

LAÍS PIRES DO VALLE TÓTOLA

O PAPEL DA Sp1D NA EVASÃO AO SISTEMA IMUNE
DE CEPAS ST105-SCC*mecII* DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE À METICILINA



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2022**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Agnes Marie Sá Figueiredo e coorientação de Alice Slotfeldt Viana.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

T717p Tótola, Laís Pires do Valle
O papel da SplD na evasão ao sistema imune de
cepas ST105-SCCmecII de Staphylococcus aureus
resistente à meticilina / Laís Pires do Valle Tótola.
-- Rio de Janeiro, 2022.
65 f.

Orientadora: Agnes Marie Sá Figueiredo.
Coorientadora: Alice Slotfeldt Viana.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. MRSA. 2. Resposta Imune. 3. Fagocitose. 4.
Serino-protease. 5. Peptídeos Antimicrobianos. I.
Figueiredo, Agnes Marie Sá, orient. II. Viana,
Alice Slotfeldt, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Laís Pires do Valle Tótola**
 DRE: 118058717

BANCA EXAMINADORA: Profa. Márcia Giambiagi de Marval (Presidente)
 Dra. Caroline Lopes Martini
 M.Sc. Mariana Fernandes Carvalho
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho (Suplente)

Título da Monografia: **“O papel da SplD na evasão ao sistema imune de cepas ST105-SCCmecII de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/jfk-ummj-fqm>
 Data e hora de início: **04 de agosto de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 4 de agosto de 2022.

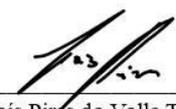
| | |
|-------------|---|
| NOTA | Banca Examinadora: |
| <u>10</u> | Profa. Márcia Giambiagi de Marval |
| <u>10</u> | Dra. Caroline Lopes Martini |
| <u>10</u> | M.Sc. Mariana Fernandes Carvalho |
| <u> </u> | Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho |

Presidente da banca



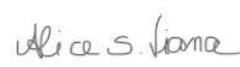
 Profa. Márcia Giambiagi de Marval

Aluno:



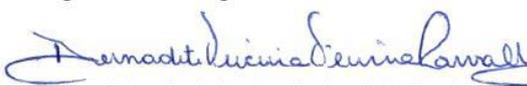
 Laís Pires do Valle Tótola

Orientador:

 Profa. Agnes Marie Sá Figueiredo / Coorientador: Alice Slotfeldt Viana

Coordenador
de TCC



 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que sempre valorizaram a educação e lutaram para que eu tivesse a liberdade e condição de buscar a carreira que eu quisesse, sem vocês esse trabalho não seria possível. A minha mãe Cíntia, que sempre esteve ao meu lado independentemente de qualquer coisa e me deu todo o apoio para que eu me sentisse livre para ser quem eu sou. Ao meu pai Carlos, que sempre foi um homem extremamente trabalhador e buscou sempre ser melhor, você é uma inspiração para mim. A minha irmã Lavinia, que é a pessoa mais importante da minha vida, é por sua causa que eu sei que nunca vou estar sozinha. Obrigada por ouvir o ensaio de todas as apresentações que eu fiz na graduação, mesmo quando você dormia no meio delas.

Agradeço imensamente aos meus amigos Gui, o sulista privilegiado e Jess, a carioca mais carioca de todas. Foi um prazer fazer parte do melhor grupo de jogadores de queimada, piratas e sobreviventes do DBD com vocês. Muito obrigada por entenderem meus momentos de ausência, eu espero um dia ser uma amiga tão boa para vocês quanto vocês são para mim. Obrigada também pra Julia, Lucas, Alan, Vilar e Luan, que tornaram todos os dias da graduação muito mais leves, admiro muito vocês e os profissionais que vocês se tornaram.

À melhor coorientadora que eu poderia pedir, Alice Viana, que sempre esteve disponível e foi paciente sempre que eu precisei de ajuda em qualquer coisa. Sem você esse trabalho não seria nem metade do que é. Obrigada por todas as conversas e por ter me dado a liberdade para me abrir, não sou o tipo de pessoa que costuma deixar isso muito claro, mas você é alguém muito importante para mim.

À minha orientadora Agnes Figueiredo, a quem eu já tinha grande admiração mesmo antes de virar minha orientadora. A sua sabedoria, dedicação e animação frente à pesquisa são inspiradoras, e é uma honra ser sua aluna. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis da graduação.

