



ESTRATÉGIAS DE EVASÃO DE *Staphylococcus aureus* À IMUNIDADE INATA

Fernanda Antunha de Freitas^{1*}, Albenones José de Mesquita²
Marília Cristina Sola³, Natália Menezes Moreira¹, Ervaldo Lourenço de Souza Sena⁴

¹Mestranda, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

²Doutor, Professor adjunto na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

³Doutoranda, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

⁴Biomédico, Gerente do Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia, Centro de Pesquisa em Alimentos da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

*fernandaantunha@gmail.com

RESUMO

Staphylococcus aureus é um microrganismo que habita pele e mucosas dos seres humanos de forma comensal, porém ele pode estar associado com infecções hospitalares ou adquiridas na comunidade. A imunidade inata é o primeiro sistema de defesa de um organismo, tanto animal quanto humano. Tal microrganismo está envolvido na produção de diversos fatores de virulência que tem como objetivo a evasão do sistema imune inato, como fatores que impedem o reconhecimento e a ligação do patógeno pelos neutrófilos; fatores que fornecem proteção contra substâncias microbicidas de fagócitos, entre outros. Em adição, o microrganismo é capaz de secretar várias moléculas citotóxicas que têm a habilidade de causar injúria às células imunes. Assim, diante a relevância do tema propôs-se realizar uma revisão de literatura sobre as estratégias de evasão de *S. aureus* à imunidade inata com o objetivo de relatar os avanços da ciência neste tema específico, o status da arte, além de focar, paralelamente, os mecanismos de evasão celular.

PALAVRAS-CHAVE: Fatores de virulência, patógeno, sistema imune.

EVASION STRATEGIES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TO INNATE IMMUNITY

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a microorganism that inhabits skin and mucous membranes of humans in a commensal form, but it can be associated with hospital and community acquired infections. Innate immunity is the first defense system of an organism, both animal and human. This microorganism is involved in the production of several virulence factors that aims to evasion innate immune system, as factors preventing the recognition and binding of pathogens by neutrophils, factors that provide protection against microbicidal substances of phagocytes. In addition, the

microorganism is capable of secreting various cytotoxic molecules that have the ability to cause injury to the immune cells. Thus, on the relevance of the theme proposed to conduct a review of literature on the strategies of evasion of *S. aureus* to innate immunity in order to report the advances of science in this specific subject, the status of art, besides focusing on parallel, the cell evasion mechanisms.

KEYWORDS: Immune system, pathogen, virulence factors.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria que vive como comensal da pele e outros sítios anatômicos de humanos e animais. Pode estar associado a infecções em hospedeiros de forma localizada ou sistêmica, sendo considerado um importante patógeno tanto para a medicina humana, quanto para a veterinária, já que infecções recorrentes são comuns, e também devido a alta resistência a antimicrobianos.

O microrganismo pode existir como um comensal do organismo humano, integrando a microbiota da pele, de membranas mucosas e de outros sítios anatômicos (ROOIJAKKERS et al., 2005; SANTOS et al., 2007). Também pode ser encontrado nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Segundo KIM et al., (2012), 20 a 30% da população humana alberga o micro-organismo na pele e vias aéreas. Para FOSTER (2009), os hospedeiros colonizados pelo *S. aureus* nas vias respiratórias de forma assintomática são os principais reservatórios do patógeno.

De acordo com RIVAS et al., (2007), isolados de *S. aureus* de animais sintomáticos e de animais que não apresentam sintomatologia clínica são indistinguíveis, evidenciando que o desencadeamento da doença causada pelo microrganismo depende do sistema imunológico do portador.

Na medicina veterinária a mastite bovina, ou inflamação da glândula mamária, é considerada a doença de maior ocorrência e importância econômica na atividade leiteira, acarretando graves prejuízos decorrentes principalmente da diminuição da produção láctea, comprometimento na qualidade do leite e até da perda total da capacidade secretora da glândula mamária (NADER FILHO et al., 2007; KOSKINEN, 2009). Pode ser causada por inúmeros microrganismos, sendo o patógeno *S. aureus* o agente de maior importância, pois é descrito como o microrganismo de maior ocorrência nos rebanhos mundiais e também por ser frequentemente isolado em amostras de leite cru. (NADER FILHO et al., 2007). Este patógeno é causador de mastite do tipo contagiosa, pois é comumente disseminado de vacas infectadas para vacas sadias durante a ordenha (MICHEL et al., 2011).

O sistema imunológico do hospedeiro é a principal defesa do organismo. O sistema imunológico inato é a primeira defesa contra patógenos e substâncias não próprias ao organismo. Estes induzem a ativação do sistema imunológico adquirido, que tem ação específica a determinado tipo de antígeno, além de induzir a produção de células e mecanismos que promovem a memória imunológica.

Entretanto, o conhecimento sobre os mecanismos de invasão celular e de evasão ao sistema imunológico do organismo hospedeiro pelo *S. aureus* faz-se necessário uma vez que este é o primeiro contato de células de defesa contra o microrganismo, sendo importante para impedir o desenvolvimento da doença.

Diante do exposto e considerando a relevância do tema propôs-se realizar uma revisão de literatura sobre as estratégias de evasão de *S. aureus* à imunidade inata com o objetivo de relatar os avanços da ciência neste tema específico, o status

da arte, além de focar, paralelamente, os mecanismos de evasão celular.

REVISÃO DE LITERATURA

Staphylococcus aureus

O gênero *Staphylococcus* spp., “cocos semelhantes a cachos de uvas”, é formado por bactéria esféricas, medindo aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. Ocorre aos pares, sozinhas ou em tétrades. É Gram positivo e não móvel. A parede celular é composta por peptidoglicano e ácido teicóico. As populações são associadas principalmente com a pele, glândulas da pele e membranas mucosas de animais de sangue quente. Algumas espécies são patógenos oportunistas de humanos e animais. Alguns microrganismos podem ser isolados de vários produtos de origem animal, tais como carne, leite e derivados, e fontes ambientais, como ar, poeira e água. (SNEATH et al., 1986).

A identificação da espécie pode ser feita com base na variedade das características fenotípicas, incluindo composição da parede celular, morfologia da colônia, atividade e propriedades moleculares de enzimas, produção de ácido de carboidratos, produtos do metabolismo da glicose, resistência a certos antibióticos, requerimentos nutricionais e gás oxigênio, composição dos ácidos graxos celulares, sistema de transporte de elétrons e susceptibilidade a certos fagos (SNEATH et al., 1986).

Staphylococcus aureus, pertencente ao gênero *Staphylococcus* spp, é uma bactéria esférica do grupo de cocos Gram positivos, imóvel e não esporulado. Pode ser aeróbio ou microaerófilo, quando sobrevive em baixas concentrações de oxigênio. Produz a enzima catalase, que permite degradar o peróxido de hidrogênio, composto tóxico, em gás carbônico e água (ROOIJAKKERS et al., 2005; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007). Cresce em meios comuns, como ágar e caldo simples, em pH 7 e temperatura ótima de 37°C. Possui a capacidade de fermentar lentamente muitos carboidratos, produzindo ácido láctico, mas não gás. O ágar manitol-sal é seletivo para a espécie, pois o *S. aureus* é capaz de fermentar manitol, produzindo ácido láctico em meio com altas concentrações de sal, podendo suportar até 7,5% de cloreto de sódio (NaCl) (SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007).

S. aureus é associado em agente causador de envenenamento por alimento. Muitas cepas produzem enterotoxinas, que quando ingeridas produzem sintomas de intoxicação alimentar por *S. aureus*. Quando identificado em alimentos processados usualmente sugere-se sanitização deficiente.

A incubação da amostra de alimento em ágar *Baird Parker*, que utiliza a habilidade do patógeno de retirar a gema, por meio de uma lipase fosfolipoproteica que quebra a matriz lipídica da lipovitelina; é um meio diagnóstico para a espécie. Para isolamento de *S. aureus* em amostras clínicas como sangue, pus, fluidos o primeiro isolamento deve ser feito em ágar sangue a 34-37°C por 18 a 24h em condições aeróbicas (Figura 1) (SNEATH et al., 1986).

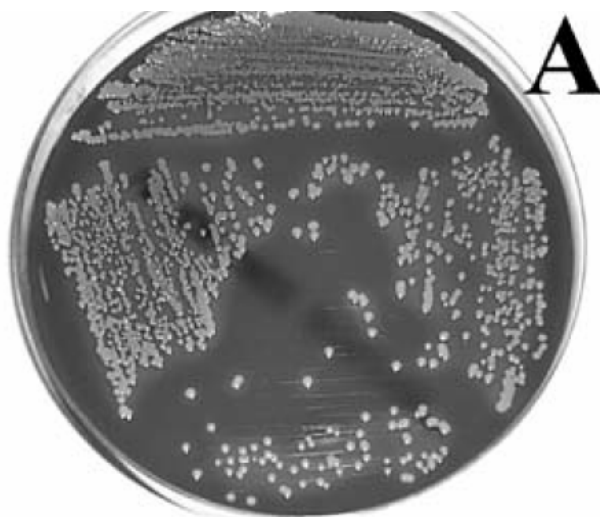


FIGURA 1 – Colônias de *S. aureus* crescidas em ágar sangue (SANTOS et al., 2007)

É um patógeno associado a infecções adquiridas tanto no ambiente da comunidade como no ambiente hospitalar, também chamado nosocomial (FOSTER, 2009; SINHA & FRAUNHOLZ, 2010). O microrganismo pode sobreviver em tecidos e sangue, provocando infecções de simples resolução até casos mais graves da doença (ROOIJAKKERS et al., 2005; SANTOS et al., 2007). Este patógeno, na medicina veterinária também está associado com casos de mastites bovinas, ele é capaz de produzir um vasto número de fatores de virulência, responsáveis por infecções subclínicas e crônicas. A investigação da distribuição e dos fatores de virulência de *S. aureus* fornece informações importantes para estabelecimento de estratégias de controle de infecções (HWANG et al., 2010).

