo de 10^7 UFC.

Primeiramente, é importante salientar que a padronização do modelo foi feita utilizando-se camundongos da linhagem C57/B16. Essa linhagem é diferente daquela utilizada para o estudo da enzima 5-LO, quando os animais selvagens ou deficientes para 5-LO tem o *background* da linhagem SV129. O motivo para essa diferença é devido à disponibilidade dos animais para os experimentos realizados e também por outros estudos que estão sendo conduzidos no laboratório. Como a padronização do modelo envolveu um número muito grande de animais, não havia a possibilidade de obter um número tão grande de animais SV129, os quais são criados em baixa quantidade pelo laboratório de Imunofarmacologia. Animais C57/B16 são mais facilmente obtidos, provenientes do Centro de Bioterismo da

UFMG (CEBIO). Neste estudo, pode ser observado que animais da linhagem SV129 são mais susceptíveis à infecção em relação aos animais C57/B16, através da análise macroscópica da lesão e também pelo maior recrutamento celular para a articulação. Experimentos posteriores, principalmente utilizando fármacos que inibem a ativação da 5-LO, serão conduzidos em animais C57/B16, quando então poderemos comparar os resultados feitos entre as duas linhagens de camundongos.

Vários tipos celulares participam da resposta imunológica ao *S. aureus* na articulação, porém os neutrófilos desempenham importante função no controle da infecção devido ao seu arsenal de combate a este patógeno (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004). Nossos resultados vão de acordo com essa frente, pois há um aumento de neutrófilos juntamente com maior presença de *S. aureus* na cavidade, principalmente nos primeiros dias após a infecção e que é reduzido nos tempos posteriores. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo utilizando modelo experimental com injeção intravenosa da bactéria (VERDRENGH; TARKOWSKI, 1997). Neste estudo ao depletar neutrófilos de camundongos foi observado que os mesmos desenvolveram a doença de forma mais grave, a mortalidade foi maior além de aumentar a quantidade de bactérias presentes nos rins, sangue e articulação nos primeiros dias após a inoculação.

Citocinas e quimiocinas têm sido descritas por seus papéis em doenças inflamatórias e infecciosas (GOUWY et al., 2005). Neste estudo, foi avaliada a produção da citocina IL-1 β , pois essa foi demonstrada ser importante na patogênese da artrite séptica em modelo experimental de injeção intravenosa (HULTGREN; SVENSSON; TARKOWSKI, 2002). As quimiocinas CXCL-1 e CCL-2 foram avaliadas por seu conhecido papel no recrutamento de neutrófilos (RAVINDRAN et al., 2013; REICHEL et al., 2009). Os resultados apresentados neste trabalho mostram um aumento de citocinas e quimiocinas no primeiro dia após a injeção de *S. aureus*. Resultados similares foram descritos (KIELIAN; HICKEY, 2000) na formação

de abscessos cerebrais por *S. aureus* em modelo animal, onde a bactéria é capaz de induzir a secreção de várias citocinas e quimiocinas em 24 horas. Ainda ao injetar oligonucleotídeos não metilados de DNA bacteriano na articulação de camundongos (DENG; TARKOWSKI, 2001) também foi observada uma rápida secreção de várias citocinas na sinóvia.

Duas das principais características clínicas da artrite séptica são dor intensa e destruição parcial ou perda total da articulação (KRIEG, 1999). A dor é geralmente definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial (RIEDEL, 2001). Como a sensação e a percepção da dor envolve aspectos cognitivos e emocionais, além dos aspectos estruturais (neurônios, nociceptores), é correto utilizar o termo nocicepção ou hipernocicepção para descrever uma resposta comportamental característica de um animal ao receber um estímulo sabidamente doloroso ou alogênico (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Ao avaliar a medida da hipernocicepção em nosso modelo é possível observar que os camundongos infectados com *S. aureus* apresentam um menor limiar de retirada da pata após o estímulo mecânico (von Frey eletrônico) caracterizando assim, uma maior hipernocicepção em comparação aos animais não infectados. Vários mediadores inflamatórios avaliados (IL-1 β , CXCL1 e produtos da via da enzima 5-lipoxigenase) neste estudo são capazes de causar hipernocicepção, os quais foram demonstrados em diferentes modelos de artrites (AMARAL et al., 2012; COELHO et al., 2008; CUNHA et al., 2008b; SACHS et al., 2011). Ainda, foi demonstrado que o próprio infiltrado de neutrófilos é responsável pela hipernocicepção, como demonstrado em estudo com carragenina em ratos (CUNHA et al., 2008a). Neste caso, essas células secretam variados mediadores hipernociceptivos, incluindo prostaglandinas. Assim, todos estes mediadores podem de alguma forma, contribuir para que os animais infectados com *S. aureus* tenham um importante aumento na resposta hipernociceptiva.

