

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NATALY PESGINALLI STEGMILLER

**COMPARAÇÃO ENTRE AS VIAS INTRANASAL E
INTRAMUSCULAR PARA A IMUNIZAÇÃO COM UMA
VACINA DE ANTÍGENO BRUTO DE *Staphylococcus
aureus***

Vitória
2014

NATALY PESGINALLI STEGMILLER

**COMPARAÇÃO ENTRE AS VIAS INTRANASAL E
INTRAMUSCULAR PARA A IMUNIZAÇÃO COM UMA
VACINA DE ANTÍGENO BRUTO DE *Staphylococcus
aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.

Coorientador: Prof. Dr. Marco Cunegundes.

Vitória
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S799c Stegmiller, Nataly Pescinalli, 1984-
Comparação entre as Vias Intranasal e Intramuscular para a
Imunização com uma Vacina de Antígeno Bruto de
Staphylococcus aureus / Nataly Pescinalli Stegmiller. –
2014.
60 f. : il.

Orientador: Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.
Coorientador: Marco César Cunegundes Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Staphylococcus aureus. 2. Vacina. 3. Mastite. 4. Resposta
imune. I. Gomes, Daniel Cláudio de Oliveira. II. Marco
César Cunegundes Guimarães III. Uiversidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Comparação entre as Vias Intranasal e Intramuscular para a Imunização com Uma Vacina de Antígeno Bruto de *Staphylococcus aureus*”

Nataly Pescinalli Stegmiller

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes (UFES)

Orientador

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães (UFES)

Coorientador

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira (UFES)

Membro Interno

Prof.ª Dr.ª Bartira Rossi-Bergmann (UFRJ)

Membro Externo

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira (UVM)

Membro Externo

Vitória-ES, 30 de Abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por DEUS, pois Ele me deu força, fé e colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta.

Aos meus pais, Maria da Penha e Leonídio, meu infinito agradecimento por sempre acreditarem em minha capacidade e me fortalecerem nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu marido, Chay, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me incentivando e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Obrigada pelo seu companheirismo, amizade, compreensão, apoio, amor e muita paciência.

A minha irmã Thalita, meu cunhado Kassiano e meu primo Roberto que acompanham desde o início essa minha jornada.

Aos meus tios, tias, primos, primas e avós que vibraram comigo desde a aprovação na prova, e sempre fizeram “propaganda” positiva a meu respeito. Obrigada pela força!

À minha cunhada Jully e minha sogra Josélia, pelo apoio, carinho e torcida pela minha conquista.

Às minhas amigas de sempre, Livia, Viviane e Daniela, por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa. Obrigada pela amizade!

À Marcela, que além de me ajudar como amiga e confidente, me auxiliou no manejo dos camundongos e me doou muitos de seus animais para que a minha pesquisa fosse concluída. Valeu demais!

Ao meu orientador Daniel, por me propor esse grande desafio e me fazer enxergar que daria certo. Agradeço por cada oportunidade e experiência vivida. Obrigada pelos ensinamentos e pelo amadurecimento que tive ao longo desses dois anos.

À Luciana, que sempre esteve disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver o máximo de conhecimento. Você não foi somente uma grande contribuinte em meu trabalho, mas em muitos momentos, conselheira e amiga.

Aos meus amigos e colaboradores do laboratório de patologia: Janine, Kaymerê, Lorenzo, Marcelle e Priscila. Sem eles, essa pesquisa não teria sido cumprida. Pessoal, não tenho palavras pra agradecer cada momento que eu passei com vocês, agradecer tudo que me ensinaram e por terem tornado meus dias tão felizes no laboratório. Obrigada de coração!

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial à Glênia, que além de dividirmos conteúdos científicos, nos tornamos grandes amigas. Obrigada por tudo!

Aos professores e amigos do laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, prof. Breno, prof. Marco, Jairo, Vinícius e Christine, que apesar de ter sido transferida, continua me acompanhando nessa caminhada. Me sinto honrada por conhecer pessoas tão maravilhosas que sempre estão na torcida e dispostas a me ajudar quando mais preciso.

Agradeço ao meu co-orientador Marco, pelo apoio e correção do trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do NDI, em especial a Rose, Ariany e Lau pelo carinho.

Não poderia deixar de agradecer aos comundongos, instrumento maior em meus estudos. A partir do momento que decidi abraçar essa pesquisa, assumi o risco de parecer cruel aos olhos daqueles que estão de fora, mas dediquei-me ao máximo para que tudo fosse realizado com muito respeito.

Agradeço as agências de apoio e financiamento: Capes, Fapes e CNPq.

RESUMO

A mastite é uma enfermidade da glândula mamária que se caracteriza por um processo inflamatório, quase sempre decorrente da presença de microrganismos infecciosos. É considerada a principal causa de perdas econômicas relacionadas à prática leiteira, já que interfere diretamente na função do órgão, diminuindo de 15-20% a produção láctea/animal. Dentre os microrganismos identificados como causadores da mastite, bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* são as mais comumente relacionadas, sendo responsáveis por mais de 91% dos casos. O surgimento de cepas droga-resistentes associado a grande toxicidade do tratamento, imprime a necessidade do desenvolvimento de uma vacina efetiva, segura e barata, que possa ser utilizada como medida preventiva contra a mastite. Por esse motivo, objetivamos o desenvolvimento de uma vacina composta por antígenos totais de *S. aureus* (SaAg), administrada por via intranasal ou intramuscular, contra a mastite experimental. O preparo da vacina foi realizado a partir da cultura de uma cepa de *S. aureus* isolada de glândula mamária bovina, caracterizada molecularmente e submetida a 15 ciclos de congelamento e descongelamento lento. Camundongos BALB/c, foram vacinados pelas vias intranasal ou intramuscular com SaAg (50 µg/mL) em 2 doses intervaladas por 15 dias, para avaliação da biocompatibilidade e imunogenicidade. Os sinais clínicos foram monitorados por 72 horas após cada dose, onde se observou alterações comportamentais e físicas, com intensa resposta inflamatória nos animais vacinados por via intramuscular. Não foram observadas diferenças nos níveis de transaminases e creatinina entre os grupos vacinados por via nasal ou intramuscular em comparação com o controle. Além disso, foi verificado um aumento significativo das respostas linfoproliferativas dos animais vacinados em relação aos controles. Animais vacinados por via intranasal apresentaram maiores porcentagens de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN-γ quando comparados aos demais grupos, o que não foi verificado na avaliação da produção de citocinas utilizando o sobrenadante das culturas estimuladas com SaAg *in vitro*. De forma diferente, animais vacinados por via intramuscular apresentaram maiores porcentagens de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IL-10, quando comparados aos demais grupos, bem como produziram maiores níveis de IFN-γ nos sobrenadantes de cultura reestimulados, quando comparados aos grupos controle ou vacinados por via intranasal. Na avaliação da resposta imune humoral, significativos níveis de IgG2a foram relacionados à vacinação intranasal, quando comparados aos demais grupos. Além disso, animais vacinados por via intranasal ou intramuscular apresentaram semelhantes níveis de IgG1, porém, significativamente maiores que os animais controle. Dessa forma, nossos resultados demonstram a viabilidade do uso da vacina SaAg, administrada pelas vias intramuscular e intranasal, como um potencial agente profilático contra a mastite causada por *S. aureus*.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, vacina, mastite, resposta imune.

ABSTRACT

Mastitis is a disease of the mammary gland characterized by an inflammatory process, often due to the infectious microorganisms presence. It is considered the main cause of economic losses related to dairy practice, as it can act directly in the organ function, decreasing to 15-20% milk/animal production. Among the microorganisms identified as causing the mastitis, *Staphylococcus aureus* bacteria species are the most common, accounting for over 91% of mastitis cases. The emergence of drug-resistant strains associated with high toxicity of the treatment, prints the need to develop an effective, inexpensive and safe vaccine that could be used as a preventive measure against mastitis. In this work, we aimed to develop a vaccine produced with total antigen of *S. aureus* (SaAg) and intranasally or intramuscularly given against experimental mastitis. The vaccine preparation was done using a *S. aureus* strain isolated from bovine mammary gland, followed of 15 slow freezing /thawing cycles.

BALB/c mice were vaccinated by intranasal or intramuscular route with 2 doses of SaAg (50µg/animal) followed of biocompatibility and immunogenicity evaluation 72 hours after each dose. Intramuscular vaccinated mice showed behavioral and physical changes. No differences of transaminases and creatinine levels were observed in the vaccinated groups as compared to unvaccinated animals, different from observed in the lymphoproliferative responses. Intranasal vaccinated mice presented significant percentage increase of CD4⁺ and CD8⁺ IFN-γ producer's when compared to intramuscular or unvaccinated groups. By the other hand, mice vaccinated by intramuscular route showed a increase of CD4⁺ and CD8⁺ T cells producers percentage also supernatant cytokine production (IL-10 and IFN- γ) after SaAg *in vitro* recall, when compared to intramuscular vaccinated animals or unvaccinated. The Intranasal vaccination induced a significant increase of IgG2a levels and decreased IgG1 production when compared to control or intramuscular vaccinated groups. Thus, our results demonstrate the feasibility of SaAg vaccine, given by intramuscular and intranasal routes, as a potential prophylactic agent against mastitis caused by *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, vaccine, mastitis, immune response.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema utilizado para a realização da diluição seriada.....33**
- Figura 2: Avaliação do crescimento de *S. aureus* após o processo de neutralização.** Semeadura da bactéria em Agar sangue após diferentes tratamentos neutralizantes. Dez ciclos de sonicação/resfriamento em nitrogênio líquido (A); Banho-maria a 60°C/75min (B); Banho-maria a 80°C/30min (C); Sequências de 15 ciclos entre congelamento a -70°C e descongelamento em banho-maria 37°C (D).....35
- Figura 3: Avaliação da biocompatibilidade da vacina SaAg.** Dosagem de transaminases (TGO e TGP) e creatinina do soro dos animais eutanasiados 72 horas após a primeira ou segunda dose da vacina SaAg, administrada pelas vias intramuscular ou intranasal. Controles positivos receberam tetracloreto de carbono (CCl₄) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. * p<0,05 em relação aos grupos vacinado e controle negativo.....37
- Figura 4: Padronização da proliferação celular.** Esplenócitos de animais vacinados com SaAg por via intranasal foram marcados com CFSE (Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester) e estimulados *in vitro* com SaAg por 24, 48 e 72 horas. As células foram coletadas e submetidas a citometria de fluxo, onde se determinou o índice de proliferação celular (IP).....38
- Figura 5: Avaliação das respostas linfoproliferativas após a vacinação com SaAg.** Resposta linfoproliferativa de esplenócitos em cultura marcados com CFSE e reestimulados com 50µg de SaAg *in vitro* de camundongos eutanasiados um dia após a segunda dose da vacinação por via intranasal ou intramuscular. Um grupo não vacinado foi utilizado como controle. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressa como índice de proliferação celular (IP). * p<0,05 em relação ao grupo controle.....38

- Figura 6: Dosagem das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ por ELISA.** Animais vacinados com SaAg por via intranasal ou intramuscular e eutanasiados após 15 dias da primeira ou segunda dose. Os esplenocitos obtidos foram cultivados por 96 horas na presença de SaAg (50ug/mL) e a produção de citocinas determinada no sobrenadante da cultura, por ELISA. *p<0,05 em relação ao grupo controle.....39
- Figura 7: Análise da população de linfócitos TCD4⁺ e TD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-10.** Avaliação da porcentagem das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo em linfonodos de animais eutanasiados 1 dia após o booster e reestimulados *in vitro* com 50 μ g de SaAg por 96 horas. Os dados são representativos de um experimento utilizando pool de células de 5 animais por grupo: Controle e vacinados pela via intramuscular ou intranasal.....40
- Figura 8: Avaliação da resposta humoral.** Dosagem de IgG1 e IgG2a por Elisa no soro dos animais do grupo controle e vacinados com uma ou com duas doses da vacina SaAg pela via intramuscular e intranasal, duas semanas após a vacinação. *p<0,05 em relação ao grupo controle e (+) em relação ao grupo intramuscular.....41
- Figura 9: Contagem de UFC após 24horas da semeadura.** Figura representativa das UFC obtidas após co-cultura de esplenócitos infectados *in vitro* com *S. aureus* pelo período de duas horas. A foto representa UFC dos: grupo controle (A), grupo vacinado por via intramuscular (B) grupo vacinado por via intranasal (C).....42
- Figura 10: Contagem de unidades formadoras de colônias após desafio *in vitro* com *S. aureus*.** UFC/mL das culturas de esplenócitos de animais controles ou vacinados, infectados *in vitro* com *S. aureus* por 2, 4 e 6h. *p<0,05 em relação ao grupo controle.....43

Figura 11: Dosagem de citocinas após desafio *in vitro* com *S. aureus*.