Imunidade Inata

A invasão do organismo hospedeiro pelo patógeno é controlada tanto pela imunidade inata, quanto pela adquirida, sendo que o reconhecimento do microrganismo constitui o primeiro passo da defesa imunológica do hospedeiro. O sistema imune adquirido reconhece os patógenos por meio de receptores de antígenos expressos na superfície de linfócito T e B, porém, esse processo direcionado para a erradicação do micro-organismo pode levar alguns dias, sendo necessários mecanismos iniciais de defesa promovidos pelo sistema imune inato (FOURNIER & PHILPOTT, 2005).

O sistema imunológico inato ou natural (SIN), em decorrência da ativação de seus componentes, impede a entrada de microrganismos e elimina ou limita a multiplicação daqueles capazes de colonizar tecidos do hospedeiro. Sendo assim, a imunidade inata aos microrganismos estimula as respostas imunológicas adquiridas, influenciando na natureza destas para que se tornem eficazes contra os diferentes tipos de patógenos (ABBAS et al., 2008).

Componentes estruturais, celulares e moleculares constituem o SIN, que através de mecanismos efetores podem levar a morte bacteriana de forma rápida e eficiente. Os principais componentes do SIN são: as barreiras físicas e químicas, exemplificadas pelo epitélio e substâncias antimicrobianas epiteliais; células fagocitárias, os neutrófilos e macrófagos, células dendríticas e *natural killer* (NK);

proteínas do sangue, como por exemplo, as frações do sistema complemento e mediadores da inflamação; citocinas e quimiocinas (ABBAS et al., 2008). Os mecanismos efetores são: ativação de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como defensinas, que reconhecem estruturas microbianas e promovem a lise da parede bacteriana; o sistema complemento; e fagócitos, que são capazes de ingerir, matar e digerir bactérias (ROOIJAKKERS et al., 2005).

O reconhecimento de patógeno pelo SIN é considerado a linha de defesa inicial do hospedeiro. Consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos, exemplificados pela produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e imunomoduladoras e ativação de macrófagos e monócitos, que são programados para responder rapidamente a infecções. O SIN possui mecanismos de reconhecimento específicos a estruturas comuns a grupos de microrganismos. Assim, discretas diferenças entre substâncias estranhas não são possíveis de distinção. (FOURNIER & PHILPOTT, 2005; ABBAS et al., 2008).

O reconhecimento de patógeno pelo SIN é projetado para discriminar o próprio do não próprio com um número limitado de moléculas de reconhecimento. Deste modo, a ação da imunidade natural não é limitada a patógenos, sendo possível o reconhecimento de qualquer estrutura estranha ao organismo (ROOIJAKKERS et al., 2005). Os patógenos podem sofrer mutação e, assim, alterar a expressão fenotípica de determinantes de virulência e de reconhecimento pelo hospedeiro. Não obstante, o SIN possui a habilidade de detectar diferentes motivos microbianos usualmente conservados pelas espécies (FOURNIER & PHILPOTT, 2005).

Substâncias presentes na superfície de microrganismos, tais como lipopolissacarídeos (LPS), resíduos de manose e ácidos teicóicos, constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Estes estimulam e ativam a resposta imunológica natural por interação com receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), expressos na superfície de vários tipos celulares, dentre os quais a família dos receptores semelhantes a "Toll" ("toll like receptors", TLRs), e receptores para frações do complemento, citocinas, interleucinas e imunoglobulinas (Figura 2) (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL et al., 2010).

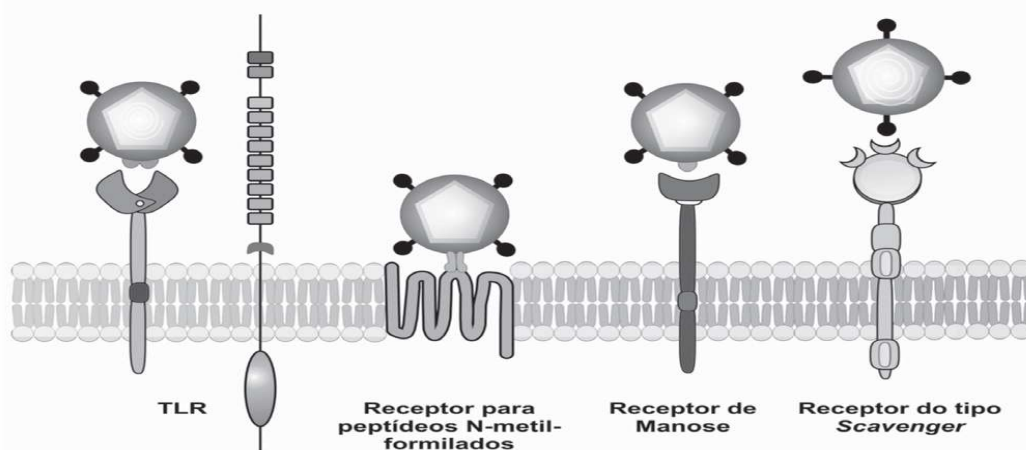


FIGURA 2 - Representação esquemática dos diferentes receptores de reconhecimento de padrões ancorados na membrana celular e seus respectivos ligantes (CRUVINEL et al., 2010).

As funções dos RRP's associados às células são: traduzir sinais que ativam funções antimicrobianas e pró-inflamatórias das células nas quais são expressas e facilitar a captação dos microrganismos para dentro das células permitindo sua eliminação (ABBAS et al., 2008). Além disso, também estão envolvidos em opsonização, processo nos quais fatores no plasma imune estimulam a fagocitose de bactérias cobrindo-as; e ativação do complemento e fagocitose (CRUVINEL et al., 2010).

Embora os RRP's sejam importantes para a detecção de microrganismos por fagócitos, a eficiência de fagocitose (absorção ou ingestão) é aumentada pela opsonização de bactérias por proteínas séricas do hospedeiro, tais como componentes do sistema complemento e anticorpos. Microrganismos opsonizados por moléculas derivadas do sistema complemento estão vinculados a receptores de superfície de células polimorfonucleadas (PMN), incluindo C1qR, CD35 (CR1), CD11b/CD18 (CR3) e CD11c/CD18 (CR4). Os microrganismos revestidos com anticorpos são reconhecidos pelas regiões Fc de PMNs, ou seja, CD16 (FcγRIIIb, receptor de IgG), CD23 (FcεRI, receptor de IgE), CD32 (FcγRIIa, receptor de IgG), CD64 (FcγRI, receptor de IgG), e CD89 (FcαR, receptor de IgA) (DELEO et al., 2009).

Os membros da família TLR são expressos nas membranas de células do sistema imunológico inato (células dendríticas, macrófagos, células *natural killers*), células do sistema imune adquirido (linfócitos T e B) e células não imunes (células epiteliais e endoteliais). O reconhecimento de PAMPs por TLRs ocorre em diversos compartimentos celulares. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos a superfície da célula, ao passo que TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em vesículas intracelulares tais como endossomas e no retículo endoplasmático (PIETROCOLA et al., 2011).

O receptor TLR2 está envolvido no reconhecimento de uma ampla variedade de PAMPs derivados de bactérias, parasitas, fungos e vírus. Esta versatilidade elevada de reconhecimento de ligante por TLR2 é, possivelmente, devido à capacidade de TLR2 formar heterodímeros com TLR1 ou TLR6. TLR2 também é capaz de agir em conjunto com outros co-receptores de superfície celular que auxiliam no reconhecimento de PAMP. Estes incluem a classe de receptor *scavenger* II CD36, que atua em conjunto com o heterodímero TLR2-TLR6 para mediar fagocitose e produção de citocinas em resposta a *S. aureus* e os seus componentes da parede celular (PIETROCOLA et al., 2011).

Os receptores semelhantes à NOD (nod like receptors, NLRs) são RRP's localizados no citoplasma da célula ao invés da membrana plasmática. Estas proteínas servem para detectar componentes microbianos intracelulares e responder de forma semelhante a outros RRP's por indução as cascatas de sinalização envolvidas na mediação da resposta inflamatória e função dos neutrófilos (RIGBY & DELEO, 2012).

As colectinas, da família de lectinas tipo-C segregadas e solúveis, como as lectinas de ligação a manose (MBL), outro tipo de RRP's, se ligam e reconhecem porções de carboidratos sobre a superfície de microrganismos invasores. Tais moléculas aumentam o reconhecimento por receptores de superfície de neutrófilos (opsonização através da via de ativação do complemento da lectina), ativam outros RRP's e facilitam a fagocitose, promovendo a liberação de citocinas e produção de espécies de oxigênio reativo (ROS). A proteína de reconhecimento de

peptidoglicanos (PGRP) é uma proteína secretada pelo hospedeiro que se liga ao peptidoglicano de bactérias Gram positivas. O PGRP curto, produzido por neutrófilos, contribui diretamente para a atividade bactericida ao invés de direcionar a sinalização (RIGBY & DELEO, 2012).

Embora muitos RRP's aumentem a ligação e reconhecimento de micro-organismo, há pouca evidência demonstrando que estes receptores induzem diretamente a fagocitose, o que sugere que RRP's podem atuar como co-receptores. A ação combinada de RRP's e receptores aos componentes do complemento e do anticorpo maximiza o reconhecimento à fagocitose de microrganismos invasores (RIGBY & DELEO, 2012).