Os neutrófilos são capazes de combater bactérias através dos mediadores secretados como enzimas proteolíticas, proteínas antimicrobianas e espécies reativas de oxigênio (DELEO; DIEP; OTTO, 2009). Por outro lado, estes mediadores secretados pelos neutrófilos também causam dano ao tecido do hospedeiro (GABELLONI et al., 2013). Em estudo in vivo com infecção pulmonar por *Streptococcus pyogenes* (SOEHNLEIN et al., 2008) foi demonstrado que a desgranulação dos neutrófilos é responsável pelo dano pulmonar. Nossos resultados demonstram que o dano articular ocorre em 7 dias com aumento do escore histopatológico e perda de proteoglicano articular. Resultado semelhante foi encontrado em dois estudos com modelo de injeção intravenosa (BREMELL; ABDELNOUR; TARKOWSKI, 1992; TARKOWSKI; WAGNER, 1998) onde foi observado destruição da cartilagem e do osso uma semana após a inoculação de *S. aureus*. O proteoglicano é um importante componente da matriz extracelular, é responsável pelas características estruturais e funcionais na cartilagem. Em processos patológicos que levam a sua perda, ocorre diminuição da rigidez da cartilagem, com consequente danos ao colágeno e destruição irreversível da cartilagem (TCHETINA, 2011).

LTB₄ é um potente quimioatraente, resultante da metabolização do ácido araquidônico pela enzima 5-lipoxigenase o qual estimula a quimiotaxia e adesão de neutrófilos a células endoteliais além de ativá-los levando a liberação de enzimas, grânulos e mediadores (SHARMA; MOHAMMED, 2006). Em nosso modelo, ao utilizarmos animais 5-LO^{-/-}, observou-se uma significativa diminuição no número de neutrófilos na cavidade articular e também na redução de algumas quimiocinas pró-inflamatórias. É importante ressaltar que a citocina IL-1β não foi avaliada nestes animais em função de dificuldades técnicas na dosagem da mesma. Em estudo recente utilizando um modelo de lesão de pele estéril (LÄMMERMANN et al., 2013) foi demonstrado que LTB₄ é essencial para o recrutamento de

neutrófilos para o tecido no início e tardiamente num processo denominado “swarming” de neutrófilos.

Leucotrienos tem importante papel no processo de hipernocicepção. Animais 5-LO^{-/-} em nosso modelo apresentam menor hipernocicepção em relação aos selvagens após a infecção com *S. aureus*. Resultados semelhantes foram encontrados em vários modelos de doenças articulares. Em modelo de artrite induzida por zimosan (GUERRERO et al., 2008) foi demonstrado que animais 5-LO^{-/-} ou tratados com inibidor para FLAP (MK 886) apresentaram menor hipernocicepção e este processo foi dependente de neutrófilo. De maneira semelhante, foi demonstrada a participação do LTB₄ na inflamação e hipernocicepção em outros modelos de artrite: em modelo de artrite induzida por antígeno (CUNHA et al., 2003) utilizando mesmo inibidor de FLAP citado anteriormente ou através do bloqueio do receptor BLT1 (através do composto CP 105696), principal receptor de LTB₄ e em um modelo de gota (AMARAL et al., 2012) com utilização do inibidor de FLAP e animais 5-LO^{-/-}. De acordo com os resultados apresentados neste trabalho bem como pelos exemplos de outros modelos, nós iremos utilizar outras ferramentas complementares para avaliá-la com mais precisão os mecanismos pelos quais os metabólitos da via da 5-lipoxigenase modulam a resposta inflamatória no modelo experimental de artrite séptica.