Produção de IL-4, IL-10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas de de
esplenócitos de animais controles ou vacinados, infectados *in vitro* com *S.*
aureus por 2, 4 e 6h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo
controle.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sinais clínicos após a vacinação. Monitoramento dos sinais clínicos dos camundongos 72 horas após a primeira e a segunda administração de SaAg pela via intramuscular e intranasal.....	36
--	----

LISTA DE SIGLAS

ABTS`	–	(2,2'-Azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt
BSA	–	Albumina sérica bovina
CCl ₄	–	Tetracloroeto de carbono
CCR9	–	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 9</i>
CCS	–	Contagem de Células Somáticas
CD	–	<i>Cluster of differentiation</i>
CEUA	–	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEM	–	Células Epiteliais Mamárias
CFSE	–	<i>Carboxy Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester</i>
CHIPS	–	<i>Chemotaxis inhibitory protein</i>
ClfA/B	–	<i>Clumping factor A and B</i>
CMT	–	<i>Califórnia Mastitis Test</i>
Cna	–	<i>S. aureus collagen adhesin</i>
CO ₂	–	Dióxido de Carbono
DMEM	–	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DO	–	Densidade óptica
Eap	–	Proteína de aderência extracelular
Efb	–	<i>Extracellular fibrinogen-binding protein</i>
ELISA	–	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC	–	Isotiocianato de fluoresceína
H ₂ O ₂	–	Peróxido de hidrogênio
HIV	–	<i>Human immunodeficiency virus</i>
ICAM	–	Moléculas de Adesão Intercelular

Ig	–	Imunoglobulina
IL	–	Interleucinas
IFN	–	<i>Interferon</i>
IP	–	Índice de proliferação celular
IsdA	–	<i>Iron-regulated surface determinant A</i>
IsdB	–	<i>Iron-regulated surface determinant B</i>
MHC	–	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOI	–	<i>Multiplicity of infection</i>
MRSA	–	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
NK	–	Células <i>Natural Killers</i>
PBS	–	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	–	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	–	<i>Phycoerythrin</i>
PE-Cy5	–	<i>Phycoerythrin and a cyanine dye</i>
PPRs	–	Receptores de Reconhecimento de Padrões
ROS	–	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SAAC	–	<i>Slime associated antigenic complex</i>
SaAg	–	Vacina composta por antígeno bruto inativado de <i>Staphylococcus aureus</i>
SpA	–	<i>Staphylococcal protein A</i>
SSL5	–	<i>Staphylococcal superantigen-like 5</i>
TGF	–	<i>Transforming growth factor</i>
TGO	–	<i>Transaminase glutâmico oxalacética</i>
TGP	–	Transaminase glutâmico pirúvica
Th	–	Célula T <i>helper</i>
TLR	–	<i>Toll-like receptor</i>

- Treg – Células T reguladoras
- TRIS – tris(hidroximetil)aminometano
- TSB – *Trypticase Soy Broth*
- TSST – Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
- UFC- – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 ASPECTOS GERAIS DA MASTITE	16
1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS	17
1.3 IMUNOPATOGÊNESE	18
1.4 VACINAS NA MASTITE.....	22
1.5 VACINA PELA VIA MUCOSA X INTRAMUSCULAR.....	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 ANIMAIS.....	28
3.2 BACTÉRIA	28
3.3 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS.....	28
3.4 VACINAÇÃO.....	29
3.5 DOSAGEM DE TRANSAMINASES (AST E ALT) E CREATININA	29
3.6 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS DE BAÇO E LINFONODOS.....	30
3.7 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO	30
3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS	31
3.9 IMUNOFENOTIPAGEM E PRUDAÇÃO DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	31
3.10 DOSAGEM DE CLASSES E SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS.....	32
3.11 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MICROBICIDA IN VITRO.....	32
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS	34
4.1 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO	34
4.2 VACINAÇÃO.....	35
4.3 TOXICIDADE DA VACINA SaAg <i>in vivo</i>	36
4.4 IMUNOGENICIDADE DA VACINA SaAg <i>in vivo</i>	37
4.5 DESAFIO <i>in vitro</i> COM <i>S. aureus</i> (CEPA ATCC 25923) APÓS A VACINAÇÃO COM SaAg PELA VIA INTRANASAL E INTRAMUSCULAR.....	41
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA MASTITE

A mastite é uma doença caracterizada pela inflamação da glândula mamária, com sintomas locais ou generalizados, que pode gerar ocasionalmente uma infecção sistêmica (MARECHAL *et al.*, 2011). É uma das mais importantes doenças de vacas leiteiras em todo o mundo, pois leva a perdas econômicas na indústria de laticínios, baixa qualidade do leite e queda da produção (FETROW, 2000; KOSKINEN, 2009) que pode chegar até 50% (LADEIRA, 2007). Além das perdas relacionadas à produção, podem-se listar também os gastos com medicamentos e serviços veterinários, o prejuízo com o leite descartado e com o abate prematuro dos animais além da diminuição do seu valor comercial (REIS *et al.*, 2005). Nos EUA essas perdas ultrapassam 1,8 bilhões de dólares anualmente (SCHROEDER, 2010) e no Brasil contabilizam-se prejuízos anuais na ordem de 1,5 bilhões de dólares para a agropecuária (Faostat/FAO 2010).

O prejuízo econômico causado pela mastite bovina não é o único problema existente, mas também a transmissão de zoonoses aos seres humanos, o desencadeamento de reações alérgicas e os efeitos tóxicos oriundos das alterações no leite causadas pela infecção (CASSOL *et al.*, 2010). Existe também a presença de resíduos de antibióticos no leite que é uma importante preocupação na segurança alimentar devido à possibilidade do aparecimento de bactérias resistentes aos medicamentos, seja exercendo pressão seletiva sobre a flora intestinal, favorecendo o crescimento de microrganismos com resistência natural ou adquirida, ou dando lugar para o aparecimento de resistência nas bactérias enteropatogênicas. (TALBOT E LACASSE, 2005; HU *et al.*, 2010). Mesmo que o leite passe pelo processo da pasteurização, a transmissão de patógenos representa um risco durante as falhas neste processo (BRADLEY, 2002), agravado ainda pela estimativa de que 44% do leite consumido no Brasil é proveniente do mercado informal, sendo comercializados sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial (FAGUNDES E OLIVEIRA, 2004).

A mastite pode ser manifestada tanto na forma subclínica como na forma clínica. Na subclínica não ocorrem mudanças visíveis na aparência do leite ou do úbere, ao contrário da forma clínica, marcada por respostas inflamatórias mais severas que resultam em mudanças no aspecto da secreção láctea, mudanças visíveis no tecido mamário e, em alguns casos, efeitos sistêmicos como hipertermia, prostração e tremores musculares (PRESTES *et al.*, 2003; BENEDETTE *et al.*, 2008). Ambas levam a alterações na composição química do leite (BRAMLEY *et al.*, 1996), porém, a mastite subclínica produz maior impacto na economia do que clínica por apresentar maior prevalência (ZAFALON *et al.*, 2008) devido ao alastramento da doença de forma silenciosa pelo rebanho sem que sejam percebidas presença de secreções e alterações macroscópicas à inspeção do úbere (BARBALHO E MOTA, 2001). Por isso a importância do diagnóstico precoce dessa doença que pode ser realizado pela contagem indireta ou direta de células somáticas (CCS) no leite, compostas basicamente por dois tipos: as de descamação do epitélio secretor e de leucócitos de origem sanguínea (MACHADO *et al.*, 2000).

Um indicador indireto das CCS no leite é o *California Mastitis Test* (CMT), um dos testes mais usuais para o diagnóstico da mastite subclínica. Ele consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada, adicionando-se um detergente aniônico neutro, que atua rompendo a membrana das células e liberando o material nucléico (DNA), que apresenta alta viscosidade. De acordo com a intensidade da reação e grau de viscosidade classifica-se em: negativa (0), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++) (FONSECA E SANTOS, 2000). Para identificar de forma direta os agentes etiológicos da mastite bovina são realizadas as culturas de amostras de leite obtidas de tetos individuais ou amostras compostas de todos os quartos de cada vaca, o que possibilitará introduzir métodos de controle e prevenção específicos para cada caso, além do monitoramento dos animais (EMBRAPA, 2005).

1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS

Os microrganismos que comumente causam mastite bovina podem ser divididos em dois grupos, baseando-se na sua origem: patógenos contagiosos e patógenos

ambientais. Os patógenos contagiosos são aqueles adaptados à sobrevivência no interior da glândula mamária (WATTS, 1988), como exemplo pode-se citar os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* (MENDONÇA *et al.*, 1999). Em contraste, os patógenos ambientais são melhores descritos como invasores oportunistas do úbere (WATTS, 1988), como exemplo se destaca a *Escherichia coli* e o *Streptococcus uberis* (MENDONÇA *et al.*, 1999).

Além desses, a mastite pode ser causada por mais 132 tipos de microrganismos diferentes, sendo o *Staphylococcus aureus* o mais comumente encontrado na maioria dos países (CARTER E KERR, 2003 E SCHROEDER, 2010) e responsável pelos maiores índices de incidência e prevalência da doença, alcançando 91% de todos os casos (MIDDLETON *et al.*, 2008). Considerado um importante agente causador de mastite bovina, essa bactéria gram-positiva oportunista destaca-se pela sua patogenicidade na infecção, além de ser altamente contagiosa, o que acarreta o isolamento do animal afetado (SÁ *et al.*, 2004; BENEDETTE *et al.*, 2008).

1.3 IMUNOPATOGÊNESE

O *S. aureus* é uma bactéria comumente encontrada nas mucosas nasais e na pele de animais sadios. No entanto, caso estas barreiras naturais estejam comprometidas, essa bactéria pode se alojar nos tecidos e provocar uma lesão local (ROBERT E CHAMBERS, 2005). No gado leiteiro, lesões na mucosa mamária podem ser causadas durante a ordenha, tanto de forma manual quanto pelas ordenhadeiras mecânicas (ZECCONI *et al.*, 2000; PYORALA 2002), iniciando assim o processo de fixação e infecção pela bactéria. E mesmo que ocorra a higienização, o *S. aureus* é capaz de resistir ao processo, acessando a glândula mamária através do canal do teto (LAMMERS *et al.*, 1999; KERRO, VAN DIJK E NEDERBRAGT, 2002), seguido de adesão à mucosa e quebra das barreiras do epitélio, comprometendo as estruturas de ligações intercelulares, como desmossomos e junções de aderência tipo gap (DEGO, DIJK E NEDERBRAGT, 2002).

Após a invasão no tecido, o *S. aureus* utiliza mecanismos distintos adaptados para a sobrevivência e proliferação em diferentes microambientes encontrados durante a

colonização do hospedeiro. Esses mecanismos estão diretamente ligados aos diversos fatores de virulência como enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares, proteínas tóxicas α , β , δ , e γ – hemolisinas (CHENG *et al.*, 2011), dentre outros fatores responsáveis pela inibição da opsonização do complemento, neutralização da fagocitose e inibição das respostas imunes humorais e celulares (RIGBY E DELEO, 2012; KIM *et al.*, 2012).

Mas apesar desses artifícios utilizados pela bactéria para driblar a resposta imune no organismo infectado, as células epiteliais mamárias (CEM) estão presentes em grande número e representam a interface entre o corpo e o meio ambiente sendo capazes de atuarem como sentinelas, de forma a sinalizar a invasão de patógenos causadores de mastite (RAINARD E RIOLLET, 2006). Possuem grande capacidade de proliferação e expressão de citocinas pró-inflamatórias após a estimulação de bactérias patogênicas (YANG *et al.*, 2008), o que contribui para a atração de células efectoras do sistema imunológico, como os neutrófilos, importantes na eliminação de bactérias invasoras (WELLNITZ E KERR, 2004).

Os neutrófilos representam as primeiras células fagocíticas que são recrutadas a partir da circulação para o local de infecção ou inflamação (SEGAL, 2005). Uma vez recrutados, eles são capazes de reconhecer o *S. aureus* através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), em especial os receptores do tipo toll (TLR) (FOURNIER E PHILPOTT, 2005), e intensificar a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6, que induzem e estabelecem as fases iniciais do processo inflamatório. De forma adicional, os TLR são considerados moléculas cruciais na detecção de patógenos invasores e na indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro na glândula mamária bovina (WERLING *et al.*, 2006), fato comprovado pelo aumento da expressão de TLR do tipo 2 e 4 durante a mastite bovina (GOLDAMMER *et al.*, 2004).

Este reconhecimento via PRR também induz a regulação positiva de moléculas de adesão, tais como a P-selectina, E-selectina e L-selectina, que permitem a aderência e a diapedese dos neutrófilos através da matriz epitelial e subepitelial, de modo a alcançar o local da infecção e até mesmo o leite (ZHANG, 2002;

STRINDHALL *et al.*, 2005). A partir do momento que os neutrófilos encontram os *S. aureus*, utilizam vários mecanismos para facilitar a morte bacteriana, (SEGAL, 2005) como a produção de superóxidos e outros derivados de espécies reativas ao oxigênio (ROS) através de um processo conhecido por explosão oxidativa ou respiratória, dependente da enzima NADPH-oxidase. Esta enzima transfere elétrons do NADPH citosólico para a molécula de oxigênio, produzindo superóxido, utilizado para gerar derivados de ROS, tais como ácido hipocloroso, cloraminas, radical hidroxilo, entre outros produtos microbicidas (DELEO *et al.*, 2009; RIGBY E DELEO, 2012).