Aos incríveis companheiros de laboratório, que tornaram tudo muito mais fácil e aos quais eu tenho uma infinita admiração. Ao grande Matheus Côrtes, que é o nerd mais descolado de todos os tempos, menino prodígio que já tinha aluna enquanto ainda era IC, você me ensinou muita coisa. Obrigada por todas as conversas e recomendações de jogos, filmes e músicas, você tem ótimo gosto. O laboratório é bem mais divertido quando você está nele, que ainda tenha muito carteadado para nós no futuro. Agradeço à Isis, mesmo conhecendo você há menos tempo, sua personalidade gentil e extrovertida faz ser quase impossível não gostar de você. Muito obrigada também à Mari Fernandes, que dá uma das melhores aulas de biomol que eu já tive.

Não sei se você sabe disso, mas sua aula foi um dos motivos que me levaram a ir para o BMB, então eu diria que você é uma das pessoas mais importantes as quais eu deveria agradecer por esse trabalho. À Carol, Cícera e Marquinhos, que sempre estiveram gentilmente disponíveis para ajudar com qualquer coisa que eu precisasse no laboratório. Ao Yan, amigo de IC que vai virar mestre. À professora Bernadete, que é uma das melhores professoras as quais eu já tive o prazer de assistir uma aula, a senhora é um parâmetro de ensino e atenção ao aluno para mim, obrigada por tudo.

Agradeço imensamente também à professora Juliana Echevarria, que se disponibilizou a ajudar e discutir os experimentos realizados neste trabalho. Seu conhecimento e experiência foram de suma importância.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, e a todos os professores e funcionários empenhados no ensino de todos os alunos de graduação. Aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq e FAPERJ.

“A sabedoria é filha da experiência”

Leonardo da Vinci

RESUMO

LAÍS PIRES DO VALLE TÓTOLA

O PAPEL DA *SplD* NA EVASÃO AO SISTEMA IMUNE DE CEPAS ST105-SCCmecII DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA

Orientador: Agnes Marie Sá Figueiredo

Coorientador: Alice Slotfeldt Viana

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um subgrupo da espécie *S. aureus*, tendo grande relevância clínica, especialmente no ambiente hospitalar. Estes agentes patogênicos estão envolvidos em vários quadros clínicos, como infecções de pele, síndromes toxigênicas e bacteremia. Um estudo anterior realizado por este grupo utilizando 600 isolados de MRSA teve como objetivo promover um painel multicêntrico sobre epidemiologia de MRSA no Rio de Janeiro, e revelou que o complexo clonal 5 (CC5) substituiu o clone epidêmico brasileiro (BEC; ST239(CC8)-SCCmecIII), que durante muitos anos foi o HA-MRSA mais prevalente no Brasil. As três principais estirpes de CC5 encontradas nas infecções da corrente sanguínea foram ST105(CC5)-SCCmecII (54,7%), ST5(CC5)-SCCmecII (29,4%), e ST5(CC5)-SCCmecIV (25,6%). Análises genômicas apontaram algumas características das cepas ST105 do Rio de Janeiro, tais como uma mutação pontual não-sinônima no gene *aur* e ausência de *splD* e *sep*. Além disso, observou-se que as cepas ST105-SCCmecII eram mais resistentes à fagocitose e tinham aumentadas taxas de sobrevivência após interação com monócitos. O principal foco do trabalho atual foi a possibilidade de que a perda do gene *splD* (codificando a protease SplD) pelas cepas ST105-SCCmecII represente uma vantagem em infecções da corrente sanguínea. Assim, para abordar esta questão, foi avaliado o papel desempenhado pela SplD em certos aspectos da evasão do sistema imune. Inicialmente, foi determinada a taxa de sobrevivência das cepas ST105-SCCmecII (SplD negativo), ST5-SCCmecII (SplD positivo), e ST5-SCCmecIV (SplD positivo) tratadas com diferentes concentrações da defensina hNP-1 e da catelicidina LL-37, e o mesmo foi feito utilizando os clones isogênicos que expressam ou não SplD. Foram também conduzidos experimentos de fagocitose utilizando monócitos THP-1 e os clones isogênicos derivados do MRSA: MW2B (vetor pCN40 vazio na estirpe MW2; SplD-negativo) e MW2D (pCN40-splD; SplD-positivo). Além disso, foram realizados experimentos de fagocitose utilizando a cepa MW2B na presença e ausência da proteína SplD recombinante. Os ensaios de sobrevivência utilizando os peptídeos antimicrobianos hNP-1 e LL-37 não mostraram diferenças significantes entre as cepas clínicas que apresentam ou não o gene *splD* (ST5-SCCmecIV, ST5-SCCmecII e MW2D), e resultados semelhantes foram obtidos utilizando os clones isogênicos MW2B (SplD negativo) e MW2D (SplD positivo). Estes dados parecem excluir um papel desempenhado pela SplD nos mecanismos de eliminação bacteriana por hNP-1 ou LL-37. No que diz respeito aos ensaios de fagocitose, a cepa MW2B foi mais resistente à fagocitose do que a cepa isogênica MW2D. De fato, a adição de SplD recombinante ao experimento de fagocitose levou ao aumento de fagocitose da cepa SplD negativa, MW2B, representado por maiores taxas médias de intensidade de fluorescência em ambas as concentrações da proteína recombinante (50nM e 5nM). Estes dados sugerem um papel desempenhado pela SplD aumentando a fagocitose das