Em nosso estudo, os animais 5-LO^{-/-} apresentaram menor escore histopatológico e menor perda de proteoglicano em relação aos animais selvagens após infecção por *S. aureus*. Resultado semelhante foi encontrado em modelo de artrite por transferência de soro de animais K/BxN (CHOU et al., 2010) onde animais *Ltb4r1*^{-/-} apresentaram baixo escore histopatológico quando comparados aos animais WT. Também, em modelo de artrite induzido por colágeno, animais deficientes para FLAP apresentaram gravidade da doença significativamente menor em relação aos animais WT (GRIFFITHS et al., 1997). No mesmo modelo ao usar antagonista para o receptor de LTB₄, (BLT1 - CP-105696) os animais

apresentaram menor destruição da cartilagem e do osso (GRIFFITHS et al., 1995). Em modelo de artrite por adjuvante ao utilizar fármaco inibidor de 5-LO e ciclooxigenases 1 e 2 (ML3000) os animais apresentaram menor escore histopatológico juntamente com menor destruição da cartilagem e do osso (GAY et al., 2001). Estes resultados sugerem que o recrutamento de neutrófilos para cavidade articular dependente de LTB₄ e sua consequente ativação, pode ser responsável pelo dano articular causado em nosso modelo de artrite séptica.

De acordo com os resultados e pelo exposto acima, produtos da via da enzima 5-lipoxigenase, especialmente o LTB₄, tem uma importante participação na ativação e recrutamento de neutrófilos (AFONSO et al., 2012). Além disso, é evidente a importância dessas células no controle de processos infecciosos (NAUSEEF, 2007). Neste contexto, surpreendentemente os animais 5-LO^{-/-} em nosso estudo apresentaram menor carga bacteriana no tecido articular quando comparado aos animais selvagens. Duas hipóteses podem ser usadas para explicar tal resultado: a participação de lipoxinas e de macrófagos. Lipoxinas são derivadas do metabolismo do ácido araquidônico pela enzima 15-lipoxigenase e tem atividade anti-inflamatória e pró-resolutiva. Podem ser produzidas por macrófagos e neutrófilos. Lipoxina A₄ (LXA₄) reduz a migração de neutrófilos e aumenta a ativação e fagocitose de macrófagos (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Em modelo de perfuração e ligação cecal (CLP) de sepse em ratos (WALKER et al., 2011) animais tratados com LXA₄ 5 horas antes da indução do estímulo apresentaram menor carga bacteriana no sangue comparado aos animais não tratados. Em modelo de infecção pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis*, ao utilizar animais 5-LO^{-/-} foi observado o oposto, nestes animais a ausência de lipoxina leva a menor carga bacteriana no pulmão e no baço, além de diminuição da mortalidade (BAFICA et al., 2005).

Uma vez que se inicia o processo de resolução, macrófagos polarizam para um perfil M2 (alternativamente ativado). Os macrófagos M2 possuem funções anti-inflamatórias e de

reparo tecidual, além de eficiente atividade fagocítica com expressão de receptores scavenger, de manose e galactose (LICHTNEKERT et al., 2013).