Concomitante com a produção de ROS ocorre a fusão de grânulos antimicrobianos citoplasmáticos a fagossomas contendo o microrganismo. Esses grânulos são compostos por vários tipos diferentes de peptídeos antimicrobianos, tais como catelicidina (LL-37), lisozima, azurocidina e α -defensinas, que têm atividade bacteriostática ou bactericida contra *S. aureus* (SEGAL, 2005).

Em contraste com a atividade microbicida neutrofílica, diversas proteínas produzidas pelo *S. aureus* podem interferir e limitar a eliminação bacteriana. Pode-se destacar como exemplo a proteína *Staphylococcus* 5 (SSL5), que prevenine o rolamento dos neutrófilos nas células endoteliais, e por consequente saída do vaso. Destacam-se também a proteína estafilocócica inibidora de quimiotaxia (CHIPS), que bloqueia o reconhecimento da bactéria e a captação mediada pelo complemento e a proteína de aderência extracelular (Eap) de *S. aureus*, responsável pela inibição da quimiotaxia leucocitária por se ligar às moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) na superfície das células endoteliais (FOSTER, 2005; CORRIGAN, *et al.*, 2009).

A resposta imune adaptativa possui um papel mais complexo na eliminação ou mesmo, na resposta imune contra *S. aureus*. A participação de células B envolvem a produção de anticorpos dirigidos contra antígenos específicos de componentes do patógeno. Estes anticorpos desempenham um papel importante na opsonização bacteriana e facilita a ingestão da mesma pelos fagócitos (HOLTFRETER, KOLATA E BROKER, 2010). São exemplos de anticorpos gerados os que se ligam às toxinas α , β e γ hemolisinas, enterotoxinas e fatores de virulência como, por exemplo, aureolysin, IsdA e superantígenos. São gerados também anticorpos contra proteínas da parede celular como fatores de aglomeração (ClfA/B) e contra

proteínas de ligação de fibronectina e antígenos não-protéicos como por exemplo, polissacarídeos capsulares, ácido lipoteicóico e peptidoglicano (HOLTFRETER, KOLATA E BROKER, 2010). Além disso, linfócitos B se destacam nos processos de apresentação antigênica, bem como na produção de citocinas pro-inflamatórias, que podem participar diretamente na diferenciação de repostas do tipo Th1/Th2, determinando a resposta celular anti *S. aureus*. De modo não relacionado a proteção, a importância das células B e dos anticorpos produzidos pelo hospedeiro contra infecções por *S. aureus* torna-se questionável quando se ilustra a presença da proteína A (SpA), expressa pela bactéria, uma vez que essa proteína fornece um poderoso mecanismo de evasão pelo disfarce imunológico e inibição da capacidade fagocitária (KOBAYASHI E DELEO, 2013).

Os linfócitos TCD8⁺ (citotóxicos) e TCD4⁺ (auxiliares) tipo Th1 ou Th2 possuem papéis importantes na resolução do processo infeccioso da mastite. Na glândula mamária de um animal sadio, os linfócitos TCD8⁺ são predominantes, enquanto que, no quadro de mastite aguda ou crônica, os linfócitos TCD4⁺ é que se tornam predominantemente presentes (OHTSUKA, 2004; PARK *et al.*, 2006). Mas é importante ressaltar que durante a infecção da glândula mamária, tanto o TCD4⁺ quanto o TCD8⁺ encontram-se em níveis mais elevados (GRONLUND, JOHANNISSON E WALLER, 2006).

Embora o *S. aureus* seja classicamente considerado um patógeno extracelular, já é claro que ele pode invadir e sobreviver no citoplasma de muitos tipos diferentes de células (ELINAV *et al.*, 2011). Por esse motivo é importante ressaltar a importância e atuação dos linfócitos TCD8⁺ (BURCHILL *et al.*, 2003) que reconhecem os antígenos intra citoplasmáticos através da apresentação deles pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, expressas em células epiteliais ou residentes da glândula mamária. Dessa forma, ocorre a ativação e a proliferação de LTCD8⁺, levando a eliminação da bactéria pela ação citotóxica e aumento da atividade inflamatória durante a mastite aguda (BRADLEY, 2003).

Células TCD4⁺ do subtipo Th1 têm sido correlacionadas a grandes produções de IL-2, que induz a ativação de LTCD8⁺, bem como participa do processo de diferenciação linfocitária sobre linfócitos T indiferenciados (LTh0), conduzindo sua polarização para a via Th1 e inibindo uma resposta Th2 (ANDERSEN, 2006). Além

disso, junto aos macrófagos, essas células também são responsáveis pelo aumento significativo na produção de IL-12 durante o quadro de mastite causada por *S. aureus*. Essa citocina estimula a secreção de IFN- γ pelas células natural killers (NK) e pelos linfócitos, o que induz a ativação microbicida de macrófagos e neutrófilos infectados pelo *S. aureus* (BANNERMAN *et al.*, 2004). Importante ressaltar que existe um ciclo de retroalimentação positiva na ação do IFN- γ sobre outros LTh0, induzindo sua polarização para a via de diferenciação Th1 e inibindo a resposta Th2 (MILLS E MCGUIRK, 2004).

Células Th2 têm sido associadas a grande produção de IL-4, IL5, IL6 e IL-10, responsáveis por promoverem respostas imunitárias mediadas por anticorpos (O'SHEA E PAUL, 2010), que desempenham papéis benéficos na resistência do hospedeiro à infecção por *S. aureus*. No entanto, ações celulares do subtipo Th2 têm sido correlacionado a susceptibilidade a infecção, com a produção de citocinas anti-inflamatórias capazes de neutralizar a ação mediada pela imunidade inata (SAAKI, 2000). De forma análoga ao IFN- γ , a IL-4 produzida por células Th2 também promove uma retroalimentação positiva de uma resposta Th2 (O'SHEA E PAUL, 2010), o que tem sido correlacionado ao aumento da produção de IL-10 e TGF- β na glândula mamária infectada, tornando-a ainda mais suscetível durante o processo infeccioso (ROARK *et al.*, 2008)

1.4 VACINAS NA MASTITE

Programas de prevenção e controle da mastite são estabelecidos com o objetivo de limitar a prevalência das infecções e, assim, diminuir os impactos econômicos na atividade leiteira. Entre as principais medidas estão o monitoramento dos índices de mastite, pré e pós-imersão dos tetos em solução antisséptica, conforto ambiental, tratamento das vacas com a secagem adequada dos tetos, tratamento dos casos clínicos, descarte de vacas com infecções crônicas, higiene, manejo e manutenção dos equipamentos de ordenha (FONSECA E SANTOS, 2000).

Porém, nem sempre essas medidas são eficazes, o que torna o tratamento com antibióticos ainda o método mais frequentemente utilizado para combater essa

doença, baseado nas séries de injeções intramusculares com antibióticos de largo espectro, muitas vezes escolhidos de forma aleatória. Longe de ser satisfatória, esta prática quimioterápica tem se mostrado muito cara, ineficaz, indutora da seleção de cepas multidroga-resistentes, além de tóxica para o animal, recolhido durante o tratamento e impedido de fornecer seus produtos a cadeia de alimentação humana (BARBERIO *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2010). Por esse motivo a incidência da mastite não foi controlada em muitos rebanhos e o surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes a beta-lactâmicos como a meticilina (MRSA) e cepas resistentes à vancomicina isoladas de bovinos alertou a indústria de laticínios sobre a importância do desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas contra novas infecções por *S. aureus* (HOEDEMAKER *et al.*, 2001).

Dessa forma, estratégias profiláticas, como o desenvolvimento de vacinas, têm sido pesquisadas com o objetivo de aumentar a resistência do rebanho ao *S. aureus* e reduzir as consequências clínicas e econômicas da mastite (MIDDLETON, 2008; MIDDLETON, LUBY E ADAMS, 2009). Assim, o aumento da capacidade de resposta imune frente aos agentes patogênicos poderia atuar conjuntamente com os outros mecanismos de controle, tornando a prevenção contra novas infecções mais eficiente. Até o presente momento, muitas formulações envolvendo vacinas de primeira, segunda ou terceira geração têm sido avaliadas, porém, poucas demonstraram eficácia no impedimento de novas infecções (LEE *et al.*, 2005; MIDDLETON, 2008).

Dentre elas destacam-se vacinas que utilizam na sua composição o agente patogênico na sua constituição completa (DINIZ E FERREIRA, 2010), obtidas a partir de preparações antigênicas de *S. aureus* inativadas por calor ou fixadas em formalina e avaliados em testes clínicos de fase III, sem benefícios convincentes do ponto de vista imunogênico (MICHIE, 2002). Alternativas a falta de imunogenicidade dessas vacinas inativadas tem sido tentadas com o emprego de adjuvantes. Desta forma, promissoras formulações contendo agonistas de TLR (SCHRÖDER *et al.*, 2003; DUTHIE *et al.*, 2011), Saponina (LIU *et al.*, 2012) ou mesmo emulsões lipídicas (HASHIMOTO *et al.*, 2006; WARDENBURG *et al.*, 2006) tem sido empregadas experimentalmente, com bons resultados em relação à imunogenicidade ou mesmo proteção.

Composições vacinais de segunda geração, que utilizam antígenos purificados ou recombinantes vem sendo empregadas experimentalmente, no controle da infecção contra *S. aureus*. Dentre as formulações, destacam-se vacinas compostas pelas enterotoxinas C (HU, 2006), α e β (NORDHAUG,1994), capazes de promover intensa resposta imune humoral, com formação de anticorpos neutralizantes capazes de controlar e promover opsonização bacteriana. Formulações que utilizam a proteína B regulada pelo ferro (IsdB) (JOSHI *et al.*, 2012), fatores de aglutinação A (TUCHSCHERR *et al.*, 2008) ou proteínas de superfície/adesão (MAMO *et al.*, 1994; IWATSUKI *et al.*, 2006), foram testadas experimentalmente, sem êxito na indução de respostas imunes protetoras contra *S. aureus* (SCHAFFER E LEE, 2008).

Além das formulações experimentais para a prevenção da mastite estafilocócica, é possível encontrar no mercado vacinas de segunda geração comerciais como a MASTIVAC[®]. Essa vacina é composta por exotoxinas e fragmentos bacterianos de três estirpes de campo de *S. aureus* (ZO3983, ZO3984 e BS449), que exibe um largo espectro de propriedades imunogênicas, com pouca, ou em alguns casos, nenhuma proteção de campo (LEITNER, LUBACHEVSKY E TRAININ, 2003). Outra vacina recentemente desenvolvida contra a mastite causada pela *Escherichia coli* e pelo *S. aureus* é a TOPVAC[®]. Composta pela toxina inativada J5 de *E. coli* e pelo complexo antigênico associado Slime (SAAC), da cepa CP8 de *S. aureus*, que demonstrou importante papel na indução de anticorpos específicos protetores (PRENAFETA *et al.*, 2010).

Vacinas de terceira geração, também chamadas de vacina de DNA, empregam informações genéticas do patógeno através da codificação de proteínas/antígenos imunogênicos relevantes para a proteção também tem sido alvo de estudos experimentais contra a infecção por *S. aureus* (WEINER E KENNEDY, 1999). Dentre as formulações, destacam-se estudos com o gene codificante da proteína de ligação ao fibrinogênio (Efb), fatores de aglutinação A (ClfA), adesina colágeno (Cna) e proteína de ligação a fibronectina A (CASTAGLILOUO *et al.*, 2006); bem como a formulação híbrida que emprega os genes codificantes das proteínas A₂/B de *S. aureus* associado ao gene codificante da toxina Isd-A de *Vibrio Colerae* (ARLIAN E TINKER, 2011). Apesar de um grande número de estudos pré-clínicos terem demonstrado que a imunização genética é capaz de gerar respostas imunes humoral e celular em modelos murinos, ainda são necessários muitos estudos para

que esse tipo de vacina se torne uma estratégia promissora contra uma ampla gama de doenças (LIU *et al.*, 2004; ARLIAN E TINKER, 2011).

1.5 VACINA PELA VIA MUCOSA X INTRAMUSCULAR

Devido aos avanços no desenvolvimento de vacinas e a introdução de novas vias de administração, como alternativa ao fracasso das vacinas convencionais (ILLUM *et al.*, 2001), as mucosas tem emergido como importante ferramenta para a promoção de respostas imunes sistêmicas em diversos modelos de infecções bacterianas e virais (*Salmonella thypi*, *Vibrio colerae* e HIV) (HOLMGREEN E CZERKINSKY, 2005).

Além disso, vacinas mucosas vêm sendo desenvolvidas para atender a necessidade não somente de uma melhor proteção contra patógenos que ganham acesso ao organismo através das membranas mucosas, o que não é facilmente conseguido com vacinas parenterais. Essa via de administração pode desencadear também a proteção imunitária humoral e celular de forma sistêmica (BRANDTZAEG, 2010), o que fornece uma melhor ferramenta quando comparada as vacinas parenterais convencionais. As imunizações mucosas estimulam fortemente células B e células T, (SHERIDAN E LEFRANCOIS, 2011), sendo a proteção contra os patógenos efetivamente alcançada quando essas células são dirigidas às membranas mucosas através de receptores de moléculas de localização tecido-específicas, principalmente pela expressão de $\alpha 4\beta 7$ e CCR9 (KUNKEL *et al.*, 2003).