Recrutamento neutrofílico e fagocitose

A primeira etapa para a eliminação de um microrganismo invasor é o recrutamento de células PMNs para o sítio de infecção por quimiotaxia. Este é um processo com múltiplas etapas que mobiliza os neutrófilos da corrente sanguínea ou da medula óssea em resposta aos fatores de quimiotaxia, derivados da interação hospedeiro-patógeno. Moléculas do hospedeiro, como interleucina 8 (IL-8), proteína quimiotática de granulócito 2 (GCP-2), componentes do complemento, C3a e C5a, bem como formil-peptídeos secretados devido ao crescimento bacteriano recrutam neutrófilos para o sítio de infecção (DELEO et al., 2009; FOSTER, 2009).

Em resposta ao dano ou à presença de agentes patogênicos invasores, uma série de células hospedeiras, tais como monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e epiteliais, produzem e secretam potentes mediadores inflamatórios e proteínas quimioatrativas para neutrófilos. Estes mediadores incluem IL-8, GCP-2 e leucotrieno B4 (LTB4), entre outros, que se ligam e envolvem receptores específicos de superfície de neutrófilos. Estes sinais direcionam o recrutamento quimiotático de neutrófilos para fora da circulação intravascular em direção aos sítios de lesão ou infecção dentro dos tecidos, o que resulta em um afluxo rápido e acúmulo dessas células (RIGBY & DELEO, 2012).

Em locais de infecção, os macrófagos que encontraram microrganismos produzem citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), e interleucina1 (IL-1), que ativam as células endoteliais de vênulas vizinhas a produzirem selectinas, ligantes de integrinas e quimiocinas. As selectinas medeiam a adesão fraca e rolagem dos leucócitos sanguíneos, neutrófilos, sobre o endotélio; as integrinas medeiam a adesão firme dos neutrófilos; as quimiocinas aumentam a afinidade das integrinas aos neutrófilos e estimulam a migração das células através do endotélio para o local da infecção. Os neutrófilos, monócitos e linfócitos T sanguíneos ativados utilizam essencialmente os mesmos mecanismos para migrar para os locais de infecção (ABBAS et al., 2008).

As células endoteliais ativadas expressam altos níveis de moléculas de adesão da família das selectinas, molécula de adesão intercelular1 (ICAM-1) e molécula de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1). A ativação endotelial é ocasionada por subprodutos de microrganismos, citocinas (IL-1, TNF- α), componentes ativados do sistema complemento, fatores da coagulação, histamina e leucotrieno B4 (FOSTER, 2009; CRUVINEL et al., 2010).

As selectinas são glicoproteínas presentes em leucócitos (L-selectina), endotélio (E-selectina e P-selectina) e plaquetas (P-selectina), que se ligam a moléculas glicosiladas presentes na superfície de outras células e, em geral,

medeiam adesão de baixa afinidade entre leucócitos e endotélio. Apesar da baixa afinidade, essa interação é suficiente para atrair os leucócitos para a periferia e promover contato com o endotélio (FOSTER, 2009; CRUVINEL et al., 2010).

Neutrófilos circulantes rolam pelas paredes de vênulas, por interações com as células endoteliais ativadas, a procura de sinais, quimioatraentes derivados do hospedeiro ou patógeno; de dano tecidual, inflamação ou microrganismos invasores (Figura 3). Esses sinais direcionam o movimento quimiotático de neutrófilos para fora da circulação intravascular, para os sítios de dano ou infecção em tecidos, resultando em um rápido influxo e acumulação de neutrófilos (RIGBY & DELEO, 2012).

Fagocitose é um processo em que neutrófilos se ligam e ingerem microrganismos invasores (Figura 3). É um passo crítico na remoção de bactérias durante a infecção. PMN reconhecem muitas moléculas de superfície ligadas ou livremente secretadas por bactérias, incluindo peptidoglicano (PGN), lipoproteínas, ácido lipoteicóico (LTA), lipopolissacarídeo (LPS). Estas moléculas conservadas, os PAMPs, interagem com os RRP's expressos na superfície de células de neutrófilos, incluindo TLRs, colectinas entre outros. As vias de transdução de sinal ativadas por TLRs de neutrófilos que prolongam a sobrevivência celular promovem e melhoram a adesão, fagocitose, liberação de citocinas, quimiocinas e produção de ROS, além de desencadear a exocitose de grânulos, contribuindo assim para a atividade microbicida (DELEO et al., 2009; RIGBY & DELEO, 2012).

O fagossoma, oriundo do processo de fagocitose, serve para restringir fontes de nutrientes e fornecer aos neutrófilos um compartimento isolado repleto de agentes microbicida tóxicos. A maturação fagossomal é um processo gradual que envolve fusão de vesículas secretoras, denominados lisossomas, de neutrófilos e grânulos com o fagossoma, dando origem ao fagolisossomo, o que serve para modificar a composição da membrana fagosomal, e conteúdo e o meio ambiente do lúmen. Este processo também enriquece o fagossoma com componentes transmembrana de NADPH oxidase (RIGBY & DELEO, 2012).

Neutrófilos empregam inúmeras estratégias a fim de destruir microrganismos invasores. A ativação de neutrófilos está intimamente relacionada com a produção de superóxidos e outros derivados de ROS através de um processo conhecido por queima 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. Esses produtos gerados secundariamente são microbicidas eficazes. Assim, a produção de ROS derivado de NADPH-oxidase é fundamental para a defesa do hospedeiro contra micro-organismos invasores (DELEO et al., 2009; RIGBY & DELEO, 2012).

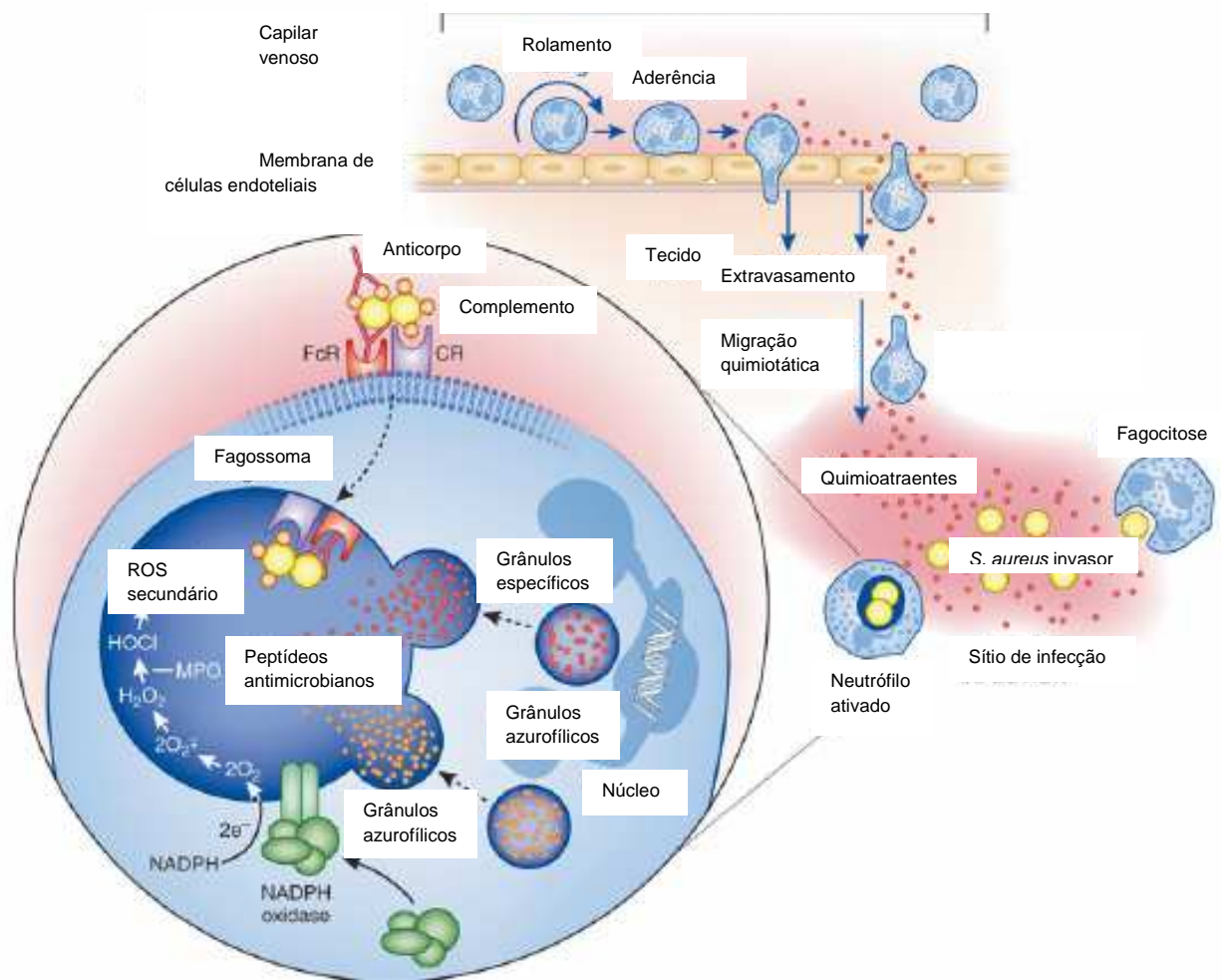


FIGURA 3 – Migração neutrofílica do espaço vascular para o sítio de infecção seguido pela fagocitose e morte microbiana
 Fonte: RIGBY & DELEO, 2012

Concomitante com a produção de ROS ocorre a fusão de grânulos antimicrobianos citoplasmáticos a fagossomas contendo o microrganismo. Grânulos azurófilos degranulados no lúmen do fagossoma enriquecem este vacúolo com peptídeos antimicrobianos (AMPs) e proteínas antimicrobianas, como α -defensinas, catepsinas, elastase. A degranulação também enriquece os fagossomas com componentes específicos, como a lactoferrina, aumentando assim, o potencial antimicrobiano. A degranulação de AMPs no fagossoma, em combinação com ROS, cria um ambiente pouco propício para a sobrevivência do patógeno ingerido (DELEO et al., 2009; RIGBY & DELEO, 2012).