Para a resolução da resposta inflamatória articular desencadeada pela injeção de *S. aureus*, é necessária a eliminação do agente patogênico e, concomitantemente, da redução ou remoção de leucócitos e debris celulares dos sítios inflamados a fim de retornar a homeostase com reparo e retorno da função tecidual. Polimorfonucleares apoptóticos são removidos através da fagocitose por macrófagos (KENNEDY; DELEO, 2009; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). O menor número de células inflamatórias presentes na cavidade articular em nosso modelo no tempo de 28 dias indica que a resposta inflamatória desencadeada por *S. aureus* na articulação está em processo de resolução. Apesar de que nós acompanhamos a inflamação apenas até 28 dias após a infecção, análises em tempos mais tardios da infecção serão realizadas para determinar os mecanismos associados com o processo de resolução da resposta inflamatória.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi padronizado um interessante modelo de artrite séptica induzida por *S. aureus*. Ainda, foi demonstrado que a ausência da enzima 5-lipoxigenase não só foi importante para reduzir a resposta inflamatória e lesão articular, mas também contribuiu para um melhor controle do crescimento da bactéria na articulação. Como não há tratamento terapêutico disponível atualmente capaz de diminuir os danos articulares em pacientes com artrite séptica e baseado nos achados até agora neste estudo, a inibição da atividade de 5-LO torna-se uma interessante estratégia terapêutica a fim de minimizar os danos articulares nestes pacientes. Novos estudos serão realizados para elucidar os mecanismos pelos quais a ausência de 5-LO melhora, em termos gerais, o controle da inflamação articular no contexto da artrite séptica.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, P. V et al. LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. **Developmental cell**, v. 22, n. 5, p. 1079–91, 15 maio 2012.
- AGARWAL, V.; AGGARWAL, A. Acute and chronic bacterial infections in rheumatology practice. **Indian Journal of Rheumatology**, v. 6, n. 1, p. 69–74, mar. 2011.
- AMARAL, F. A et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. **Arthritis and rheumatism**, v. 64, n. 2, p. 474–84, fev. 2012.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 459–89, jan. 2012.
- ATESCHRANG, A. et al. Current concepts review: septic arthritis of the knee pathophysiology, diagnostics, and therapy. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 123, n. 7-8, p. 191–7, abr. 2011.
- AXFORD, J. S. Joint and bone infections. **Medicine**, v. 38, n. 4, p. 194–201, abr. 2010.
- BAFICA, A. et al. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase – dependent lipoxin production. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, 2005.
- BEYRAU, M.; BODKIN, J. V. Neutrophil heterogeneity in health and disease : a revitalized avenue in inflammation and immunity. **Open Biology**, v. 2, p. 1–10, 2012.
- BHOSALE, A. M.; RICHARDSON, J. B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. **British medical bulletin**, v. 87, p. 77–95, jan. 2008.
- BONILLA, H. et al. Rapid diagnosis of septic arthritis using 16S rDNA PCR : a comparison of 3 methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, n. 4, p. 390–395, 2011.
- BORREGAARD, N. Review Neutrophils , from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.
- BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Micro-organisms responsible for osteo-articular infections. **Baillière's best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 13, n. 1, p. 21–35, mar. 1999.
- BRANSBY-ZACHARY, M. **The Assessment and Management of Septic Arthritis**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2012. p. 735–744
- BREMELL, T.; ABDELNOUR, A; TARKOWSKI, A. Histopathological and serological progression of experimental Staphylococcus aureus arthritis. **Infection and immunity**, v. 60, n. 7, p. 2976–85, jul. 1992.

BRENNAN, M. B.; HSU, J. L. Septic Arthritis in the Native Joint. **Current infectious disease reports**, v. 14, p. 558–565, 2012.

BRINK, C.; DAHLE, S. International Union of Pharmacology XXXVII . Nomenclature for Leukotriene and Lipoxin Receptors. v. 55, n. 1, p. 195–227, 2003.

BROOKS, GEO; BUTEL, JANET; MORSE, S. **Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology**. [s.l: s.n.].

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315–27, 20 mar. 2014.

BUSSE, W. W. Leukotrienes and inflammation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 157, n. 6 Pt 2, p. S210–3; discussion S247–8, jun. 1998.

CHANDER, S.; COAKLEY, G. What's New in the Management of Bacterial Septic Arthritis? **Current infectious disease reports**, v. 13, n. 5, p. 478–84, out. 2011.

CHOU, R. C. et al. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. **Immunity**, v. 33, n. 2, p. 266–78, 27 ago. 2010.

COELHO, F. M. et al. The Chemokine Receptors CXCR1 / CXCR2 Modulate Antigen-Induced Arthritis by Regulating Adhesion of Neutrophils to the Synovial Microvasculature. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 8, p. 2329–2337, 2008.