Enquanto a vacinação através das vias intramuscular ou subcutânea mal promovem a proteção imunitária em membranas mucosas e glândulas mamárias (onde a expressão das moléculas de localização são necessárias a entrada), a imunização da mucosa é capaz de estimular e ativar a produção de células B e T, que deixam os linfonodos drenantes, entram na circulação sanguínea e, em seguida, depositam-se nos tecidos mucosos de forma eficaz (BRANDTZAEG, 2010).

Além dos benefícios imunológicos, a imunização das mucosas tem outras vantagens importantes sobre imunizações parenterais, como impedimento do risco potencial com agulhas contaminadas e a diminuição de tempo e custos envolvidos na administração da vacina parenteral por profissionais de saúde (AMORIJ, 2010). Outra vantagem adicional, é que as vacinas preparadas para a administração mucosa não necessitam de purificação extensiva de subprodutos bacterianos, o que se observa nas vacinas parenterais (YUKI E KIYONO, 2009).

Dessa forma, torna-se necessária a pesquisa no desenvolvimento de vacinas de forma a alcançar uma formulação ideal que dispense o uso de seringas, atue em dose única, gere proteção duradoura contra diversos patógenos, tenha baixo custo de produção, estabilidade térmica e principalmente, que seja segura (YUKI E KIYONO, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos imunogênicos e protetores da vacinação com SaAg, comparando as vias de administração intranasal e intramuscular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a imunogenicidade da vacina SaAg comparando as duas vias de administração através de:
 - a) Sinais de irritação, temperatura corporal e peso durante e após as imunizações.
 - b) Toxicidade da vacina durante as imunizações pela dosagem de transaminases (TGO e TGP) e creatinina.
 - c) Respostas linfoproliferativas em cultura de esplenócitos por citometria de fluxo.
 - d) Produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 do sobrenadante das culturas de esplenócitos estimulados pelo SaAg por Elisa.
 - e) Imunofenotipagem e produção de citocinas do sobrenadante das culturas de linfonodos estimuladas com SaAg por citometria de fluxo.
 - f) Dosagem de IgG1 e IgG2a por Elisa.
 - g) Avaliação da carga bacteriana após a infecção da cultura de esplenócitos com *S. aureus* de animais vacinados com SaAg.
 - h) Produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 do sobrenadante das culturas infectadas pelo *S. aureus* por Elisa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos do sexo feminino da linhagem BALB/c com 6-8 semanas de idade, adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal Fluminense. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Imunologia, em gabinetes controlados, recebendo água filtrada, ração comercial (Purina®) *ad libitum* e maravalha autoclavada. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal CEUA-UFES número 051/2012.

3.2 BACTÉRIA

Foi utilizada uma cepa de bactéria da espécie *Staphylococcus aureus* isolada a partir da glândula mamária de vacas diagnosticadas com mastite e caracterizadas por PCR (ATCC 25923). A cepa foi gentilmente doada pelo Prof. Dirlei Molinari Donatele, da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre.

3.3 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS

O antígeno do *Staphylococcus* (SaAg) foi preparado a partir da cultura dessas bactérias em meio *Trypticase Soy Broth* (TSB) incubada em estufa a 37°C durante 18 horas, para que se encontrassem na fase logarítmica de crescimento. Após a multiplicação bacteriana, essa cultura foi centrifugada a 1.500rpm/4°C/10min e lavada três vezes com Salina Tamponada com Fosfato (PBS) estéril. Depois desse procedimento, o sobrenadante foi descartado utilizando uma pipeta Pasteur e o precipitado obtido foi submetido a diversos tratamentos para avaliar a efetividade da morte/neutralização bacteriana para obtenção do antígeno:

- 1- Dez ciclos de sonicação/resfriamento em nitrogênio líquido.
- 2- Tratamento com aquecimento em banho-maria a 60°C/75min.
- 3- Aquecimento a 80°C/30min em banho-maria.

- 4- Tratamento consistido em 15 ciclos entre as etapas de congelamento lento (Freezer -70°C) e descongelamento em banho-maria a 37°C.

Depois de passarem por estes processos, as amostras foram semeadas no meio de cultura Ágar sangue e incubadas em estufa a 37°C durante tempo de 48 horas. O método de escolha foi aquele onde não se observou crescimento bacteriano. Depois disso, foi realizada a cultura em meio líquido TSB e a dosagem de proteínas pelo método de Bradford, sendo feito posteriormente o armazenamento em alíquotas a -80°C para futura utilização.

3.4 VACINAÇÃO

Os animais foram vacinados com SaAg (50µg em 20µl de PBS) pelas vias intranasal com o auxílio de uma pipeta e intramuscular, utilizando agulhas de insulina no quadríceps. Foram feitas uma ou duas doses intervaladas por 15 dias. O grupo controle não recebeu qualquer tipo de tratamento. Todos os animais foram monitorados por um período de 72 horas após o processo vacinal, através da observação dos sinais clínicos (presença de pelos eriçados, claudicação, sinais de eritema, edema e presença de prurido).

3.5 DOSAGEM DE TRANSAMINASES (AST E ALT) E CREATININA

A dosagem de transaminases (AST e ALT) e creatinina foi determinada por ensaio colorimétrico com o kit comercial Doles[®], utilizando soro de animais vacinados, 72 horas após a administração da primeira ou segunda dose de SaAg. De forma resumida, foi preparado uma curva de calibração contendo diluições seriadas das substâncias padrão, iniciando nas concentrações de 1000µ/mL para TGO e TGP e 0,05 µg/mL par a Creatinina. Em seguida, foi acrescentado 1mL do reagente de cor em cada tubo (Amostras e curva padrão) e feita a homogeneização, deixando-os em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Acrescentou-se a cada tubo 10mL de Hidróxido de Sódio 0,4M e homogeneizou-se novamente, permanecendo em repouso por dois minutos até a realização da leitura em espectrofotômetro a 505nm (Varioskan Flash – Thermo[®]).

3.6 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS DE BAÇO E LINFONODOS

Os camundongos foram eutanasiados um dia após a primeira e a segunda dose da vacinação com SaAg e 15 dias após a segunda dose dessa mesma vacina. Depois disso, tiveram o baço e os linfonodos cervicais e poplíteos removidos. Os órgãos foram macerados para obtenção de células seguido da adição de DMEM (Gibco®) pH 7,2, suplementado com bicarbonato de sódio 3,7mg/mL, HEPES 4,7mg/mL (Sigma®) e Soro Fetal Bovino 10%. O macerado foi transferido para um tubo cônico de 15mL com o auxílio de uma pipeta Pasteur para posterior centrifugação a 1500 rpm/4°C/10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células dos linfonodos foram ressuspensas em 5 mL de DMEM suplementado e as células do baço passaram por uma etapa a mais onde receberam 3mL de solução de lise de hemácias (TRIS Base 2,06 mg/mL mais cloreto de amônio 7,7mg/mL em água deionizada) pH 7,2 por 3 min. No final deste tempo foi acrescentado ao tubo 10mL de PBS e a suspensão centrifugada a 1500 rpm/4°C/10 min para descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 5mL de DMEM suplementado. O precipitado foi corado com a solução de azul de tripan e foi realizada a contagem nas câmaras de Neubauer das células refringentes em microscópio. Após os cálculos, as células tiveram sua concentração ajustada para 5×10^6 /mL e foram plaqueadas no volume de 1 mL em placas de 24 poços contendo ou não SaAg (50mg/ml). Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C/5% de CO₂ e os sobrenadantes e as células foram utilizados para a realização de nossos estudos.

3.7 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

Para avaliar a proliferação de leucócitos totais dos animais vacinados e controle, parte dos esplenócitos foi marcada com *CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE) - (Invitrogen®) antes de serem distribuídos nas placas de cultura estimuladas ou não com SaAg. Após 48 horas, essas culturas foram centrifugadas a 1500 rpm/4°C/10 min e as células fixadas com solução contendo PBS/BSA 0,2% e Formaldeído 1% durante 10 minutos para então serem adquiridas no citômetro de fluxo (BD®). Os resultados foram analisados pelo software FlowJo (versão 7.6.5,

Tree Star, Inc.). Foram consideradas as porcentagens de células da amostra original que se dividiram, assumindo que nenhuma célula morreu durante a cultura.

3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

As dosagens de IFN- γ , IL-4, IL-10 foram realizadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinizados da eBioscience[®], seguindo a recomendação do fabricante. Em síntese, placas de alta absorção (Costar[®]) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (18 horas/25°C). Posteriormente as placas foram lavadas e as amostras foram adicionadas. Foram incubadas por 2 horas/25°C e passado esse tempo, lavadas com PBS/Tween 20 (0,05%) e incubadas com o anticorpo biotinizado por 1 hora/25°C. As placas foram lavadas, seguido de adição e incubação com estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience[®]) por 20 min/25°C. As amostras foram reveladas com adição de solução tampão citrato fosfato com 5% de ABTS e 0.05% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 vol. e a reação foi interrompida com glicerina decorrido 5 minutos. A absorbância foi determinada sob comprimento de onda de 405nm (Varioskan Flash – Thermo).

3.9 IMUNOFENOTIPAGEM E PRUDAÇÃO DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise das células produtoras de citocinas, 200 μ L de cultura de linfonodos de cada animal foram transferidos para um tubo de citometria, centrifugadas a 1440 rpm/7min e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas e incubadas em 50 μ L de uma solução de DMEM com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 (eBioscience[®]) acoplados a diferentes fluorocromos (FITC e PeCy-5), na proporção de 1:200 e mantidas a 4°C por 30min. Após a marcação extracelular, as células foram centrifugadas a 1440rpm/7min, lavadas com solução salina tampão e ressuspendidas em 100 μ L de solução de fixação por 15 minutos.

Passado o tempo, foi acrescentados 500µL de solução de permeabilização, seguido da centrifugação a 1440rpm/7min. As células foram ressuspensas em 50µL de DMEM com anticorpos monoclonais anti-IL10 e anti-IFN-γ (eBioscience®) acoplados a fluorocromos (APC e PE) na proporção de 1:200 por 30 minutos a 4°C. Depois disso, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 200µL de solução de PBS/BSA 0,2%/Formaldeído 1% para a leitura no citômetro.

3.10 DOSAGEM DE CLASSES E SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS

As dosagens de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2a) do soro dos animais foram realizadas pela técnica de ELISA após a sensibilização de placas de 96 poços com extrato total de *S. aureus* (50 µg/mL) por 18 h/25°C. Posteriormente, os soros testes foram incubados na diluição de 1:100, seguido de tratamento com anticorpos secundários, conjugados com a Proteína A/peroxidase (KPL-USA), na diluição de 1:16000. Para a revelação foi utilizado o tampão OPD (Na₂HPO₄ 0,83M, Ácido Cítrico 0,33M, O-fenil-diamina 0,05M) e H₂O₂ a 7,5%, seguido de leitura a 492nm.

3.11 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MICROBICIDA IN VITRO

As cepas de *S. aureus* armazenadas no freezer a -80°C foram descongeladas em banho Maria 37°C e semeadas em placas de Petri contendo o meio Agar Mueller Hinton, seguido de crescimento por 18 horas a 37°C. Após esse período, colônias isoladas foram inoculadas em um tubo estéril contendo PBS de forma que a concentração da solução alcançasse 10⁸ bactérias/mL, de acordo com a escala de McFarland. Ajustada a concentração, 100µL dessa solução foram inoculados em 1mL de cultura de esplenócitos de animais vacinados ou controle, previamente estimulados por 48 horas com SaAg (50µg/ml). Dessa forma, utilizava-se a diluição da bactéria para o MOI (*multiplicity of infection*) de 10:1 (dez bactérias para 1 célula), respeitando-se o valor de 1 x 10⁶ células/mL na cultura. Após os tempos de 2, 4 e 6h, foram retirados 100µl dessa cultura e semeados em placas tripartidas de Agar

Mueller Hinton nas diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , seguido de incubação a 37°C durante 24 horas para que ocorresse o crescimento das colônias. Posteriormente foi feita a contagem das colônias nas placas para avaliação da capacidade microbicida *in vitro*, como ilustra a Figura 1.