As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), compostas por grânulos azurófilos e componentes nucleares, como cromatina e histonas, são capazes de induzir a morte bacteriana, além de anular fatores de virulência de bactérias extracelulares. Atuam diretamente sobre os microrganismos e servem como barreira física para impedir sua disseminação (DELEO et al., 2009; CRUVINEL et al., 2010). Não se sabe ainda se esses produtos são produzidos por células vivas ou se são subprodutos de lise neutrofílica (DELEO et al., 2009).

O processo de fagocitose de neutrófilos provoca a síntese de uma série

de fatores imunomoduladores, favorecendo o recrutamento de neutrófilos adicionais e modulando a subsequente resposta de neutrófilos, além de coordenar respostas iniciais de outros tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Adicionalmente, o processo de fagocitose acelera a morte celular programada (apoptose) de neutrófilos, um processo conhecido como morte celular induzida por fagocitose (PICD). O fenômeno de PICD é considerado um estágio final de diferenciação de neutrófilos para as células ativadas e é crucial para a resolução da resposta inflamatória (RIGBY & DELEO, 2012).

Os monócitos e macrófagos são fagócitos eficientes de patógenos e debris celulares. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos podem permanecer no tecido por meses ou anos. Além de seu papel na imunidade inata, atuam como células apresentadoras de antígeno (APCs), processando e apresentando antígenos via moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), potencializando a resposta mediada por linfócitos T e B, e também pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas. Também produzem ROS, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (NO). O NO é produzido pela sintetase do óxido nítrico induzível, iNOS, ausente em macrófagos em repouso, mas induzida por ativação de TLRs em resposta a PAMPs (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL et al., 2010).

Sistema Complemento

O Sistema Complemento (SC) é constituído por uma família de proteínas plasmáticas que possuem importante papel nas imunidades natural e adquirida. São proteínas que, na presença do microrganismo, adquirem atividade proteolítica, ativando os elementos em cascatas, para que ocorra a destruição do patógeno pela produção de mediadores que irão alterar a permeabilidade vascular contribuindo para o desenvolvimento da resposta inflamatória (FOSTER, 2009; CRUVINEL et al., 2010). Um dos principais propósitos da fixação do complemento é a opsonização, importante para promover fagocitose pelo neutrófilo e macrófago (ABBAS et al., 2008).

A ativação do SC envolve a proteólise sequencial de proteínas para gerar complexos recém-agrupados com atividade proteolítica, ou seja, uma cascata enzimática proteolítica, capaz de produzir uma grande amplificação de moléculas de enzimas ativadas. Na fase fluida, as proteínas do complemento encontram-se inativadas, sendo que a ativação de forma estável ocorre após a ligação das proteínas do complemento à superfície do microrganismo ou aos anticorpos, dependendo da via de ativação. A ação do SC é inibida por proteínas reguladoras presentes nas células do hospedeiro, e consiste de uma adaptação das células normais que minimiza o dano mediado por complemento às células do hospedeiro (ABBAS et al., 2008).

Existem três vias de ativação do complemento, a via clássica, componente da imunidade humoral adquirida; via alternativa e via da lectina, ambos os mecanismos efetores da imunidade natural (ABBAS et al., 2008; FOSTER, 2009). A via clássica é ativada por isótopos de anticorpos ligados aos antígenos, os imunocomplexos, a via alternativa é ativada pela presença do microrganismo, a qual as proteínas do SC, proteína C reativa e outras, se ligam às superfícies das células microbianas na ausência de anticorpos; e a via da lectina é ativada por uma lectina

plasmática que se liga aos resíduos de manose presentes nos microrganismos (Figura 4) (FOSTER, 2009; CRUVINEL et al., 2010). As três vias diferem entre si pelo modo de reconhecimento, mas todas convergem para uma mesma etapa central: a clivagem da proteína C3, a proteína mais abundante do SC (ROOIJAKKERS et al., 2005).

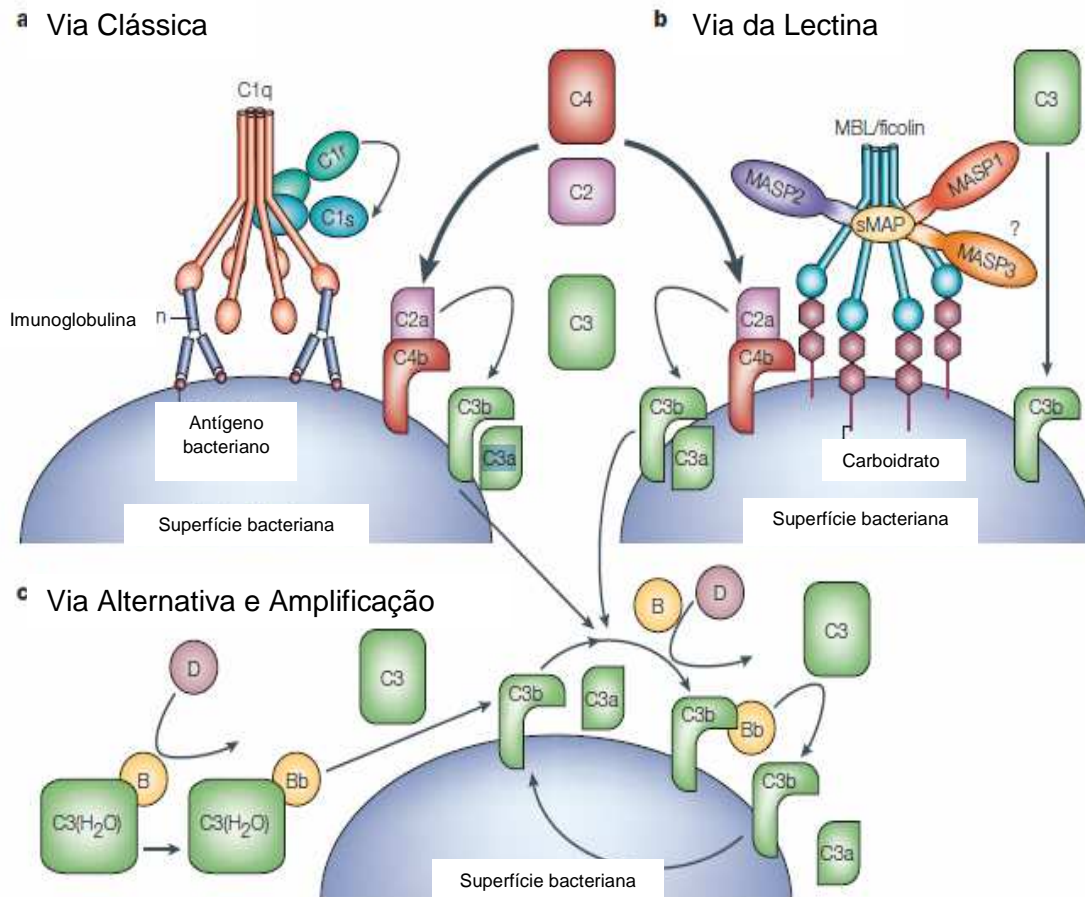


FIGURA 4 – Vias de ativação do complemento. A. Via clássica. B. Via da lectina. C. Via alternativa e amplificação
 Fonte: FOSTER, 2005

A via alternativa do SC se inicia com a quebra espontânea do complemento C3, gerando dois produtos, C3b e C3a. O produto C3b se liga de forma estável às superfícies microbianas, já o C3a é liberado e atua como quimioquina para o recrutamento de neutrófilos. A proteína C3 contém uma ponte tioéster reativa. Assim, quando a C3 é clivada, a proteína C3b sofre uma alteração conformacional e o domínio tioéster se abre, expondo a ponte tioéster reativa previamente oculta, permitindo sua ligação covalente com a superfície dos microrganismos invasores. A alteração conformacional pós-clivagem, causa a expulsão do domínio tioéster, um local de ligação para uma proteína plasmática chamada fator B. Este fator é também exposto na proteína C3b, agora covalentemente presa à superfície de uma célula microbiana ou hospedeira. O fator B é clivado por protease sérica plasmática denominada fator D liberando os fragmento Ba e Bb, e Bb permanece ligado ao C3b (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL

et al., 2010).

O complexo C3bBb é a C3 convertase da via alternativa, e tem a função de clivar mais moléculas de C3, montando assim uma sequência de amplificação. Mesmo quando o C3b é gerado pela via clássica, ele pode formar um complexo com Bb e este complexo é capaz de clivar mais C3. Algumas moléculas de C3b geradas podem se ligar à C3 convertase da via alternativa e formar um complexo que contenha uma molécula Bb e duas moléculas de C3b. Assim, a C3 convertase da via alternativa atua para amplificar a ativação do complemento quando ela é iniciada pelas vias alternativa, clássica ou da lectina (ABBAS et al., 2008). O resultado dessa ligação funciona como a C5 convertase da via alternativa, importante para clivar o componente C5 e iniciar as etapas tardias da ativação do complemento (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL et al., 2010).