cepas de *S. aureus* pelas células monocíticas THP-1. Assim, nossos dados sugerem que a proteína SplD pode agir como um modulador do sistema imune humano ativando fagócitos e que a falta do gene *splD* pode ter contribuído para o sucesso da cepa ST105-SCC*mecII* em se espalhar pela Área Metropolitana do Rio de Janeiro como o agente mais importante das infecções da corrente sanguínea.

Palavras-chave: MRSA, resposta imune, fagocitose, serino-protease, peptídeos antimicrobianos

ABSTRACT**LAÍS PIRES DO VALLE TÓTOLA****O PAPEL DA SpID NA EVASÃO AO SISTEMA IMUNE DE CEPAS ST105-SCCmecII DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA****Orientador: Agnes Marie Sá Figueiredo
Coorientador: Alice Slotfeldt Viana****Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a subgroup of *S. aureus* species, having great clinical relevance, especially in the hospital environment. These pathogens are involved in various clinical conditions, such as skin infections, toxicogenic syndromes and bacteremia. A previous study by our group using 600 MRSA isolates aimed at promoting a multicenter panel on MRSA epidemiology in Rio de Janeiro, and revealed that clonal complex 5 (CC5) has replaced the Brazilian epidemic clone (BEC; ST239(CC8)-SCCmecIII), which for many years was the most prevalent HA-MRSA in Brazil. The top three CC5 strains found in bloodstream infections were ST105(CC5)-SCCmecII (54.7%), ST5(CC5)-SCCmecII (29.4%), and ST5(CC5)-SCCmecIV (25.6%). Genomic analyses pointed out some characteristics of the ST105 strains from Rio de Janeiro, such as a non-synonymous point mutation in the *aur* gene and absence of *spID* and *sep*. In addition, ST105-SCCmecII strains were observed to be more resistant to phagocytosis and to have increased survival rates after interaction with monocytes. The main focus of the current work was the possibility that the loss of the *spID* gene (encoding the SplD protease) by ST105-SCCmecII strains represents an advantage in bloodstream infections. Thus, to address this question, the role played by *spID* in certain aspects of immune system evasion was evaluated. Initially, the survival rate of the ST105-SCCmecII (SplD negative), ST5-SCCmecII (SplD positive), and ST5-SCCmecIV (SplD positive) strains treated with different concentrations of the defensin hNP-1 and the cathelicidin LL-37 were determined, and the same was done using the isogenic clones expressing or not SplD. Phagocytosis experiments were also conducted using THP-1 monocytes and the isogenic MRSA-derived clones: MW2B (empty pCN40 vector in MW2 strain; SplD-negative) and MW2D (pCN40-splD; SplD-positive). In addition, phagocytosis experiments were performed using MW2B strain in both the presence and absence of recombinant SplD protein. Survival assays using hNP-1 and LL-37 showed no significant differences between clinical strains presenting or not the *spID* gene (ST5-SCCmecIV, ST5-SCCmecII and MW2D), and similar results were obtained using the isogenic MW2B (SplD negative) and MW2D (SplD positive) clones. These data seem to rule out a role played by SplD in the mechanisms of bacterial elimination by hNP-1 or LL-37. Regarding phagocytosis assays, MW2B was more resistant to phagocytosis than the isogenic MW2D strain. In fact, the addition of recombinant SplD to the phagocytosis experiment led to increased phagocytosis of the SplD negative strain, MW2B, represented by higher mean fluorescence intensity rates at both concentrations of the recombinant protein (50nM and 5nM). These data suggest a role played by SplD enhancing phagocytosis of *S. aureus* strains by THP-1 monocytic cells. Thus, our data suggest that the SplD protein may act as a modulator of the human immune system by activating phagocytes and that the lack of the *spID* gene may have contributed to the success of the ST105-SCCmecII

strain in spreading throughout the Rio de Janeiro Metropolitan Area as the most important agent of bloodstream infections.