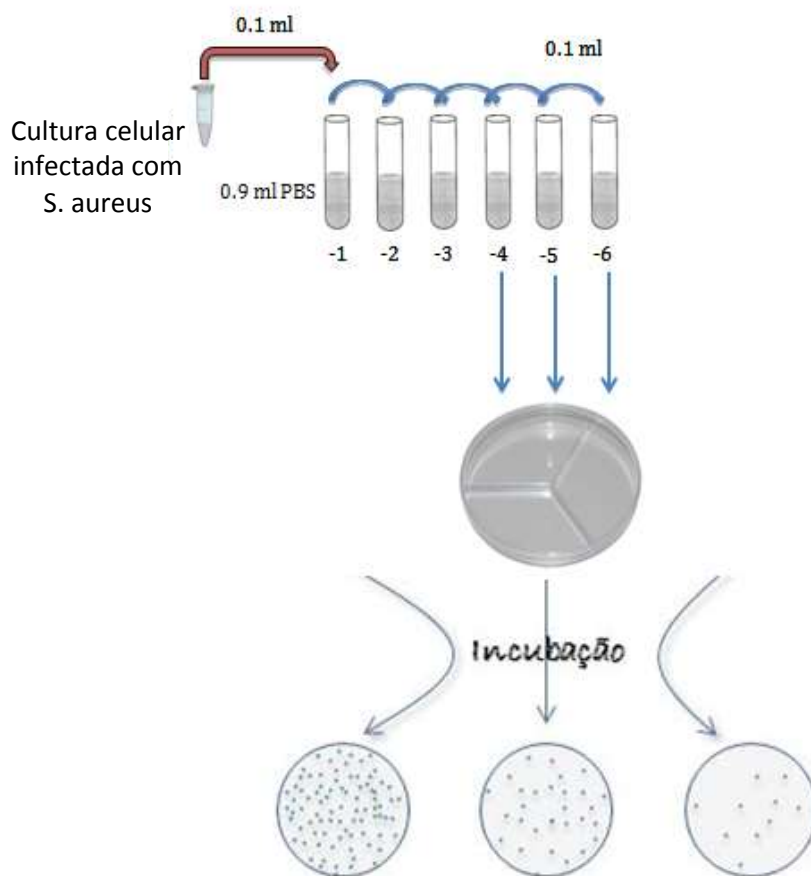


Figura 1: Esquema utilizado para a realização da diluição seriada.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para comparação dos dados foi utilizado o teste ANOVA (post hoc de Bonferroni). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

O ponto de partida de nosso trabalho foi avaliar a identidade genotípica e fenotípica de uma cepa de *Staphylococcus aureus*, gentilmente cedida pelo professor Dirlei Molinari Donatele (Universidade Federal do Espírito Santo), a fim de utilizarmos nos experimentos de vacinação e desafio. Dessa forma, foi feita a extração do DNA bacteriano por lise alcalina e realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR), onde se observou a amplificação de um fragmento de 400bp referente ao gene NUC (Nuclease específica de *S. aureus*), e compatível com o controle positivo ATCC 25923 (dados não mostrados). Além disso, foi feita uma cultura em meio Ágar Mueller-Hinton, onde foram avaliados o aspecto e a forma, compatíveis com os controles positivos de *S. aureus*.

Após a certificação, foi feita a expansão da cultura em caldo TSB durante 18 horas em estufa a 37°C a fim de obtermos grande quantidade de *S. aureus* para a preparação do antígeno vacinal. Uma vez expandida, realizamos então diferentes procedimentos para estabelecer o melhor protocolo de neutralização/morte bacteriana. Para isso, o *S. aureus* foi submetido a ciclos de aquecimento/resfriamento em nitrogênio líquido; Aquecimento em banho-maria à 60°C/75min; Aquecimento em banho-maria à 80°C/30min e 15 ciclos de resfriamento lento à -70°C seguido de descongelamento no banho-maria 37°C. Depois de passarem por esses processos, todas as amostras foram semeadas em Ágar sangue e incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas para observar o crescimento de colônias. Desta forma, o congelamento/descongelamento lento que, resultou na amostra D, como apresentado na Figura 2, demonstrou ser mais eficaz na neutralização quando comparado aos demais procedimentos. Sendo, portanto, o método escolhido para a obtenção do nosso antígeno em todos os experimentos realizados.

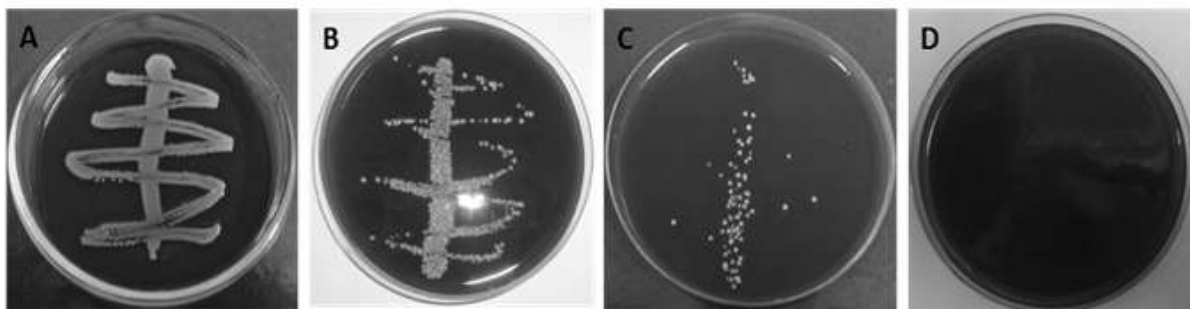


Figura 2: Avaliação do crescimento de *S. aureus* após o processo de neutralização. Semeadura da bactéria em Agar sangue após diferentes tratamentos neutralizantes. Dez ciclos de sonicação/resfriamento em nitrogênio líquido (A); Banho-maria a 60°C/75min (B); Banho-maria a 80°C/30min (C); Sequências de 15 ciclos entre congelamento a -70°C e descongelamento em banho-maria 37°C (D).

4.2 VACINAÇÃO

Uma vez obtido o antígeno inativado, determinamos a concentração proteica total e iniciamos os procedimentos de vacinação. Dessa forma, camundongos BALB/c foram vacinados por via intranasal ou intramuscular, com SaAg (50µg/animal), em duas doses intervaladas por 15 dias. Os camundongos controles não foram vacinados.

Após a administração de cada dose, monitoramos por 3 dias consecutivos os efeitos da vacina. Para isso, avaliamos sinais clínicos como alteração comportamental, irritação local, pelos eriçados, edema e claudicação. Como podemos observar na Tabela 1, os animais vacinados pela via intranasal não demonstraram qualquer tipo de alteração nos 2 tempos de avaliação (após a primeira ou segunda dose). De forma diferente, animais vacinados pela via intramuscular apresentaram grande irritação no local da aplicação, edema no membro e claudicação, sendo estes sinais intensificados após a segunda dose da vacinação.

Tabela 1: Sinais clínicos após a vacinação. Monitoramento dos sinais clínicos dos camundongos 72 horas após a primeira e a segunda administração de SaAg pela via intramuscular e intranasal. Leve (+), moderado (++) e intenso (+++).

1ª dose	Alteração comportamental	Irritação local	Pelos eriçados	Edema	Claudicação
Vacina Nasal	-	-	-	-	-
Vacina Intramuscular	-	+	-	++	+
2ª dose	Alteração comportamental	Irritação local	Pelos eriçados	Edema	Claudicação
Vacina Nasal	-	-	-	-	-
Vacina Intramuscular	-	++	-	+++	+++

4.3 TOXICIDADE DA VACINA SaAg *in vivo*

Depois de avaliarmos os sinais clínicos após a vacinação, nos propusemos a testar a toxicidade dessa vacina *in vivo*. Para isso, animais vacinados conforme descrito anteriormente foram eutanasiados e tiveram o soro coletado para a dosagem de transaminases (TGO e TGP) e creatinina. Animais que receberam tetracloreto de carbono (CCl₄) por via intraperitoneal foram utilizados como controle positivo. Os controles negativos não foram vacinados.

Conforme podemos observar na Figura 3, não foram detectadas diferenças significativas dos grupos vacinados em relação ao grupo controle negativo para os parâmetros testados em nenhum período de avaliação. De forma esperada, observamos grandes quantidades de transaminases e creatinina apenas no grupo injetado com o CCl₄, quando comparados aos demais grupos.

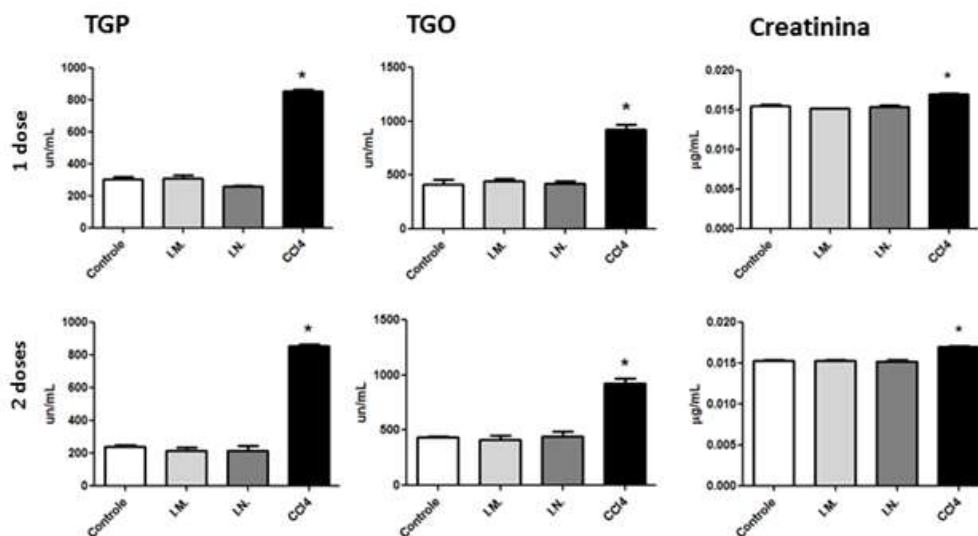


Figura 3: Avaliação da biocompatibilidade da vacina SaAg. Dosagem de transaminases (TGO e TGP) e creatinina do soro dos animais eutanasiados 72 horas após a primeira ou segunda dose da vacina SaAg, administrada pelas vias intramuscular ou intranasal. Controles positivos receberam tetracloreto de carbono (CCl_4) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. * $p < 0,05$ em relação aos grupos vacinado e controle negativo. Foram utilizados 3 animais por grupo.

4.4 IMUNOGENICIDADE DA VACINA SaAg *in vivo*

A partir da comprovação da biocompatibilidade, demos sequência com a avaliação da imunogenicidade através da proliferação celular. Inicialmente realizamos a padronização da técnica utilizando esplenócitos de animais vacinados por via intranasal marcados com CFSE e cultivados na presença de SaAg durante os tempos de 24, 48 e 72 horas. O índice de proliferação foi determinado por citometria de fluxo, e como podemos observar na Figura 4, houve uma maior visibilidade dos ciclos de divisão celular no tempo de 48 horas. Desta forma, esse foi o tempo escolhido para as demais avaliações de proliferação em nosso estudo.

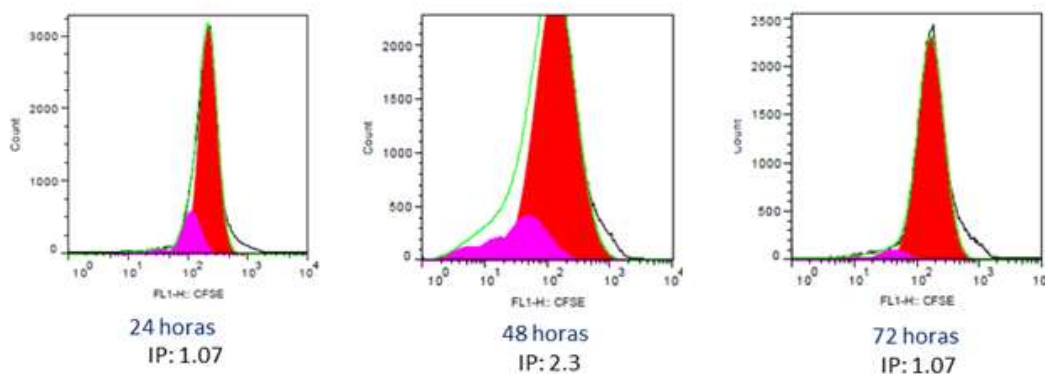


Figura 4: Padronização da proliferação celular. Esplenócitos de animais vacinados com SaAg por via intranasal foram marcados com CFSE (*Carboxy Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester*) e estimulados *in vitro* com SaAg por 24, 48 e 72 horas. As células foram coletadas e submetidas a citometria de fluxo, onde se determinou o índice de proliferação celular (IP).

Uma vez determinado o melhor tempo para avaliação da proliferação celular, iniciamos a comparação entre as respostas dos grupos vacinados com SaAg por via intramuscular ou intranasal. Conforme a Figura 5, podemos notar que ambos os grupos vacinados com SaAg possuem índices de proliferação significativamente maiores que os animais do grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos vacinados com SaAg pelas diferentes vias de inoculação.

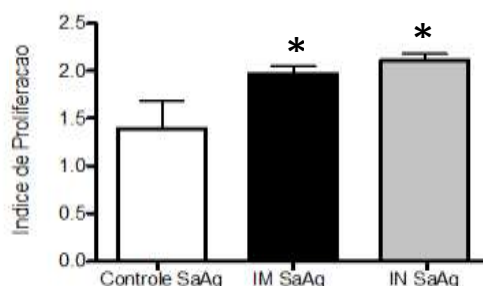


Figura 5: Avaliação das respostas linfoproliferativas após a vacinação com SaAg. Resposta linfoproliferativa de esplenócitos em cultura marcados com CFSE e reestimulados com 50 μ g de SaAg *in vitro* de camundongos eutanasiados um dia após a segunda dose da vacinação por via intranasal ou intramuscular. Um grupo não vacinado foi utilizado como controle. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressa como índice de proliferação celular (IP). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Foram utilizados 4 animais por grupo.