A ativação estável da via alternativa ocorre apenas na superfície de células microbianas. Se o complexo C3bBb for formado em células de mamíferos, este é degradado e a reação é terminada pela ação de proteínas reguladoras. A properdina, proteína da via alternativa é um regulador positivo do complemento, pois, pode se ligar e estabilizar o complexo C3bBb na superfície das células microbianas (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL et al., 2010).

A via clássica de ativação do SC é iniciada pela ligação da proteína C1 do complemento, complexo proteico multimérico composto de subunidades C1q, C1s e C1r; às moléculas IgG ou IgM complexadas ao antígeno-alvo. A subunidade C1q tem uma estrutura hexamérica e tem como função o reconhecimento da molécula de anticorpo e a ligação às regiões Fc das cadeias pesadas. Cada região Fc da imunoglobulina (Ig) possui um único local de ligação a C1q, e cada molécula C1q deve se ligar a duas cadeias pesadas de Ig para ser ativada (ABBAS et al., 2008).

A ligação de C1q às regiões Fc dos anticorpos dos imunocomplexos ativa C1r, a qual cliva e ativa C1s. Após esta ativação, C1s cliva a proteína C4, que gera C4b. Assim como C3b, o C4b possui uma ponte interna de tioéster que forma ligações covalentes com o complexo antígeno-anticorpo e com a superfície adjacente de uma célula à qual o anticorpo está ligado. A molécula C1s, após a clivagem de C4 e formação de seus subprodutos, promove a clivagem da proteína C2 que está complexada com C4b, gerando os fragmentos C2b, solúvel, e C2a, que permanece fisicamente associado ao C4b na superfície celular (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL et al., 2010).

O complexo C4bC2a resultante é a protease C3 convertase da via clássica, que tem como função a clivagem de C3 e a geração dos fragmentos C3a e C3b, este capaz de formar pontes covalentes com as superfícies celulares ou com os anticorpos nos quais a ativação do complemento foi iniciada. As moléculas de C3b podem se ligar a C3 convertase da via clássica, formando um complexo C4bC2aC3b, dando origem a C5 convertase da via clássica, que cliva C5 e dá início às últimas etapas da ativação do complemento; ou após sua deposição na superfície celular, pode se ligar ao fator B e formar a C3 convertase da via alternativa (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL et al., 2010).

A via da lectina é ativada na ausência de anticorpo, tendo início pelo reconhecimento de manose na superfície de microrganismos, pela ligação de polissacarídeos microbianos a lectinas circulante, tais como a lectina de ligação a manose plasmática (MBL), ou a lectinas que reconhecem N-acetilglicosamina, as ficolinas. Essas lectinas se ligam a serinas proteases associadas à MBL (MASPs), como MASP-1, MASP-2 e MASP-3, mas apenas as duas últimas se associam a

MBL. A ativação dessas proteases resulta na quebra dos componentes C2 e C4 do SC, semelhante ao que ocorre na via clássica pela ativação das proteases C1r e C1s. Ocorre então a formação de C3 convertase (C4bC2a), semelhante a formada na via clássica. A C3 convertase cliva C3 em C3a solúvel e C3b, que, por sua vez, se liga a C4bC2a na superfície do microrganismo e forma a C5 convertase, que cliva a proteína C5, dando sequência à ativação do complemento (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL et al., 2010).

A C5 convertase, gerada por uma das três vias de ativação do complemento, quebra a proteína C5 em dois fragmentos, o C5a, que é liberado e possui efeitos biológicos em várias células, e o C5b, que permanece ligado às proteínas do complemento depositadas na superfície celular. A ligação do componente C5b à superfície do patógeno dá início à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) pela ligação sucessiva dos componentes da cascata do complemento C6, C7, C8 e C9. O componente C7 do componente C5bC6C7 é hidrofóbico e se insere na bicamada lipídica das membranas celulares, tornando-se um receptor de alta afinidade para uma molécula de C8. A formação de um MAC ativo ocorre com a polimerização do C9 atravessando a bicamada lipídica formando poros nas membranas plasmáticas. Esses poros permitem o livre movimento de água e íons, promovendo lise osmótica do agente infeccioso (ABBAS et al., 2008; CRUVINEL et al., 2010).

A ativação da cascata do complemento resulta na liberação de fragmentos com efeitos biológicos importantes. Os componentes C3b e C4b atuam como opsoninas intensificando o processo de fagocitose. A clivagem de C5 e C3 promove a liberação das anafilotoxinas C3a e C5a, que recrutam e ativam fagócitos para o sítio de infecção, além de estimular a motilidade e adesão dos neutrófilos ao foco inflamatório. Os componentes C2a e C4a estão relacionados à ativação a mudanças na permeabilidade vascular (ROOIJAKKERS et al., 2005; BLOM et al., 2009; CRUVINEL et al., 2010).

A cascata de ativação do complemento e a estabilidade de suas proteínas ativas são reguladas por proteínas solúveis circulantes ou acopladas à membrana celular. Esse mecanismo evita a ativação do complemento em células normais do próprio organismo, impede que, nos momentos de intensa ativação, ocorra deposição dos complexos gerados sobre as células autólogas e limita a duração da ativação do complemento mesmo em células microbianas e em complexos antígeno-anticorpo (ABBAS et al., 2008, CRUVINEL et al., 2010).

A atividade proteolítica de C1r e C1s é inibida por uma proteína plasmática, o inibidor de C1 (C1 INH), que se liga aos componentes C1r e C1s ocasionando a dissociação destas proteases a C1q, paralisando assim a ativação da via clássica. O fator I, na presença de proteínas reguladoras, tais como fator H, proteína ligadora de C4 (C4BP), proteína cofator de membrana (MCP CD46), ou receptor do complemento tipo 1 (CR1), atua como uma protease plasmática que degrada o componente C3b associado à célula gerando fragmentos denominados iC3b, C3d e C3g, os quais não participam da ativação do complemento, mas podem ser reconhecidos por receptores nos fagócitos e linfócitos B (ABBAS et al., 2008).

O Fator acelerador da degradação (DAF), juntamente com CR1 e a C4BP, são responsáveis pela dissociação da C3 convertase, através da ligação a C3b ou C4b, essas proteínas inibem competitivamente a ligação de outros componentes da C3 convertase, como Bb ou C2a, bloqueando assim a progressão adicional da cascata do complemento. O fator H é um inibidor específico para a via

alternativa, pois impede a ligação de Bb a C3b. Tais reguladores são produzidos apenas por células de mamíferos, desse modo, inibem seletivamente a cascata de ativação do complemento nas células do hospedeiro, permitindo que a ativação do complemento prossiga nas células microbianas (ABBAS et al., 2008).

A formação do MAC é inibida por uma proteína de membrana chamada CD59, que atua incorporando a si mesma dentro de MACs agrupadas após a inserção de C5b-8 na membrana, impedindo a adição subsequente de C9. Assim como as outras proteínas reguladoras, a CD59 está presente nas células normais do hospedeiro (ABBAS et al., 2008).

Mecanismos de evasão de *S. aureus*

Leucócitos polimorfonucleares (PMN ou neutrófilos) são fundamentais para a defesa do hospedeiro contra a invasão de bactérias. A resposta inflamatória aguda à infecção é caracterizada pelo rápido recrutamento de neutrófilos após a ingestão de microrganismos. PMNs geram espécies reativas de oxigênio (ROS) e fagossomas enriquecidos com proteínas microbicidas. Coletivamente, estes processos antimicrobianos são altamente eficazes em eliminar a maioria das bactérias invasoras. Por outro lado, agentes patogênicos, tais como *S. aureus* moderam e/ou contornam esses processos causando doença (KOBAYASHI et al., 2012).

Os mecanismos utilizados por patógenos bacterianos para evadir a defesa do sistema imune inato estão relacionados à resistência a peptídeos antimicrobianos (AMPs) e à morte fagocitária por leucócitos (DELEO et al., 2009). Na medida em que os neutrófilos são a principal defesa celular contra infecções por *S. aureus*, o aumento da sobrevivência de isolados multirresistentes a antibióticos após a absorção por PMNs pode estar ligada à capacidade destas cepas em causar uma lise celular após a fagocitose. Assim, a lise de neutrófilos após a fagocitose é um processo potencialmente importante na patogênese da infecção por *S. aureus* multirresistentes (KOBAYASHI et al., 2012).

Embora o *S. aureus* seja geralmente classificado como um patógeno extracelular, dados revelaram a sua capacidade de infectar vários tipos de células hospedeiras, tanto fagócitos profissionais quanto células não fagocíticas, como as células endoteliais, fibroblastos e outros. Após a fagocitose, *S. aureus* pode induzir a apoptose da célula hospedeira e sobreviver durante vários dias, intracelularmente, no citoplasma, o que se sugere ser um ambiente desprovido de mecanismos efetores anti-*Staphylococcus*. Com efeito, os agentes são equipados com uma grande variedade de fatores de virulência para neutralizar os mecanismos de defesa do hospedeiro (DAS & BISHAYI, 2009).

A infecção intracelular persistente de *S. aureus* pode estar relacionada com a internalização do patógeno pelas células hospedeiras, criando assim um ambiente favorável, onde as bactérias são protegidas contra as defesas do hospedeiro e da terapia antimicrobiana (DAS & BISHAYI, 2009). *S. aureus* produz numerosas moléculas de superfície e toxinas secretadas que têm potencial para alterar ou inibir a função de células da imunidade inata (GRAVES et al., 2010). *S. aureus* é exclusivamente programado para comprometer a eficácia dos componentes de defesa inata pela secreção de proteínas que inibem a deposição ou ativação do complemento, bem como a quimiotaxia de leucócitos PMNs (neutrófilos). Outros polipeptídios excretados exibem atividades líticas para neutrófilos, a principal

linha de defesa contra infecções por *S. aureus* (KIM et al., 2012).