CROOKS, S. W.; STOCKLEY, R. A. Leukotriene B4. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 30, n. 2, p. 173–8, fev. 1998.

CUNHA, J. M. et al. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **British journal of pharmacology**, v. 139, n. 6, p. 1135–45, jul. 2003.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 4, p. 824–32, abr. 2008a.

CUNHA, T. M. et al. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. **European journal of pain (London, England)**, v. 12, n. 8, p. 1059–68, nov. 2008b.

DELEO, F. R.; DIEP, B. A.; OTTO, M. Host defense and pathogenesis in Staphylococcus aureus infections. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 17–34, mar. 2009.

DENG, G. M.; TARKOWSKI, A. Synovial cytokine mRNA expression during arthritis triggered by CpG motifs of bacterial DNA. **Arthritis research**, v. 3, n. 1, p. 48–53, jan. 2001.

- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 16–34, 2000.
- DONATTO, K. C. Orthopedic management of septic arthritis. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 275–86, maio 1998.
- DUARTE, H. E. **Anatomia Humana**. [s.l: s.n.]. p. 174
- FAVERO, M. et al. Rheumatoid arthritis is the major risk factor for septic arthritis in rheumatological settings. **Autoimmunity reviews**, v. 8, n. 1, p. 59–61, out. 2008.
- FLAMAND, L.; TREMBLAY, M. J.; BERGEAT, P. Leukotriene B4 Triggers the In Vitro and In Vivo Release of Potent Antimicrobial Agents. **The Journal of Immunology**, v. 4, n. 29, 2007.
- FOURNIER, B.; PHILPOTT, D. J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. **clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 3, 2005.
- FOX, S. et al. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **Journal of innate immunity**, v. 2, n. 3, p. 216–27, jan. 2010.
- GABELLONI, M. L. et al. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. **Seminars in immunopathology**, v. 35, n. 4, p. 423–37, jul. 2013.
- GARC, I. Gonococcal and Nongonococcal Arthritis. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 35, p. 63–73, 2009.
- GARCÍA-ARIAS, M.; BALSÀ, A.; MOLA, E. M. Best Practice & Research Clinical Rheumatology Septic arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 3, p. 407–421, 2011.
- GAVET, F. et al. Septic Arthritis in Patients Aged 80 and Older : A Comparison with Younger Adults. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 53, p. 1210–1213, 2005.
- GAY, R. E. et al. Dual inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenases 1 and 2 by ML3000 reduces joint destruction in adjuvant arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 28, n. 9, p. 2060–5, set. 2001.
- GOLDENBERG, D. L. Septic arthritis. **The Lancet**, v. 351, p. 197–202, 1998.
- GOLDMAN, E. **Practical Handbook of Microbiology**. [s.l: s.n.]. p. 853
- GOUWY, M. et al. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 16, n. 6, p. 561–80, dez. 2005.
- GRESHAM, H. D. et al. Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3713–3722, 2000.

- GRIFFITHS, B. R. J. et al. Collagen-induced Arthritis Is Reduced in 5-Lipoxygenase-activating Protein-deficient Mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 6, 1997.
- GRIFFITHS, R. J. et al. Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 2, p. 517–21, 17 jan. 1995.
- GUERRERO, A. T. G. et al. Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 1, p. 122–30, jan. 2008.
- HARDINGHAM, T.; BAYLISS, M. Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 20, n. 3 Suppl 1, p. 12–33, dez. 1990.
- HARVATH, L. Neutrophil chemotactic factors. **Cell Motility Factors**, v. 59, p. 35–52, jan. 1991.
- HUDSON, M. C.; RAMP, W. K.; FRANKENBURG, K. P. Staphylococcus aureus adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. **FEMS microbiology letters**, v. 173, n. 2, p. 279–84, 15 abr. 1999.
- HULTGREN, O. H.; SVENSSON, L.; TARKOWSKI, A. Critical role of signaling through IL-1 receptor for development of arthritis and sepsis during Staphylococcus aureus infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 10, p. 5207–12, 15 maio 2002.
- KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic research**, v. 43, n. 1-3, p. 25–61, jan. 2009.
- KHERANI, R. B.; SHOJANIA, K. Septic arthritis in patients with pre-existing inflammatory arthritis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 176, n. 11, p. 1605–1608, 2007.
- KIANI, C. et al. Structure and function of aggrecan. **Cell research**, v. 12, n. 1, p. 19–32, mar. 2002.
- KIELIAN, T.; HICKEY, W. F. Proinflammatory cytokine, chemokine, and cellular adhesion molecule expression during the acute phase of experimental brain abscess development. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 2, p. 647–58, ago. 2000.
- KNUDSON, C. B.; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 12, n. 2, p. 69–78, abr. 2001.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, mar. 2013.
- KRIEG, A. M. A possible cause of joint destruction in septic arthritis. **Arthritis Research**, v. 1, n. 1, p. 3–4, 1999.
- LÄMMERMANN, T. et al. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. **Nature**, v. 498, 26 maio 2013.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, dez. 2001.