Uma vez determinada a taxa de proliferação celular, nos propuzemos a avaliar a produção de citocinas dos sobrenadantes das culturas de esplenócitos de animais vacinados e controles, estimulados ou não com SaAg. Conforme mostra a Figura 6, observamos uma significativa diferença na produção de IL-4 pelo grupo vacinado com SaAg intramuscular, após a segunda dose vacinal quando estimulado com antígeno “*in vitro*”. Não observamos diferença na produção desta citocina pelas células de nenhum grupo, após a primeira dose. De forma semelhante, grandes quantidades de IL-10 foram produzidas pelos animais vacinados por via intranasal ou intramuscular e estimulados com SaAg *in vitro*, após a segunda dose vacinal. A dosagem de IFN- γ mostrou diferença estatística apenas no grupo intramuscular estimulado com o SaAg, após as primeira e segunda dose da vacina.

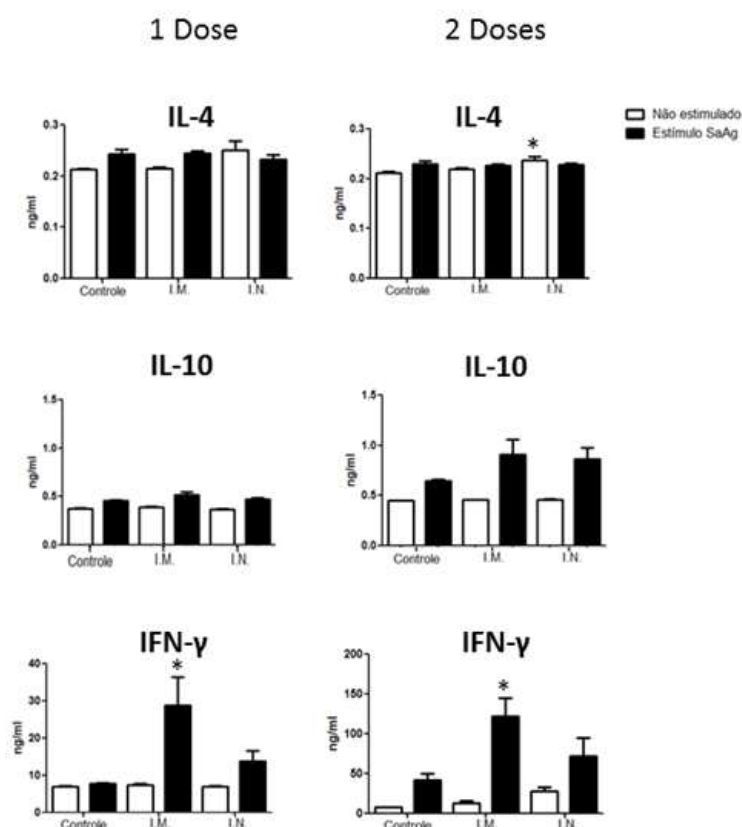


Figura 6: Dosagem das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ por ELISA. Animais vacinados com SaAg por via intranasal ou intramuscular e eutanasiados após 15 dias da primeira ou segunda dose. Os esplenócitos obtidos foram cultivados por 96 horas na presença de SaAg (50 μ g/mL) e a produção de citocinas determinada no sobrenadante da cultura, por ELISA. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Foram utilizados 5 animais por grupo.

Depois de avaliarmos a produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas, nos propuzemos a determinar se os distintos protocolos vacinais poderiam estar correlacionados a estimulação diferencial das população de células T e a produção das citocinas IFN- γ e IL-10. Assim, células dos linfonodos drenantes (cervical e poplíteo) de cada grupo foram retirados 24 horas após a segunda dose da vacinação e incubados por 96h com SaAg seguido de marcação com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , anti-IL-10, anti-CD4 e anti-CD8. Como podemos constatar na Figura 7, os grupos vacinados apresentaram maiores porcentagens de células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IFN- γ quando comparados ao grupo controle. Além disso, observamos maiores porcentagens de ambas células produtoras de IFN-gama no grupo vacinado por via intranasal, quando comparado ao grupo vacinado por via intramuscular. De forma diferente, animais vacinados por via intramuscular apresentaram maiores porcentagens de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IL-10 quando comparadas a grupo controle, ou mesmo ao grupo vacinado por via intranasal.

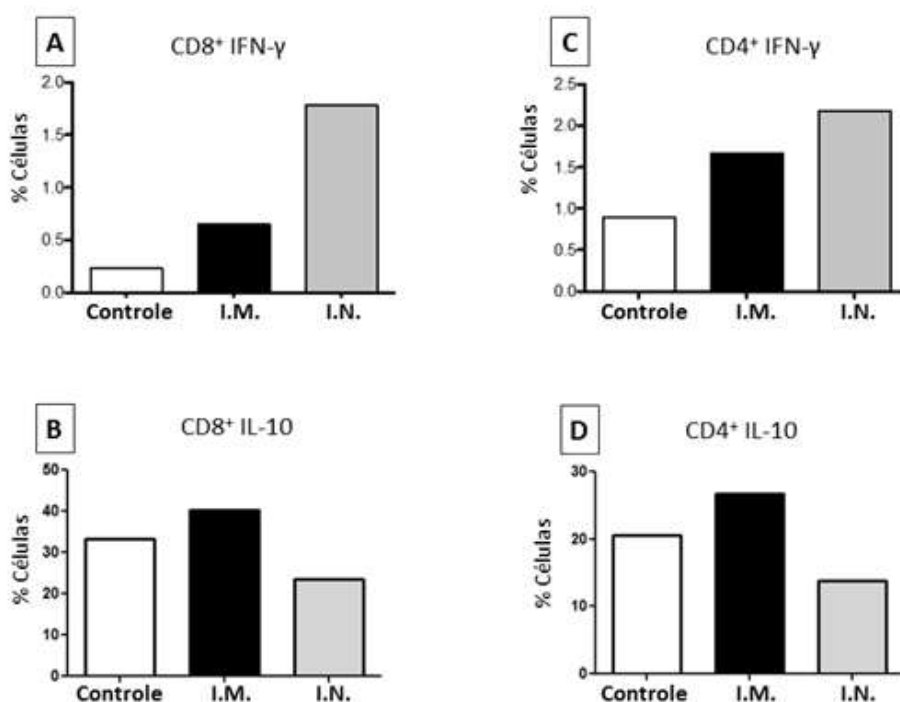


Figura 7: Análise da população de linfócitos TCD4⁺ e TD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-10. Avaliação da porcentagem das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo em linfonodos de animais eutanasiados 1 dia após o booster e reestimulados *in vitro* com 50 μ g de SaAg por 96 horas. Os dados são representativos de um experimento utilizando pool de células de 5 animais por grupo: Controle e vacinados pela via intramuscular ou intranasal.

Depois de avaliarmos a imunidade celular, nos propusemos a avaliar a resposta humoral dos camundongos frente a vacinação pelas diferentes vias. Dessa forma, animais vacinados foram eutanasiados 15 dias após cada dose vacinal e determinada a produção de IgG1 e IgG2a no soro.

Como ilustrado na Figura 8, observou-se um aumento significativo na produção de IgG1 e IgG2a pelos animais vacinados com SaAg, quando comparado ao grupo controle. Para a produção de IgG1, observamos um aumento após a primeira dose vacinal. O que não foi verificado após a segunda dose da vacina SaAg. Para a produção de IgG2a, observamos um aumento significativo após as duas doses da vacina, para os animais administrados com SaAg. De forma interessante, animais vacinados por via intranasal apresentaram maiores níveis de IgG2a quando comparados aos animais vacinados por via intramuscular, o que não foi observado para a produção de IgG1.

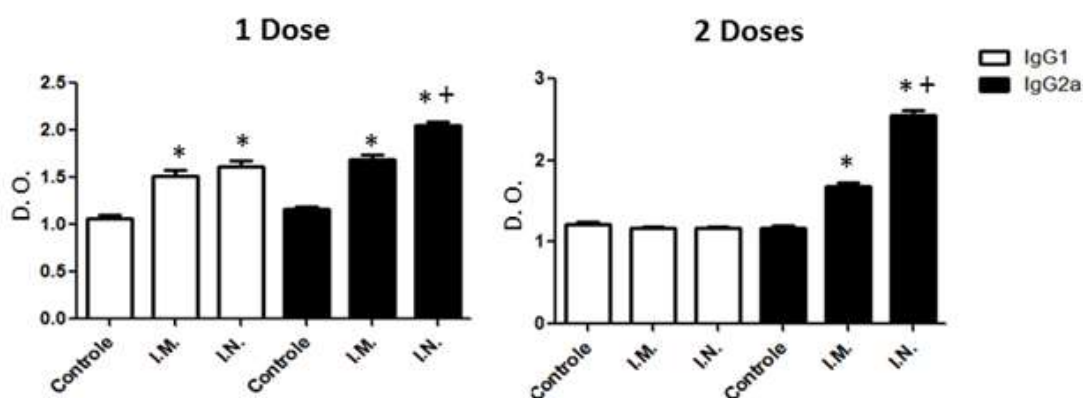


Figura 8: Avaliação da resposta humoral. Dosagem de IgG1 e IgG2a por Elisa no soro dos animais do grupo controle e vacinados com uma ou com duas doses da vacina SaAg pela via intramuscular e intranasal, duas semanas após a vacinação. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e (+) em relação ao grupo intramuscular.

4.5 DESAFIO *in vitro* COM *S. aureus* (CEPA ATCC 25923) APÓS A VACINAÇÃO COM SaAg PELA VIA INTRANASAL E INTRAMUSCULAR.

A fim de avaliar a eficácia da vacina SaAg, realizamos o desafio *in vitro* onde as bactérias ajustadas na concentração de 10^8 foram inoculadas na cultura de esplenócitos (10^6 células/mL) de animais vacinados e controle, previamente

estimulados com SaAg durante 48 horas. Após os tempos de 2, 4 e 6h em co-cultura com *S. aureus*, foram retirados 5µl e semeados em placas tripartidas de Agar Mueller Hinton nas diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , seguido de incubação a 37°C durante 24 horas para o crescimento das colônias. Posteriormente foi feita a contagem das colônias dos grupos controle e vacinados para avaliação da capacidade microbicida *in vitro*, como ilustra a Figura 9.



Figura 9: Contagem de UFC após 24 horas da semeadura. Figura representativa das UFC obtidas após co-cultura de esplenócitos infectados *in vitro* com *S. aureus* pelo período de duas horas. A foto representa UFC dos: grupo controle (A), grupo vacinado por via intramuscular (B) grupo vacinado por via intranasal (C).

Após a contagem das colônias, observamos uma diferença significativa nas quantidades de unidades formadoras, como demonstrado na Figura 10. Desta forma, observamos que o número de UFC foi diretamente relacionado ao tempo de infecção *in vitro*, para todos os grupos avaliados. Além disso, animais vacinados pela via intranasal apresentaram uma tendência ao aumento de UFC no tempo de de 6 horas, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa quando comparado aos demais grupos.

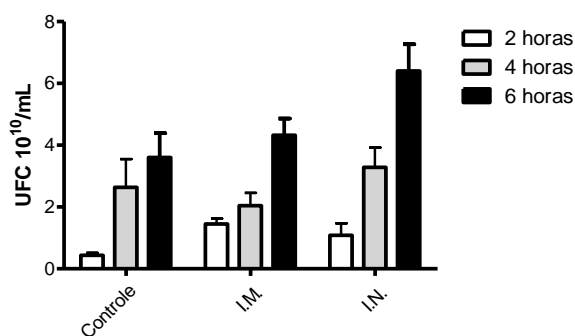


Figura 10: Contagem de unidades formadoras de colônias após desafio *in vitro* com *S. aureus*. UFC/mL das culturas de esplenócitos de animais controles ou vacinados, infectados *in vitro* com *S. aureus* por 2, 4 e 6h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Além da avaliação da UFC, foram avaliadas as produções de IL-4, IL-10 e IFN- γ no sobrenadante da cultura. Desta forma, como podemos notar na Figura 11, não houve diferença estatística na produção de IL-4 em nenhum dos grupos ou tempos avaliados. No entanto, observamos um aumento significativo no tempo de 6 horas, para a produção de IL-10 por esplenócitos dos animais vacinados por via intranasal ou intramuscular. De forma interessante, a vacinação por via intramuscular induziu a produção de grandes quantidades de IFN- γ , nos diferentes tempos de avaliação, quando comparado aos demais grupos.