Key-words: MRSA, immune response, phagocytosis, serine-protease, antimicrobial peptides

RESUMO PARA LEIGOS

LAÍS PIRES DO VALLE TÓTOLA

O PAPEL DA *SpID* NA EVASÃO AO SISTEMA IMUNE DE CEPAS ST105-SCCMECII DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA

Orientador: Agnes Marie Sá Figueiredo

Coorientador: Alice Slotfeldt Viana

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus é uma bactéria muito importante por causar diversos tipos de infecções no homem. Essas doenças podem variar desde infecções na pele até doenças graves como infecções na corrente sanguínea. Além disso, essa bactéria pode apresentar resistência a vários antibióticos. Um dos antibióticos aos quais *S. aureus* desenvolveu resistência foi a meticilina, e os *S. aureus* resistente à meticilina são conhecidos como MRSA. Entre os MRSA existem tipos diferentes que podem variar quanto ao seu potencial de agressividade para o paciente, resistência a antibióticos, e ao tipo de doença que causam. Em pesquisas anteriores de nosso grupo, foi observado que um desses tipos, o ST105, foi mais encontrado causando infecções no sangue de pacientes hospitalizados. Quando o DNA dessas bactérias foi sequenciado por nós e comparado com o de bactérias muito semelhantes, mas que não causavam muitas infecções no sangue, encontramos algumas diferenças que talvez pudessem explicar o porquê da preferência do ST105 por infecções sanguíneas. Neste trabalho, nosso objetivo foi estudar se a ausência do gene *spID*, responsável pela produção de uma protease (SplD, uma proteína que quebra outras proteínas) poderia ajudar na maior sobrevivência do ST105 no sangue. Primeiro, analisamos se a presença ou ausência da SplD, poderia ter algum papel na resistência dessas bactérias a peptídeos antimicrobianos (que são pequenos componentes liberados pelas células do nosso sistema de defesa imunológico para atacar microrganismos invasores no sangue). Entretanto, não foi observado uma diferença importante na presença ou ausência de SplD, o que sugere que tais peptídeos não sejam afetados por esta protease. Foi também investigado se o gene *spID* teria algum papel na maior resistência de ST105 ao processo de fagocitose, que é um processo em que as células do sistema imune capturam as bactérias para o interior de suas células para destruí-las. Esse processo é um importante processo de defesa das infecções, incluindo àquelas na corrente sanguínea. Nesse experimento foram utilizadas amostras manipuladas geneticamente: um par de bactérias idênticas, que só diferem pela presença ou ausência do gene *spID*. Nossos resultados, ainda preliminares, mostraram que o grupo que não tem o gene para produzir a protease SplD foi menos fagocitado do que o grupo que possui tal gene. Nós ainda realizamos esses experimentos de outra forma: utilizando uma amostra que não tem o gene *spID* e com a adição da proteína SplD purificada, e comparamos os resultados obtidos com essa mesma bactéria sem a adição da protease. Neste último experimento, observamos que na presença da SplD purificada a fagocitose também aumentou. Assim, esses resultados, ainda preliminares, caso venham a ser confirmados, irão apontar que a perda da SplD pela linhagem ST105 pode representar uma vantagem em relação às infecções no sangue, uma vez que essa bactéria consegue driblar a resposta imune e se apresentar como um dos MRSA mais frequentes neste tipo de infecções. Deste modo, confirmar esses dados seriam da maior importância para a compreensão do que faz esta bactéria ser tão especial.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representativo da organização das principais Sequências-tipo (ST) agrupadas em Complexos Clonais (CC) de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. CC= complexo clonal; ST= sequência-tipo; EMRSA = Epidemic Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*, BEC = Brazilian Epidemic Clone..... 13