LICHTNEKERT, J. et al. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. **Current opinion in pharmacology**, p. 1–10, 6 jun. 2013.

MANCUSO, P.; NANA-SINKAM, P.; PETERS-GOLDEN, M. Leukotriene B₄ Augments Neutrophil Phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 69, n. 4, p. 2011–2016, 2001.

MATHEWS, C. J. et al. Management of septic arthritis : a systematic review. **Annals of the Rheumatic Diseases**, p. 440–445, 2007.

MATHEWS, C. J. et al. Bacterial septic arthritis in adults. **The Lancet**, v. 375, n. 9717, p. 846–855, 2010.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 1, p. 62–6, fev. 2004.

MÖLLER, K. A; JOHANSSON, B.; BERGE, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of neuroscience methods**, v. 84, n. 1-2, p. 41–7, 1 out. 1998.

NADE, S. Septic arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 17, n. 2, p. 183 –200, 2003.

NAIR, S. P.; WILLIAMS, R. J.; HENDERSON, B. Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* infection. **Rheumatology**, v. 39, p. 821–834, 2000.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological reviews**, v. 219, p. 88–102, out. 2007.

NAVARRE, W. W.; SCHNEEWIND, O. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 63, n. 1, p. 174–229, 1999.

PERERA, J; GIL, H; SANTANA, A. Cefalosporinas. **Revista cubana de farmacia**, v. 35, n. 3, p. 219–224, 2001.

PÉREZ, L. C. Septic arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 13, n. 1, p. 37–58, 1999.

PERGOLA, C.; WERZ, O. 5-Lipoxygenase inhibitors: a review of recent developments and patents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20, n. 3, p. 355–375, 2010.

PETERS-GOLDEN, M. et al. Leukotrienes: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 589–594, 2005.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W. R. Leukotrienes. **The new england journal of medicine**, v. 357, p. 1841–1854, 2007.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 7, p. 541–50, jul. 2006.

PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597–612, jan. 2009.

POLLARD, H. BACTERIAL ARTHRITIS. **Journal of the Academy of Chiropractic Orthopedists**, v. 8, n. 2, p. 45–53, 1999.

RASHEED, B. Y. Isolation and identification of bacteria causing arthritis in chickens. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 25, n. 2, p. 2009–2011, 2011.

RAVINDRAN, A. et al. Chemokine CXCL1 dimer is a potent agonist for the CXCR2 receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 17, p. 12244–52, 26 abr. 2013.

REICHEL, C. A. et al. Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 11, p. 1787–93, nov. 2009.

RIEDEL, W. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 415, p. 404–415, 2001.

RIGBY, K. M.; DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 237–259, 2012.

RIOS-SANTOS; F. A CRITICAL ROLE OF LEUKOTRIENE B 4 IN NEUTROPHIL MIGRATION TO INFECTIOUS FOCUS IN CECAL LIGATION AND PUNCTURE SEPSIS. **Shock**, v. 19, n. 1, p. 61–65, 2003.

ROSS, J. J. Septic Arthritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, p. 799–817, 2005.