Além do grande repertório de supostos fatores de evasão do sistema imunológico, a significativa similaridade de função entre muitos desses fatores sugere que nenhuma molécula pode exclusivamente explicar a capacidade do *S. aureus* de causar a doença humana. Por exemplo, o *S. aureus* tem capacidade de sequestrar anticorpos do hospedeiro, promover a resistência a peptídeos antimicrobianos ou espécies reativas de oxigênio (ROS) e causar lise da célula hospedeira (GRAVES et al., 2010).

Recrutamento neutrofílico, fagocitose e células da imunidade inata

S. aureus é envolvido na produção de diversos fatores com o objetivo de evasão do sistema imune inato, incluindo estratégias de defesa do hospedeiro utilizadas por neutrófilos. Fatores de *S. aureus* caracterizados até o momento incluem aqueles que impedem o reconhecimento e ligação do patógeno por neutrófilos, assim como aquelas que fornecem proteção contra substâncias microbicidas de fagócitos. Em adição aos mecanismos de defesa passivos, *S. aureus* secreta várias moléculas citotóxicas que têm a habilidade de causar injúria às células imunes. O patógeno tenta minimizar ou inibir o reconhecimento do hospedeiro pela ocultação e/ou modificação da superfície bacteriana, possível a partir da produção de exopolímeros como polissacarídeo capsular, formando a cápsula bacteriana, e/ou adesão intracelular de polissacarídeo, um componente único de biofilme de matriz extracelular que serve para modificar a típica carga negativa da superfície bacteriana (RIGBY & DELEO, 2012).

A migração de leucócitos é um evento chave na defesa do hospedeiro contra patógenos invasores (ROOIJAKKERS et al., 2005). Diversas proteínas produzidas pelo *S. aureus* interferem com este aspecto no sistema imunológico inato. A proteína semelhante ao super antígeno de *Staphylococcus* 5 (SSL5) é expressa por um gene da família SSL localizado na ilha patogênica 2. SSL5, especificamente, se liga a prostaglandina 1 (PSGL-1) e inibe a ligação a P-selectina *in vitro*, prevenindo o rolamento neutrofílico em células endoteliais ativadas. SSL 5 e SSL 11 tem alta afinidade a cadeia que é importante determinante do ligamento de PSGL-1 a P-selectina (Figura 5). SSL5 tem potencial para parar o 1º passo do recrutamento neutrofílico *in vivo* (FOSTER, 2009).

A proteína A estafilocócica (SpA), se liga às regiões Fc de IgG e adquire a habilidade de cobrir a superfície bacteriana com anticorpos não-específicos (na orientação errada), fornecendo disfarce imunológico e potencialmente interrompendo a opsonização e a captação fagocitária (RIGBY & DELEO, 2012).

A proteína estafilocócica inibidora de quimiotaxia (CHIPS), secretada por 60% das cepas de *S. aureus*, bloqueia o reconhecimento mediado pelo receptor de N-formil peptídeos, produzidos pela bactéria. Bloqueia também a captação mediada pelo complemento, pela capacidade de se ligar aos receptores neutrofílicos de formil-peptídeo (FPR) e da fração C5a do complemento (C5aR), respectivamente, impedindo, assim, a ligação das moléculas agonistas a esses receptores (Figura 5) (FOSTER, 2005; RIGBY & DELEO, 2012). Apesar dos numerosos mecanismos empregados por *S. aureus* para inibir a ligação e fagocitose por neutrófilos, esses fagócitos rapidamente capturam o patógeno (RIGBY & DELEO, 2012).

A proteína de aderência extracelular (Eap) de *S. aureus*, também conhecida como proteína análoga ao complexo maior de histocompatibilidade classe

II (MAP), inibe a quimiotaxia leucocitária devido a sua interação com proteínas do hospedeiro (FOSTER, 2005; ROOIJAKKERS et al., 2005). Eap se liga às moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) na superfície das células endoteliais bloqueando a ligação destas com os antígenos associados a linfócitos (LFA-1) na superfície de neutrófilos, prevenindo, assim, a adesão leucocitária, transmigração dos neutrófilos pelas células endoteliais, a diapedese, e extravasamento dos neutrófilos (Figura 5) (FOSTER, 2005; FOSTER, 2009). A proteína Eap, em experimentos *in vitro*, provoca o rompimento de mediadores da adesão leucocitária, como b(2) integrina e uroquinase (ROOIJAKKERS et al., 2005).

A migração do neutrófilo da corrente sanguínea para o local da infecção, por diapedese, envolve a ativação de vários receptores transmembranas acoplados de proteína G (GPCRs) pela ligação a quimiocinas. C5aR e FPR pertencem à família dos GPCRs. Embora os ligantes dos GPCRs sejam altamente específicos, *S. aureus* sintetiza várias proteínas que bloqueiam estes receptores e inibem a ativação e migração leucocitária (ROOIJAKKERS et al., 2005; FOSTER, 2009). A proteína Eap atua em concordância com CHIPS para inibir o recrutamento neutrófilo para o local da infecção (Figura 5) (FOSTER, 2005).

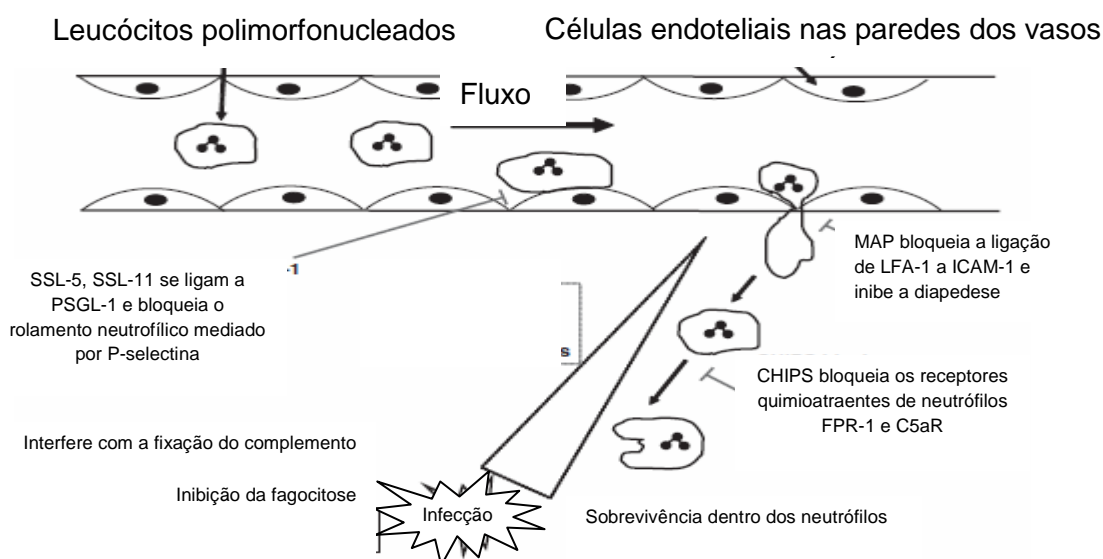


FIGURA 5 – Inibição da migração neutrófilica por *S. aureus* (FOSTER, 2009)

Sistema Complemento

A habilidade de evitar ou prevenir a morte pelo complemento, pela ligação de inibidores do sistema complemento em bactérias Gram-negativas, ou pela inibição da opsonização e morte fagocitária em bactérias Gram-positivas, é um importante determinante na patogenicidade de um microrganismo (BLOM et al., 2009). É reconhecido que bactérias *S. aureus* expressam muitos mecanismos distintos para interferir com a ação do sistema complemento, como a inativação ou sequestro de elementos chaves, e isso é crucial para o sucesso desse patógeno (FOSTER, 2009).

Em bactérias patogênicas, como *S. aureus*, o papel do sistema complemento é recrutar moléculas efetoras que marcam células e as tornam alvos para destruição por células fagocíticas do sistema imunológico, como neutrófilos

(FOSTER, 2005). Sendo assim, a formação da enzima C3 convertase na superfície da célula microbiana é um pré-requisito para o início da ação do sistema complemento. Esta enzima possui a função de clivar o componente C3, liberando a quimiocina C3a e promover a ligação da opsonina C3b na superfície da célula bacteriana (FOSTER, 2009).

Em se tratando de inibir a via clássica ou da lectina muitos microrganismos desenvolveram a habilidade de se ligarem a proteína C4BP, que é a chave de inibição da fase fluida dessas vias. A proteção contra a via alternativa é provida pela captura do maior inibidor desta via, o fator H (FH) e suas proteínas, enquanto que o MAC pode ser inibido pela proteína vitronectina (BLOM et al., 2009).

S. aureus expressa e secreta várias proteínas que interferem no sistema complemento e assim protegem a bactéria contra ataques mediados pelo complemento (BLOM et al., 2009). Numerosas estratégias estafilocócicas de evasão do complemento vêm sendo descritas. Na verdade, a maioria das estratégias descritas recentemente sobre evasão estafilocócica é direcionada a esse elemento do sistema imune inato, principalmente à inativação do componente C3 e seus derivados (ROOIJAKKERS et al., 2005).

A bactéria *S. aureus* é capaz de produzir a proteína estafilocócica inibidora do complemento (SCIN), considerada o mais eficiente inibidor do complemento (ROOIJAKKERS et al., 2005; BLOM et al., 2009; FOSTER et al., 2009). SCIN é uma proteína excretada que bloqueia todas as vias do complemento, a da lectina, clássica e alternativa, através de sua ação específica na ligação de superfície da C3 convertase. Assim, SCIN previne eficientemente a fagocitose, a morte de *S. aureus* e a produção da quimiocina C5a (ROOIJAKKERS et al., 2005). Essa proteína estabiliza C4bC2a e C3bBb, C3 convertase das vias clássica e da lectina e da via alternativa, respectivamente, resultando na inibição da formação de C3b (FOSTER, 2009).