- Figura 2** – Árvore filogenética das amostras pertencentes ao Complexo Clonal 5 coletadas, sequenciadas e incluídas no estudo de Viana e colaboradores (2021)..... 19
- Figura 3** - Ensaio de sobrevivência das amostras clínicas ST5-SCC*mecIV* CR14-026 (A), ST5-SCC*mecII* CR15-071 (B) e ST105-SCC*mecII* CD16-016 (C) na presença do peptídeo antimicrobiano hNP-1. O eixo y corresponde à contagem de UFC/mL após 2 horas de interação das cepas com as diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, representadas no eixo x. Cada ponto na curva representa a média de 4 réplicas e o valor de IC₅₀ foi calculado a partir de testes de regressão não linear. UFC = Unidades formadoras de colônias; IC₅₀ = *half maximal inhibitory concentration*..... 27
- Figura 4** - Ensaio de sobrevivência das amostras clínicas ST5-SCC*mecIV* CR14-026 (A), ST5-SCC*mecII* CR15-071 (B) e ST105-SCC*mecII* CD16-016 (C) na presença do peptídeo antimicrobiano LL-37. O eixo y corresponde à contagem de UFC/mL após 2 horas de interação das cepas com as diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, representadas no eixo x. Cada ponto na curva representa a média de 4 réplicas e o valor de IC₅₀ foi calculado a partir de testes de regressão não linear. UFC= Unidades formadoras de colônias; IC₅₀ = *half maximal inhibitory concentration*..... 29
- Figura 5** - Ensaio de sobrevivência das amostras mutantes isogênicas MW2B (amostra contendo plasmídeo sem *splD*; A) e MW2D (amostra contendo o plasmídeo e o gene *splD*;B) na presença do peptídeo antimicrobiano hNP-1. O eixo y corresponde à contagem de UFC/mL após 2 horas de interação das cepas com as diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, representadas no eixo x. Cada ponto na curva representa a média de 3 réplicas e o valor de IC₅₀ foi calculado a partir de testes de regressão não linear. UFC = Unidades formadoras de colônias; IC₅₀ = *half maximal inhibitory concentration*..... 30
- Figura 6** - Ensaio de sobrevivência das amostras mutantes isogênicas MW2B (amostra contendo plasmídeo sem *splD*; A) e MW2D (amostra contendo o plasmídeo e o gene *splD*;B) na presença do peptídeo antimicrobiano LL-37. O eixo y corresponde à contagem de UFC/mL após 2 horas de interação das cepas com as diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, representadas no eixo x. Cada ponto na curva representa a média de 4 réplicas e o valor de IC₅₀ foi calculado a partir de testes de regressão não linear. UFC = Unidades formadoras de colônias; IC₅₀ = *half maximal inhibitory concentration*..... 31
- Figura 7** - Ensaio de fagocitose com as amostras mutantes isogênicas MW2D e MW2B. O pico de cor preta representa o controle negativo utilizado neste estudo, enquanto o pico de cor roxa representa a cepa MW2B e o laranja a MW2D. O eixo y do gráfico representa o número relativo de células obtido por meio da citometria de fluxo, enquanto o eixo x representa a intensidade de fluorescência obtida representada por log do valor de fluorescência de Syto9..... 32