SACHS, D. et al. Cooperative role of tumour necrosis factor- α , neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. **British journal of pharmacology**, v. 162, p. 72–83, 2011.

SARAUX, A et al. HIV infection as a risk factor for septic arthritis. **British journal of rheumatology**, v. 36, n. 3, p. 333–7, mar. 1997.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, and its relevance to atopic dermatitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 1, p. 39–49, jan. 2010.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349–61, maio 2008.

SHARFF, K. A; RICHARDS, E. P.; TOWNES, J. M. Clinical management of septic arthritis. **Current rheumatology reports**, v. 15, n. 6, p. 332, jun. 2013.

- SHARMA, J. N.; MOHAMMED, L. A. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? **Inflammopharmacology**, v. 14, n. 1-2, p. 10–6, mar. 2006.
- SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T. Acute Septic Arthritis. **clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 4, p. 527–544, 2002.
- SMITH, J. W.; PIERCY, E. A. Infectious Arthritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 225–230, 1995.
- SMITH, M. D. The normal synovium. **The open rheumatology journal**, v. 5, p. 100–6, jan. 2011.
- SOEHNLEIN, O. et al. Neutrophil degranulation mediates severe lung damage triggered by streptococcal M1 protein. **The European respiratory journal**, v. 32, n. 2, p. 405–12, ago. 2008.
- STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in lipid research**, v. 50, n. 1, p. 35–51, jan. 2011.
- TALEBI-TAHER, M. et al. Septic versus inflammatory arthritis: discriminating the ability of serum inflammatory markers. **Rheumatology international**, v. 33, n. 2, p. 319–24, fev. 2013.
- TARKOWSKI, A. et al. Current status of pathogenetic mechanisms in staphylococcal arthritis. **FEMS microbiology letters**, v. 217, n. 2, p. 125–32, 17 dez. 2002.
- TARKOWSKI, A. Infectious arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 1029–1044, 2006.
- TARKOWSKI, A.; WAGNER, H. Arthritis and sepsis caused by *Staphylococcus aureus* : can the tissue injury be reduced by modulating the host ' s immune system ? **MOLECULAR MEDICINE TODAY**, v. 4310, n. January, p. 15–18, 1998.
- TCHETINA, E. V. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. **Arthritis**, v. 2011, p. 683970, jan. 2011.
- TOSI, M. F. Innate immune responses to infection. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 116, n. 2, p. 241–9; quiz 250, ago. 2005.
- VERDRENGH, M.; ERLANDSSON-HARRIS, H.; TARKOWSKI, A. Role of selectins in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. **European journal of immunology**, v. 30, p. 1606–1613, 2000.
- VERDRENGH, M.; TARKOWSKI, A. Role of Neutrophils in Experimental Septicemia and Septic Arthritis Induced by *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2517–2521, 1997.
- WALKER, J. et al. Lipoxin a4 increases survival by decreasing systemic inflammation and bacterial load in sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 36, n. 4, p. 410–6, out. 2011.

WANG, C.-L. et al. Septic arthritis in children: relationship of causative pathogens, complications, and outcome. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 36, n. 1, p. 41–6, mar. 2003.

WERZ, O. 5-Lipoxygenase: Cellular Biology and Molecular Pharmacology. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 1, n. 1, p. 23–44, mar. 2002.

WESTON, V. C. et al. Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982 – 1991. **Annals of the Rheumatic Diseases**, p. 214–219, 1999.

WIDMER, A F. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S94–106, 1 set. 2001.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 236 / 2012, relativo ao projeto intitulado “ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS COM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ARTICULAR EM UM MODELO DE ARTRITE SÉPTICA”, que tem como responsável Flávio Almeida Amaral, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 30/08/2012. Este certificado espira-se em 30/08/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 236 / 2012, related to the Project entitled “STUDY OF THE MECHANISMS ASSOCIATED WITH THE INFLAMMATORY RESPONSE IN A MODEL OF SEPTIC ARTHRITIS”, under the supervision of Flávio Almeida Amaral, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 30/08/2012. This certificates expires in 30/08/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 30/08/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br