As duas maiores consequências ocasionadas pela ligação do SCIN à enzima C3 convertase são: a estabilização tanto de C3bBb, bem como de C4bC2a na superfície bacteriana prevenindo a geração de convertases adicionais. Estas enzimas são normalmente instáveis e, quando ativadas, liberam os ligantes C4b e C3b para agirem como cofatores de outras clivagens de C2 e B, possibilitando a amplificação da fixação do complemento. A outra consequência é a ligação de SCIN a C3Bb e C4bC2a impedindo a atividade enzimática das convertases, o que previne a formação de C3b, e inibe a formação da C5 convertase reduzindo a produção de C5a. Como resultado, o inibidor SCIN reduz a fagocitose e morte de *S. aureus* por neutrófilos humanos (ROOIJAKKERS et al., 2005; FOSTER, 2009).

A proteína extracelular de ligação ao fibrinogênio (Efb) também pode se ligar ao domínio C3d do fator C3 do complemento, inibindo a deposição de C3d na superfície de *S. aureus*. A consequência derivada da ligação de Efb a molécula de C3 (Efb-C) é a mudança da conformação global de C3, impedindo a clivagem de C3b e a participação com sucesso na cascata de ativação do complemento, impedindo assim, a formação da C3 convertase da via alternativa ou da C5 convertase das vias alternativa (C3bBbC3b) e das vias clássica e da lectina (C4bC2aC3b) (ROOIJAKKERS et al., 2005; BLOM et al., 2009). Efb também é capaz de se ligar ao fragmento ativado C3b com alta afinidade e induzir alterações conformacionais (BLOM et al., 2009). A consequência é a redução da liberação do quimioatraente C5a e redução no recrutamento neutrofílico (ROOIJAKKERS et al., 2005).

Ehp, outra proteína secretada por *S. aureus*, que apresenta 44% de identidade a Efb, também se liga ao fragmento C3d de C3 sendo capaz de inibir a deposição de C3b em superfícies sensibilizadas pela via alternativa (BLOM et al., 2009).

Em adição, a Efb, a proteína extracelular ligadora de complemento (Ecb), e a SCIN são todas inibidoras de C3b contido na C3 e C5 convertases das três vias. Isso sugere que a ligação dessas proteínas a C3b nas convertases muda a conformação deste complemento e provavelmente afeta a atividade do complexo de protease (BLOM et al., 2009).

A proteína ligadora de imunoglobulina (Sbi) é uma proteína extracelular capaz de inibir a via alternativa do sistema complemento pela interação com o componente C3. Essa proteína provoca o consumo inútil de C3 contribuindo com a redução da eficiência da opsonização. Assim, *S. aureus* tem a habilidade de inativar C3b e moléculas de IgG que estão ligadas à superfície das células bacterianas opsonizadas (BLOM et al., 2009; FOSTER, 2009).

Outra maneira pela qual *S. aureus* impede as funções efetoras de fixação do complemento se dá pela ligação do plasminogênio (PLG) do hospedeiro à superfície bacteriana. Isto é possível devido à estafiloquinase (SAK), proteína ativadora de PLG secretada por muitas cepas de *S. aureus*. Quando PLG se liga à superfície bacteriana estafilocócica, é ativado e transformado em plasmina (PL) pela SAK. Plasminas ligadas a superfície têm a habilidade de clivar IgG e C3b e reduzir a fagocitose por neutrófilos (ROOIJAKKERS et al., 2005; FOSTER, 2009).

Em concentrações fisiológicas, PL formada pela conversão de PLG por SAK, leva a remoção de opsoninas necessárias para o reconhecimento de células imunes. Em adição, PL leva a diminuição do número de moléculas C3b e iC3b na superfície bacteriana, contribuindo para a diminuição na formação das enzimas C3 e C5 convertases (ROOIJAKKERS et al., 2005).

Fatores do complemento I e H (FI e FH) são reguladores da fixação do complemento que previnem a sua ativação descontrolada. FH se liga ao C3b imobilizado (iC3b), com isso a ação proteolítica de FI é ativada, o que promove a clivagem de C3b em iC3b. Os componentes C3b e iC3b são reconhecidos por neutrófilos, mas iC3b não ativa a via alternativa ou a cascata terminal, sendo transformado em C3d. Células de *S. aureus* capturam e ativam o FI sem o FH resultando no aumento de iC3b na superfície da célula, e na diminuição no total dos fragmentos de C3 nas células e na redução da fagocitose (FOSTER, 2009).

Muitas bactérias são conhecidas por ligarem o fator H à sua superfície e, dessa maneira, protegê-las contra o ataque do complemento. Essa atividade também tem sido reportada para *S. aureus* (ROOIJAKKERS et al., 2005). O fator de aglomeração A (ClfA), uma proteína de superfície, foi implicado na captura e ativação do fator I, isso pode explicar o efeito antifagocítico de ClfA (FOSTER, 2009).

A proteína inibitória de quimiotaxia de *S. aureus* (CHIPS) inibe eficientemente o recrutamento neutrofílico *in vitro*, sendo que a ativação celular por C5a é completamente bloqueada por CHIPS (ROOIJAKKERS et al., 2005).

SCIN e SAK possuem um elemento em comum: os dois são inibidores excretados que atuam na superfície bacteriana. Na evasão do complemento, isso é um evento crucial porque a ativação do complemento por si só é um fenômeno de superfície. Assim, para a bactéria interferir na ativação do complemento, as moléculas produzidas têm que agir na superfície. A depleção local de fatores do

complemento solúvel ou inibição da ativação destes na fase fluida não ajuda na evasão bacteriana ao ataque do complemento, sendo necessárias proteínas do complemento ligadas a superfície bacteriana para que ocorra o aumento da eficiência desses inibidores. Inibidores de C5a ou peptidases são exceções a essa regra, pois são moléculas ativadas na fase fluida (ROOIJAKKERS et al., 2005).

Proteínas secretadas

S. aureus expressa várias proteínas anti-opsônicas, associadas à superfície da bactéria, e uma cápsula polissacarídica que tanto pode interferir com a deposição de anticorpos e componentes do complemento por vias clássica e alternativa, quanto ao seu acesso aos receptores Fc e de complemento de neutrófilos. Assim, a fagocitose eficiente por neutrófilos, que depende do reconhecimento de componentes do complemento ou moléculas de anticorpos ligados à bactéria, é comprometida (FOSTER, 2009).

Alfa-defensinas são peptídeos secretados por neutrófilos, e fornecem proteção antimicrobiana mediada pela ruptura da integridade das membranas das células bacterianas. Estafiloquinase (SAK), proteína secretada por *S. aureus*, conhecida por ativar o plasminogênio humano (Figura 6). A ligação de α -defensinas com SAK inibe o efeito bactericida daquelas. Notavelmente, o sítio dentro da estafiloquinase que se liga a defensinas é diferente do seu sítio de ligação para plasminogênio. Portanto, a inibição de α -defensinas mediada por SAK é considerada ser um importante mecanismo de defesa de *S. aureus* (ROOIJAKKERS et al., 2005).

A proteína catelicidina LL-37 é uma das proteínas bactericidas humanas com atividade potente contra *S. aureus*. A proteinase aureolisina A, secretada por *S. aureus*, inativa a catelicidina LL-37, a partir de sucessivas clivagens da estrutura da proteína, destruindo, assim, a atividade antibacteriana. A produção de aureolisina A por *S. aureus* contribui para a resistência do microrganismo ao sistema imunológico inato mediado por LL-37. A proteinase V8, produzida por *S. aureus*, também possui atividade de clivar LL-37, porém o fragmento resultante da clivagem, LL-17-37, retém a atividade antibacteriana (ROOIJAKKERS et al., 2005).

A proteína A (SpA) é uma proteína ancorada na superfície bacteriana com domínios que podem se ligar à região Fc de IgG (Figura 6). A interação entre SpA e IgG resulta em revestimento da superfície celular bacteriana com moléculas de IgG na orientação incorreta para ser reconhecido pelo receptor Fc de neutrófilos e, também, para a ativação da via clássica do complemento. Isso explica o efeito anti-fagocítico da proteína A (FOSTER, 2009).

O fator de aglomeração A (ClfA) é a principal proteína de ligação ao fibrinogênio na superfície das células (Figura 6). As células tornam-se revestidas com fibrinogênio e, assim, ocasionam na deposição ou reconhecimento deficiente de opsoninas. *In vitro*, a expressão de ClfA reduz a opsonofagocitose por neutrófilos humanos, em parte devido a capacidade da molécula se ligar ao fibrinogênio (HIGGINS et al., 2006). Bactérias que expressam uma proteína mutante derivada de ClfA não demonstraram capacidade para ligar ao fibrinogênio, (GARZONI & KELLEY, 2009) porém, foram parcialmente protegidas da opsonofagocitose. Isto pode ser devido a capacidade de ClfA em ativar o FI, resultando em destruição da opsonina C3b (HAIR et al., 2008; FOSTER, 2009).