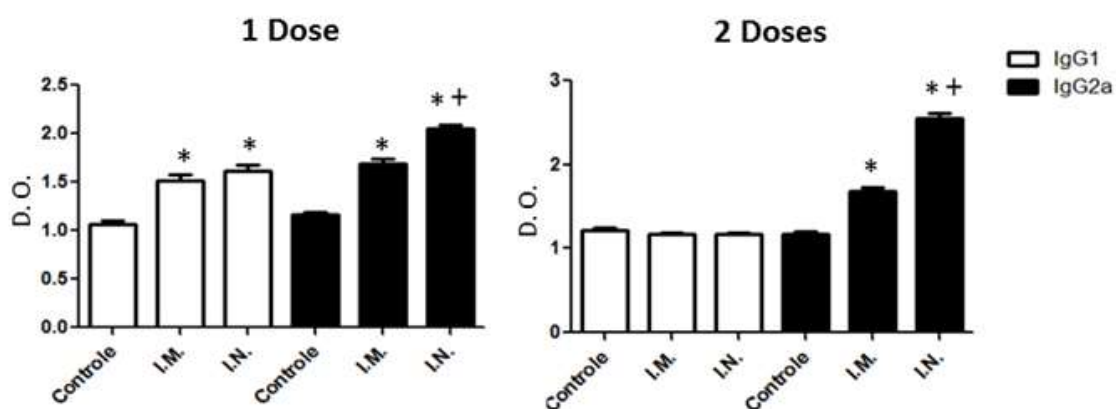


Figura 11: Dosagem de citocinas após desafio *in vitro* com *S. aureus*. Produção de IL-4, IL-10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas de de esplenócitos de animais controles ou vacinados, infectados *in vitro* com *S. aureus* por 2, 4 e 6h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, tivemos como objetivo a elaboração de uma vacina contra o *S. aureus*, bactéria de maior prevalência na mastite em todo o mundo segundo estudos feitos por Badiou *et al.* (2008) e Cremieux *et al.* (2009). Essa prevalência se dá pelo surgimento de cepas bacterianas resistentes à meticilina (MRSA) e à vancomicina, o que de acordo com Gorwitz *et al.* (2008) e Liu *et al.* (2011) justifica o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas, como por exemplo o desenvolvimento de vacinas.

Middleton, *et al.* (2008), afirma que as vacinas contra *S. aureus* podem produzir resultados variados dependendo de sua composição. Dessa forma, visamos avaliar primeiramente a imunogenicidade dos animais frente à vacinação com o antígeno bruto de *S. aureus* (SaAg). Além disso, Djupesland e Skretting, (2012) abordam que a vacinação intranasal é uma alternativa atrativa por precisar de baixas doses de antígeno e de adjuvante em comparação com a vacinação parenteral. Dessa forma, nos propusemos a comparar as respostas imunológicas da vacina com a administração realizada por duas vias: intramuscular e intranasal. Esse é o primeiro passo para avaliar as respostas imunes que envolvem nossa vacina, determinando a viabilidade desse produto para que futuramente seja possível aumentar a resistência do rebanho contra o *S. aureus* e reduzir as consequências clínicas e econômicas da mastite bovina.

Para a preparação da vacina, pesquisamos na literatura metodologias para a inativação do *S. aureus* como as descritas por McKillip, Jaykus e Drake (1998) e Wallemacq *et al.* (2012). Porém, quando testamos esses métodos eles mostraram-se ineficazes em nosso modelo de estudo. Dessa forma, resolvemos avaliar a metodologia de congelamento e descongelamento lento, padronizada em nosso laboratório para inativar *Mycobacterium tuberculosis*, a qual mostrou-se uma técnica eficiente para matar o *S. aureus* (Figura 2D) e garantir a obtenção do antígeno bruto.

Após a preparação do antígeno, nos concentramos na vacinação dos animais, cuja escolha foi por modelos murinos assim como a maioria dos ensaios de vacinação publicados até o momento (Hu *et al.*, 2006; TUCHSCHERR *et al.*, 2008; ARLIAN E TINKER, 2011).

Depois da vacinação, o primeiro ponto analisado em nosso estudo foi a presença de sinais clínicos nos animais que receberam SaAg pela via intramuscular em relação aos que receberam pela via nasal (Tabela 1). Nesse aspecto, a vacina intramuscular apresentou sinais indesejados caracterizados nos animais, como irritação local, edema e claudicação. De forma diferente, o uso da vacina nasal mostrou ser mais seguro visto que não foi observado qualquer tipo de alteração nos animais desse grupo. Isso pode ser explicado pelo fato de que a rota intranasal estimula células T regulatórias (Treg), responsáveis pela produção de citocinas imunossupressoras como IL-4, IL-10 e TGF- β (LYCKE, 2012), o que diminui os sinais de inflamação (BLUESTONE E TANG, 2005) podendo assim ser responsável pela ausência dos sinais clínicos nesse grupo.

Após a observação dos sinais clínicos, avaliamos a biocompatibilidade da vacina. Para isso, analisamos parâmetros de toxicidade sistêmica como o nível sérico de AST, ALT e creatinina. De acordo com Ennulat *et al.* (2010), o AST e ALT são aminotransferases amplamente distribuídas em humanos e tecidos animais. O AST é encontrado em muitos tecidos do corpo, tais como fígado, coração, músculo esquelético, rim e pulmão. Quando esses tecidos ou órgãos sofrem agressão, essa molécula é liberada na corrente sanguínea. Já o ALT é encontrado em grandes quantidades no fígado e o seu nível no soro é considerado um marcador de dano hepático, portanto os valores destes parâmetros são rotineiramente utilizados para o monitoramento de lesões cardíacas e hepáticas. De acordo com Adler (2010), a creatinina é um produto da degradação da creatina do músculo filtrada do sangue pelos rins, o que a torna biomarcadora de lesão renal. Os valores normais de creatinina sugerem que a função renal está adequada. Como observamos em nossos resultados (Figura 3), não houve indícios de alteração cardíaca, hepática ou renal nos animais vacinados com SaAg, o que mostra ser uma vacina segura. De forma diferente, o grupo onde o CCl₄ foi injetado pela via intraperitoneal apresentou o aumento de todas as enzimas, o que já era esperado uma vez que essa molécula é de toxicidade comprovada e pode levar o animal a morte (LEE *et al.*, 2007).

Visto que a vacina não é tóxica, prosseguimos nossos estudos com a avaliação da imunogenicidade da vacina SaAg *in vivo*. Como podemos observar na Figura 5, houve aumento da proliferação celular nos grupos vacinados pelas duas vias em relação ao grupo controle, dado corroborado pelos estudos de Leitner *et al.* (2011)

que embora tenham utilizado um modelo experimental diferente do nosso, também observou o aumento da proliferação celular em cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com uma proteína purificada do *S. aureus*. Isso demonstra que tanto o antígeno total quanto a proteína purificada do *S. aureus* são capazes de estimular uma resposta celular específica, a qual pode ser importante para indução da imunidade protetora durante a infecção por essa bactéria.

A partir desses resultados, decidimos dosar as citocinas em sobrenadantes das culturas de esplenócitos com ou sem estímulo *in vitro* com SaAg. Como mostra a Figura 6, não observamos alteração na produção de IL4 após a primeira dose da vacina. No entanto, após a segunda dose, observamos um aumento estatístico na produção dessa citocina quando comparamos o grupo intranasal com o controle, ambos não reestimulados *in vitro*. Dados na literatura afirmam que IL-4 é uma citocina representativa da resposta tipo Th2, que pode desempenhar um papel benéfico na resistência do hospedeiro à infecção por *S. aureus* (SAAKI *et al.*, 2000). Portanto, o aumento encontrado no grupo vacinado pela via intranasal torna-se uma característica alcançada desejável.

Além disso, quando observamos a produção da citocina IL-10, percebemos que há um aumento nítido nos grupos desafiados *in vitro* com o antígeno em relação aos não desafiados. Esse resultado, de acordo com Florquin *et al.* (1994) é favorável, visto que, esses autores, afirmam que a IL-10 também é uma citocina que representa a resposta Th2, conhecida por apresentar ações anti-inflamatórias em diversas infecções. De forma adicional, Saaki *et al.* (2000) relatam em seus estudos que a administração de anticorpos monoclonais anti-IL-10 nos camundongos inibiram a eliminação do *S. aureus* pelo organismo, sugerindo que assim como a IL-4, a IL-10 pode ter um importante papel na resistência do hospedeiro durante uma infecção. No entanto, nossos resultados não mostraram diferença estatística na produção de IL-10 entre os grupos vacinados e o controle, demonstrando que a nossa vacina não interferiu no estímulo dessa tão importante citocina.

Em relação a dosagem do IFN- γ , observamos que houve um aumento significativo na produção dessa citocina somente no grupo desafiado *in vitro* com SaAg que recebeu a vacina pela via intramuscular, o que é favorável a este grupo visto que essa citocina é responsável pela ativação microbicida de macrófagos e neutrófilos

infectados pelo *S. aureus* (BANNERMAN *et al.*, 2004). Wallemacq *et al.* (2012) em seus estudos, também utilizou uma vacina composta pelo *S. aureus* inativado pelo calor e de forma semelhante ao nosso grupo vacinado pela via intranasal, não notou diferença na dosagem do IFN- γ no grupo vacinado pela via subcutânea em relação ao grupo controle. Ele alcançou o aumento desejado dessa citocina somente quando adicionou à sua vacina o adjuvante α CD40. Isso nos sugere que a adição de adjuvante à nossa formulação pode ser benéfica no sentido de potencializar as respostas imunológicas.

Depois de dosarmos as citocinas no sobrenadante das culturas de esplenócitos, determinamos se a vacinação com SaAg estava correlacionada com a estimulação diferencial da população de células T e seus produtos na cultura de linfonodos cervicais e poplíteos reestimulados *in vitro* com SaAg. Como podemos notar na Figura 7, de forma inesperada o grupo vacinado pela via intranasal foi que se destacou com o aumento da produção de IFN- γ em relação aos demais grupos, tanto pelas células TCD8⁺ quanto pelas TCD4⁺. Além disso, índices contrários são observados na dosagem de IL-10, onde o grupo intranasal apresentou dosagens menores comparadas aos demais grupos. Estudos feitos por Wallemacq (2012) relatam que tanto os linfócitos T CD4⁺ quanto os CD8⁺ podem produzir quantidades significantes de IFN- γ frente ao estímulo *in vitro* com o antígeno de *S. aureus*. Nossos estudos não só comprovaram essa afirmativa, como também puderam demonstrar diferença na dosagem de IL-10. A partir dessas informações, podemos sugerir que houve uma tendência para resposta tipo Th1 no grupo vacinado pela via intranasal, uma vez que aumentou o IFN- γ de forma concomitante à diminuição do IL-10.

De acordo com Brandtzaeg (2010), a vacinação realizada pela via mucosa pode desencadear tanto a imunidade celular quanto a imunidade humoral e não apenas nos locais das mucosas, mas também de forma sistêmica. Para comprovar essa afirmativa, nós realizamos a dosagem das imunoglobulinas IgG2a (correlacionada com a polarização Th1) e IgG1 (correlacionada com a polarização Th2) (Liu *et al.*, 2012). Além do mais, essas imunoglobulinas são predominantes na defesa imunitária das glândulas mamárias (AVERY E GORDON, 1991).

Como observamos na Figura 8, com apenas uma dose da vacina houve o aumento de IgG2a e IgG1 nos grupos vacinados em relação ao controle e um aumento significativo do grupo intranasal em relação ao intramuscular. Quando avaliamos as imunoglobulinas após duas doses da vacinação, percebemos que não há diferenças dos grupos vacinados em relação ao controle na dosagem de IgG1, mas há um aumento ainda maior de IgG2a dos grupos em relação ao controle, prevalecendo em maior quantidade o grupo intranasal. Wallemacq (2012) também demonstrou aumento dessas imunoglobulinas nos grupos vacinados pela via subcutânea com o *S. aureus* inativado em relação ao grupo controle, onde foi administrado PBS. Porém, a resposta alcançada por ele foi muito maior quando utilizou o adjuvante α CD40. Em nosso estudo, mesmo sem o auxílio de adjuvante, pudemos alcançar altos níveis de IgG2a no grupo intranasal, o que sugere que a vacina SaAg administrada pela via mucosa tem grande capacidade de gerar resposta humoral e pode estar correlacionada com a resposta tipo Th1.

Após avaliarmos a resposta humoral, decidimos avaliar a eficácia dessa vacina através do desafio *in vitro* com o *S. aureus*. Para isso, nos baseados na metodologia descrita por Kang *et al.* (2010). De acordo com a Figura 10, observa-se que os grupos vacinados não impediram o crescimento da bactéria, pelo contrário, tiveram uma tendência a apresentar maior quantidade em relação ao controle. Isso demonstra que nossa vacina não foi eficaz no controle da infecção *in vitro*.

Para saber o motivo do crescimento demasiado do *S. aureus* nas culturas de esplenócitos, foi feita a dosagem de citocinas no sobrenadante dessas culturas. Como podemos observar na Figura 11, não houve diferença na dosagem de IL-4 entre os grupos, mas ocorreu um aumento de IL-10 e baixos níveis de IFN- γ do grupo vacinado pela via intranasal em relação ao controle, o que pode explicar o aumento da contagem de colônias desse grupo. Resultados descritos por Hu *et al.* (2006), mostraram semelhanças com os nossos. Onde, seu estudo descreve sobre o uso da vacina intranasal composta pela enterotoxina C mutante do *S. aureus* na proteção dos camundongos contra a infecção por esse mesmo patógeno. Em seus experimentos ele encontrou nos grupos imunizados altos títulos das citocinas IL-4 e IL-10 e baixos níveis de IFN- γ na resposta contra a infecção *in vivo*, onde injetou *S. aureus* pela veia caudal do camundongo. Nosso estudo não mostra diferença na

dosagem da citocina IL-4, mas o aumento de IL-10 e baixos níveis de IFN- γ nos leva a sugerir assim como ele, que a resposta nesse grupo tendeu a ser do tipo Th2.