A maioria das cepas de *S. aureus* expressa uma microcápsula composta por polissacarídeos (Figura 6). A expressão da cápsula está associada com o aumento da virulência em modelos de infecções em animais. Em experimentos *in*

vitro, a presença de cápsulas revela uma absorção reduzida de células de bactérias por neutrófilos humanos, mesmo na presença de quantidades normais de opsoninas, indicando uma característica anti-opsonínica da cápsula. Fatores do sistema complemento podem ser depositados sobre a superfície da parede da célula, por baixo da cápsula, ficando, assim, inacessíveis aos receptores do complemento sobre a superfície de neutrófilos (FOSTER, 2009).

A bactéria *S. aureus* pode produzir várias toxinas que danificam as membranas das células hospedeiras. São toxinas citolíticas que tem como células alvo os leucócitos, chamadas de leucotoxinas. Sua ação está direcionada à morte de leucócitos ativos, que estão invadindo e provocando morte bacteriana. Existem quatro tipos de leucotoxina: a c-toxina ou c-hemolisina, a Leucocidina Pantone-Valentine (PVL), Leucocidina E / D e Leucocidina M / F-PV-like. A c-toxina lisa membranas de eritrócitos e leucócitos, enquanto PLV é tóxica apenas para leucócitos. *S. aureus* expressa vários pequenos peptídeos citolíticos que, em baixas concentrações, recrutam e ativam neutrófilos desencadeando uma resposta inflamatória, enquanto que em concentrações mais elevadas causam lise de neutrófilos (FOSTER, 2009).

A produção de adenosina sintetase (AdsA) pela bactéria *S. aureus*, uma molécula de sinalização durante a infecção, é um fator de evasão aos mecanismos de defesa, tanto inato quanto adaptativo, essenciais para a destruição de bactérias patogênicas pelo hospedeiro (KIM et al., 2012).

Após a invasão de *S. aureus* no sangue, a AdsA é responsável pelo aumento extracelular de adenosina. A adenosina extracelular interage com um ou mais dos seus receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3), membros da família dos receptores acoplados da proteína G (GPCRs). A interação do receptor com adenosina ativa as cascatas de sinalização anti-inflamatórias, causando a inibição da agregação plaquetária, da degranulação de neutrófilos e, ainda, aumento da produção de interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória (KIM et al., 2012).

A presença da proteína AdsA na bactéria *S. aureus* é necessária para sobrevivência desta dentro de neutrófilos, possibilitando à bactéria escapar dos atributos bactericidas dos leucócitos. A permanência da bactéria no neutrófilo depende de sua capacidade de se esquivar de todas as repostas bactericidas dessas células, incluindo ROS, enzimas hidrolíticas e defensinas peptídicas. No entanto, a localização intracelular do patógeno fornece proteção contra o sistema complemento, anticorpos e peptídeos extracelulares de defesa do hospedeiro, bem como proteção a muitas outras células do sistema imunológico, principalmente os fagócitos, incluindo macrófagos e células dendríticas, que provocam a morte de bactérias e apresentam antígeno para resposta imune adaptativa (GARZONI & KELLEY, 2009; KIM et al., 2012).

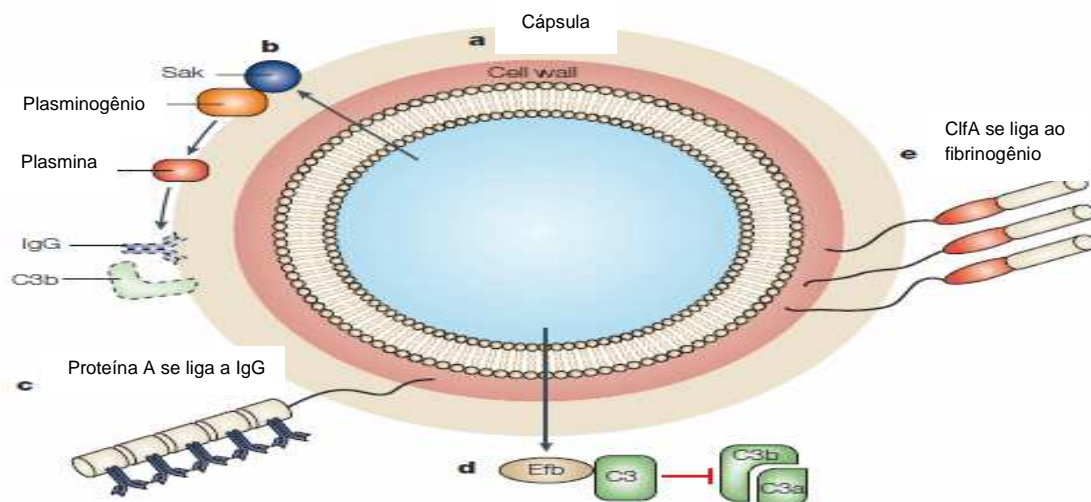


FIGURA 6 – Mecanismos de evasão à opsonofagocitose por *S. aureus*. A. capsula polissacarídea. B. Estafiloquinase. C. Proteína estafilocócica A. D. Proteína ligadora de fibrinogênio. E. Fator de aglomeração A (FOSTER, 2005)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira linha de defesa é a imunidade inata, ela provê o organismo de mecanismos efetores para o combate rápido da infecção, impedindo assim, o crescimento microbiano e o progresso da enfermidade. Assim, conhecer os mecanismos de evasão de *S. aureus* do sistema imunológico inato é importante para o controle de infecções causadas pelo patógeno.

Estudos relacionados aos fatores de virulência estafilocócicos estão direcionados à medicina humana, sendo encontrados poucos trabalhos relatados sobre mecanismos de evasão que levam à doença causada por *S. aureus* em animais. Autores sugerem que as estratégias de evasão de *S. aureus* à imunidade em organismos humanos são semelhantes em organismos animais, devido principalmente a similaridade nos processos físico, pato e imunológicos. Em se tratando do microrganismo *S. aureus*, a doença provocada por este em alguns animais é diferente da doença provocada em humanos, considerando principais locais da infecção e eventos imunológicos. Assim, o aprimoramento do conhecimento dos fatores de virulência de *S. aureus*, principalmente aqueles utilizados à evasão do sistema imunológico inato, em infecções que causam enfermidades em animais é de caráter emergencial.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunidade Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.
- BLOM, A. M.; HALLSTRÖM, T.; RIESBECK, K. Complement evasion strategies of pathogens—Acquisition of inhibitors and beyond. **Journal of Molecular Immunology**, v. 46, n.14, p. 2808-2817, 2009.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DELEO, F. R.; DIEP, B. A.; OTTO, M. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 17-34, 2009.

FOSTER, T. J. Immune Evasion by Staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n.12 p. 948-958, 2005.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Journal of Veterinary Dermatology**, v. 20, n.5-6 p. 456-470, 2009.

FOURNIER, B.; PHILPOTT, D. J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 18, n. 3, p. 521-540, 2005.

GARZONI, C.; KELLEY, W. L. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 59-65, 2009.

GRAVES, S. F.; KOBAYASHI, D. S.; DELEO, F. R. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. **Journal of Molecular Medicine. 2010 February**, v. 88, n. 2, p. 109-114, 2010.

HAIR, P. S., WARD, M. D., SEMMES, O. J., FOSTER, T. J., CUNNION, K. M. *Staphylococcus aureus* Clumping factor A binds to complement factor I and increases factor I cleavage of C3b. **Journal of Infectious Diseases**, v.198, n. 1, p.125-133, 2008.

HWANG, S. Y.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.; PARK, Y. H. *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 2, p. 125-131, 2010.

HIGGINS, J., LOUGHMAN, A., van KESSEL, K. P., van STRIJP, J. A., FOSTER, T. J. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. **FMES Microbiology Letters**, v. 258, n.2, p. 290-296, 2007.

KIM, H. K.; THAMMAVONGSA, V.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 1 p. 92-99, 2012.

KOBAYASHI, S. D.; BRAUGHTON, K. R.; PALAZZOLO-BALLANCE, A. M.; KENNEDY, A. D.; SAMPAIO, E.; KRISTOSTURYAN, E.; WHITNEY, A. R.; STURDEVANT, D. E.; DORWARD, D. W.; HOLLAND, S. M.; KREISWIRTH, B. N.;

MUSSER, J. M.; DELEO, F. R. Rapid Neutrophil Destruction following Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 6 p. 560-575, 2012.

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

MICHEL, A.; SYRING, C.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Intramammary infections with the contagious *Staphylococcus aureus* genotype B in Swiss dairy cows are associated with low prevalence of coagulase-negative staphylococci and *Streptococcus* spp. **The Veterinary Journal**, Londres ,v. 188, n. p. 313-317, 2011.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

PIETROCOLA, G.; ARCIOLA, C. R.; RINDI, S.; POTO, A. D.; MISSINEO, A.; MONTANARO, L.; SPEZIALE, P. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 799-810, 2011.

RIGBY, K. M.; DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 2 p. 237-259, 2012.

RIVAS, A. L., SCHWAGER, S. J., GONZÁLEZ, R. N., QUIMBY, F. W., ANDERSON, K. L. Multifactorial relationships between intramammary invasion by *Staphylococcus aureus* and bovine leukocyte markers. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v, 71, n.2, p. 135-144, 2007.

ROOIJAKKERS, S. H. M.; VAN KESSEL, K. P. M.; VAN STRIJP, J. A. G. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 596-601, 2005.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SILVA, E. C. B. F.; MACIEL, M. A. V.; MELO, F. L.; ANTAS, M. G. C.; NETO, A. M. B.; RABELO, M. A. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, v. 52, n. 2, p. 168-172, 2007.

SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. p. 170-175, 2010.

SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPL, M. E., HOLT, J. G. Gram positive cocos.
In: **Bergey's Manual os Systematic Bacteriology**, volume 2. 2 ed. Baltimore:
Williams & Wilkins, 1986. cap 12, p. 999-1103.