Já o grupo intramuscular apresentou tanto o aumento da concentração de IL-10 quanto de IFN- γ quando comparado ao grupo controle. Esses resultados corroboram com os descritos por Gómez *et al.* (2002), onde utilizou em seus estudos uma vacina pela via mucosa composta pelo *S. aureus* vivo atenuado e alcançou dosagens elevadas tanto de IL-10 quanto de IFN- γ na cultura de animais desafiados com o *S. aureus*. Segundo ele, o aumento dessas citocinas está relacionada ao fato de que vários epítomos estão presentes na formulação testada, mesmo fazendo-se o uso de uma vacina atenuada, o que pode levar a produção de fatores de virulência importantes que estimulam diferentes vias da resposta imune. Em nosso estudo pudemos mostrar que mesmo a utilização de uma vacina composta pelo *S. aureus* inativado pela via intramuscular pode alcançar resultados semelhantes.

A fim de melhor entendermos os mecanismos envolvidos durante a vacinação com SaAg, pretendemos investigar futuramente os fenômenos observados em nosso estudo a nível molecular, ampliando as citocinas a serem analisadas, observando a função e frequência de outras populações celulares, como por exemplo as células de memória. Além disso, planejamos avaliar a imunogenicidade de proteínas purificadas do *S. aureus*, a potencialização do efeito imunogênico com o uso de adjuvantes e a proteção da vacina em modelo murino de mastite.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram evidências importantes sobre a imunização intramuscular e intranasal com SaAg e de sua utilização como agente profilático contra infecções causadas por *S. aureus*. Desta forma podemos concluir que:

- Apesar da vacina aplicada pela via intramuscular apresentar sinais indesejados como edema e irritação no local de aplicação, ela foi capaz de induzir respostas do tipo Th1 mais intensamente que a vacinação por via intranasal.
- A vacina intranasal induziu forte resposta imune humoral.
- A vacinação por ambas vias não foi capaz de induzir imunidade protetora frente ao desafio *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS

ADLER, S. Novel kidney injury biomarkers. **Journal of Renal Nutrition: The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation**, v. 20, p. S15–S18, 2010.

AMORIJ, J. P. et al. Needle-free influenza vaccination. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 699-711, 2010.

ANDERSEN, M. H. et al. Cytotoxic T cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 32–41, 2006.

ARLIAN, B. M.; TINKER, J. K. Mucosal Immunization with a *Staphylococcus aureus* IsdA-Cholera Toxin A2/B Chimera Induces Antigen-Specific Th2-Type Responses in Mice. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 18, p. 1543–1551, 2011.

AVERY, V. M.; GORDON, D. L. Antibacterial properties of breast milk: requirements for surface phagocytosis and chemiluminescence. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 10, p. 1034–1039, 1991.

BADIOU, C. et al. Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, p. 1180–1183, 2008.

BANNERMAN, D. D. et al. Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 463–472, 2004.

BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, p. 31-36, 2001.

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Napgama**, v. 5, p. 10, 2002.

BENEDETTE, M. F. et al. Mastite bovina. **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**, v. 7, p. 1-5, 2008.

BLUESTONE, J. A.; TANG, Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 638-642, 2005.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: An evolving disease. **Veterinary Journal**, v. 164, p. 116-128, 2002.

BRAMLEY, A. J., et. al. Current concepts of bovine mastitis. **National Mastitis Council**, p. 1-3, 1996

BRANDTZAEG, P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. **Immunological Investigations**, v. 39, p. 303–355, 2010.

BURCHILL, M. A. et al. Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, p. 5853–5864, 2003.

CARTER, E. W.; KERR, D. E. Optimization of DNA-based vaccination in cows using green fluorescent protein and protein A as a prelude to immunization against staphylococcal mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1177–1186, 2003.

CASSOL, D. M. S. et al. Mastite bovina. **A Hora Veterinária**, v. 29, p. 27–31, 2010.

CASTAGLIUOLO, I. et al. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 4393–4402, 2006.

CHENG, A. G. et al. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 225-232, 2011.

CORRIGAN, R. M.; MIAJLOVIC, H.; FOSTER, T. J. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 22, 2009.

CRÉMIEUX, A. C. et al. Panton-Valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. **PLoS ONE**, v. 4, 2009.

KERRO DEGO, O.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. **The Veterinary Quarterly**, v. 24, p. 181–198, 2002.

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

DINIZ, M. DE O.; FERREIRA, L. C. DE S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**, v. 24, 2010.

DJUPESLAND, P. G.; SKRETTING, A. Nasal Deposition and Clearance in Man: Comparison of a Bidirectional Powder Device and a Traditional Liquid Spray Pump. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, 2012.

DUTHIE, M. S. et al. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. **Immunological Reviews**, v. 239, p. 178–196, 2011.

ELINAV, E. et al. Regulation of the Antimicrobial Response by NLR Proteins. **Immunity**, v. 34, p.665, 2011.

ENNULAT, D. et al. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. **Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 116, p. 397–412, 2010.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 4, p. 1315-1320, 2004.

FETROW, J. Mastitis: an economic consideration. **Proceedings of the 29th Annual Meeting of the National Mastitis Council, Atlanta**, p. 3–47, 2000.

FLORQUIN, S. et al. Systemic release and protective role of IL-10 in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 153, p. 2618–2623, 1994.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. **São Paulo: Lemos Editorial**, p.39-141, 2000.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, p. 948–958, 2005.

FOURNIER, B.; PHILPOTT, D. J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 521–540, 2005.

GOLDAMMER, T. et al. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 174–185, 2004.

GÓMEZ, M. I. et al. Induction of cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4254–4260, 2002.

GORWITZ, R. J. et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 1226–1234, 2008.

GRÖNLUND, U.; JOHANNISSON, A.; PERSSON WALLER, K. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 147–154, 2006.

HASHIMOTO, M. et al. Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, p. 3162–3169, 2006.

HOEDEMAKER, M. et al. Dynamics of *Staphylococcus aureus* infections during vaccination with an autogenous bacterin in dairy cattle. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 48, p. 373–383, 2001.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, p. S45–S53, 2005.

HOLTFRETER, S.; KOLATA, J.; BRÖKER, B. M. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* - The anti-*S. aureus* antibody response. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 176-192, 2010.

HU, D. L. et al. Intranasal vaccination with a double mutant of staphylococcal enterotoxin C provides protection against *Staphylococcus aureus* infection. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2841–2848, 2006.

HU, C. et al. Protective effect of ligand-binding domain of fibronectin-binding protein on mastitis induced by *Staphylococcus aureus* in mice. **Vaccine**, v. 28, p. 4038–4044, 2010.

ILLUM, L. et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, p. 81-96, 2001.

IWATSUKI-HORIMOTO, K. et al. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. **Journal of Virology**, v. 80, p. 5233–5240, 2006.

JOSHI, A. et al. Immunization with *Staphylococcus aureus* iron regulated surface determinant B (IsdB) confers protection via Th17/IL17 pathway in a murine sepsis model. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.8, p. 336-346, 2012.

KANG, J. S. L. et al. Strong purified protein derivative responses are associated with poor mycobacterium inhibition in latent TB. **The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, v. 36, p. 348–354, 2010.

KERRO DEGO, O.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. **The Veterinary Quarterly**, v. 24, p. 181–198, 2002.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. **mBio**, v. 4, p. e00764–13, 2013.

KOSKINEN, M. T. et al. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 952–959, 2009.

KRISHNA, S.; MILLER, L. S. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 261-280, 2012.

KUNKEL, E. J.; CAMPBELL, D. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, v. 10, p. 313–323, 2003.

LADEIRA S.R.L. Mastite bovina. **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**, v.1, p.359-370, 2007.

LAMMERS, A. et al. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 77–89, 1999.

LE MARÉCHAL, C. et al. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 247–282, 2011.

LEE, J.-W. et al. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue canadienne de recherche vétérinaire**, v. 69, p. 11–18, 2005.

LEE, C.-H. et al. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1898–1904, 2007.

LEITNER, G.; LUBASHEVSKY, E.; TRAININ, Z. *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 93, p. 159–167, 2003.

LEITNER, G. et al. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, p. 25–35, 2011.

LIU, M. et al. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101 Suppl 2, p. 14567–14571, 2004.

LIU, C.-Z.; SHIH, M.-H.; TSAI, P.-J. ClfA(221-550), a fibrinogen-binding segment of *Staphylococcus aureus* clumping factor A, disrupts fibrinogen function. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, p. 286–294, 2005.

LIU, C. et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, p. e18–55, 2011.

LIU, H. et al. Enhancement of the Immunogenicity and Protective Efficacy of a Mucosal Influenza Subunit Vaccine by the Saponin Adjuvant GPI-0100. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

LYCKE, N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p. 592-605, 2012.

MACHADO, P. F. et al. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 359-361, 2000.

MAMO, W. et al. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. **Vaccine**, v. 12, p. 988–992, 1994.

MCKILLIP, J. L.; JAYKUS, L. A.; DRAKE, M. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4264–4268, 1998.

MENDONÇA, C. L. et al. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícias**, v. 5, p. 107-118, 1999.

MICHIE, C. A. Staphylococcal vaccines. **Trends in Immunology**, v. 23, p.461-463, 2002.

MIDDLETON, J. R. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, p. 805–815, 2008.

MIDDLETON, J. R.; LUBY, C. D.; ADAMS, D. S. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 192–198, 2009.

MILLS, K. H. G.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells - Their induction and role in infection. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 107-117, 2004.

NORDHAUG, M.L. et al. A Field Trial with an Experimental Vaccine Against *Staphylococcus aureus* Mastitis in Cattle. Antibody Response. **Journal of Dairy Science**. v. 77, p. 51276–1284, 1994.

O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, p. 1098–1102, 2010.

OHTSUKA, H. et al. Changes in peripheral leukocyte subsets in dairy cows with inflammatory diseases after calving. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 66, p. 905–909, 2004.

PARK, Y. H. et al. Unique features of bovine lymphocytes exposed to a staphylococcal enterotoxin. **Journal of Veterinary Science**, v. 7, p. 233–239, 2006.

PRENAFETA, A. et. al. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.15, p.208-217, 2010.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, p. 48-59, 2003.

PYÖRÄLÄ, S. New strategies to prevent mastitis. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 37, p. 211–216, 2002.

- RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, p. 369–400, 2006.
- REIS, G. L. et al. Efeito do tipo de ordenha sobre a saúde do úbere e a qualidade do leite. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 48, p. 6-13, 2005.
- RIGBY, K. M.; DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 237-259, 2012.
- ROARK, C. L. et al. $\gamma\delta$ T cells: an important source of IL-17. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, p. 353-357, 2008.
- ROBERTS, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Internal Medicine Journal**, v. 35 Suppl 2, p. S97–S105, 2005.
- SÁ, M.E.P. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal Veterinary Research**, v.41, p.321-326, 2004.
- SASAKI, S. et al. Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2424–2430, 2000.
- SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 197–223, 2005.
- SCHAFFER, A. C.; LEE, J. C. Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, 2008.
- SCHRÖDER, N. W. J. et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 15587–15594, 2003.
- SCHROEDER, J. W. Mastitis control programs: bovine mastitis and milking management. **Document AS-1129. North Dakota State University Extension Service**, 2010.
- SHERIDAN, B. S.; LEFRANÇOIS, L. Regional and mucosal memory T cells. **Nature Immunology**, v. 12, p. 485–491, 2011.
- STRINDHALL, J. et al. Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Vary in Ability to Stimulate Cytokine Expression in Human Endothelial Cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 61, p. 57–62, 2005.

TALBOT, B. G.; LACASSE, P. Progress in the development of mastitis vaccines. **Livestock Production Science**, v. 98, p.101-113, 2005.

TUCHSCHERR, L. P. N. et al. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 5738–5744, 2008.

WALLEMACQ, H. et al. CD40 triggering induces strong cytotoxic T lymphocyte responses to heat-killed *Staphylococcus aureus* immunization in mice: A new vaccine strategy for staphylococcal mastitis. **Vaccine**, v. 30, p. 2116–24, 2012.

WARDENBURG, B. J.; WILLIAMS, W. A.; MISSIAKAS, D. Host defenses against *Staphylococcus aureus* infection require recognition of bacterial lipoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 13831–13836, 2006.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, p. 41–66, 1988.

WEINER, D. B.; KENNEDY, R. C. Vaccines crafted from genetic material might one day prevent AIDS, malaria and other devastating infections that defy current immunization technologies. They may even help treat cancer. **Genetic Vaccines**, p. 50-57, 1999.

WELLNITZ, O.; KERR, D. E. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, p. 191–202, 2004.

WERLING, D.; PIERCY, J.; COFFEY, T. J. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-Potential role in pathogen discrimination? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 2–11, 2006.

YANG, X. O. et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . **Immunity**, v. 28, p. 29–39, 2008.

YUKI, Y.; KIYONO, H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, p. 1083–1097, 2009.

ZAFALON, L.F. et al. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, p.56-65, 2008.

ZHANG, H.; ISSEKUTZ, A. C. Down-Modulation of Monocyte Transendothelial Migration and Endothelial Adhesion Molecule Expression by Fibroblast Growth Factor. **The American Journal of Pathology**, v. 160, p. 2219–2230, 2002.

ZECCONI, A. et al. Relationship between teat tissue immune defences and intramammary. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 480, p. 287-293, 2000.