Figura 8 - Ensaio de fagocitose com a amostra mutante MW2B com ou sem a presença da proteína recombinante SplD em diferentes concentrações. O pico de cor roxa representa a cepa MW2B, enquanto o pico de cor azul representa a cepa MW2B + [] 50nM da proteína SplD e o ciano equivale a MW2B + [] 5nM da proteína SplD. O eixo y do gráfico representa o número relativo de células obtido por meio da citometria de fluxo, enquanto o eixo x representa a intensidade de fluorescência obtida representada por log do valor de fluorescência de Syto9..... 33

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Fatores de virulência e evasão importantes de <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 |
| Tabela 2 - Amostras bacterianas selecionadas para o ensaio de sobrevivência na presença de hNP-1 e catelicidina humana LL-37..... | 20 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| ADAM10 | <i>A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i> |
| Agr | <i>Accessory gene regulator</i> |
| AIM2 | <i>Absent in melanoma 2</i> |
| AIP | <i>Autoinductor Peptide</i> |
| AMP | <i>Antimicrobial Peptides</i> |
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| CA-MRSA | <i>Community Associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> |
| CC | <i>Clonal Complex</i> |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> |
| CHP | <i>Chemotaxis Inhibitory Protein</i> |
| CMI | <i>Concentração Mínima Inibitória</i> |
| COVID-19 | <i>Coronavirus Disease 2019</i> |
| DAMP | <i>Damage-associated Molecular Pattern</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FNBP | <i>Fibronectin-Binding Protein</i> |
| HA-MRSA | <i>Hospital Associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> |
| hNP-1 | <i>Human Neutrophil Peptide 1</i> |
| ICS | <i>Infecção da Corrente Sanguínea</i> |
| IEC | <i>Immune Evasion Cluster</i> |
| IFN γ | <i>Interferon Gamma</i> |
| IgG | <i>Imunoglobulina G</i> |
| IgM | <i>Imunoglobulina M</i> |
| IL-10 | <i>Interleukin 10</i> |
| IL-1 β | <i>Interleukin 1β</i> |
| IL-6 | <i>Interleukin 6</i> |
| IC50 | <i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i> |
| LPS | <i>Lipopolysaccharide</i> |
| MDA5 | <i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i> |
| MFI | <i>Mean Fluorescent Intensity</i> |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| MLST | <i>Multilocus Sequence Typing</i> |
| MMP9 | <i>Matrix Metalloproteinase 9</i> |
| MRSA | <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> |
| MSCRAMM | <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i> |
| MSSA | <i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i> |
| MW2B | <i>MW2 + pCNB</i> |
| MW2D | <i>MW2 + pCNBD</i> |
| NET | <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> |
| NK | <i>Células Natural Killers</i> |
| OMS | <i>Organização Mundial da Saúde</i> |
| PAMP | <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> |
| PAR | <i>Protease Activated Receptors</i> |
| PBP | <i>Penicillin-Binding Protein</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PSM | <i>Phenol-Soluble Modulins</i> |

| | |
|--------------|--|
| PVL | <i>Panton-Valentine</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> |
| ROS | <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| SCCmec | <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> |
| SCIN | <i>Staphylococcal Complement Inhibitor</i> |
| SOD | <i>Superóxido-Dismutase</i> |
| SSL10 | <i>Staphylococcal Superantigen-Like Protein 10</i> |
| ST | <i>Sequence Type</i> |
| TCR | <i>T-cell Receptor</i> |
| TLR | <i>Toll-like Receptor</i> |
| TNF α | <i>Tumor Necrosis Factor α</i> |
| TSA | <i>Tryptic Soy Agar</i> |
| TSB | <i>Tryptic Soy Broth</i> |
| TSST1 | <i>Toxic Shock Syndrome Toxin-1</i> |
| UFC | <i>Unidades Formadoras de Colônia</i> |
| WGS | <i>Whole Genome Sequencing</i> |

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 |
| 1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina..... | 2 |
| 1.3 Mecanismos imunológicos no sangue..... | 4 |
| 1.4 Patogenicidade e fatores de virulência..... | 7 |
| 1.5 Estrutura populacional de MRSA..... | 12 |
| 1.6 O Complexo Clonal 5 (CC5)..... | 15 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 17 |
| 3 OBJETIVOS..... | 18 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 19 |
| 4.1 Seleção das amostras bacterianas utilizadas nesse estudo..... | 19 |
| 4.2 Construção das amostras mutantes isogênicas contendo ou não o gene <i>splD</i> | 20 |
| 4.3 Preparo dos inóculos bacterianos..... | 21 |
| 4.4 Sobrevivência bacteriana na presença de hNP-1 e LL-37..... | 21 |
| 4.5 Ensaio de fagocitose..... | 23 |
| 4.5.1 Ensaio de fagocitose utilizando a proteína recombinante SplD..... | 24 |
| 4.6 Análise estatística..... | 24 |
| 5 RESULTADOS..... | 26 |
| 5.1 Sobrevivência bacteriana na presença de hNP-1 e LL-37..... | 26 |
| 5.1.1 Comparação da sobrevivência de amostras clínicas pertencentes às linhagens ST5-SCCmecII/IV e ST105-SCCmecII aos peptídeos antimicrobianos..... | 26 |
| 5.1.2 Comparação da sobrevivência das cepas mutantes isogênicas MW2B e MW2D..... | 30 |
| 5.2 Ensaio de fagocitose..... | 31 |
| 5.2.1 Ensaio de fagocitose utilizando a proteína recombinante SplD..... | 32 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 34 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 41 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 42 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é composto de cocos Gram-positivos e compreende cerca de 44 espécies e 21 subespécies, de acordo com o *Integrated Taxonomic Information System - Report* (<http://www.itis.gov>; último acesso em 18 de janeiro de 2022). A sua morfologia é caracterizada pelos aglomerados de células (aproximadamente 1 μM de diâmetro) em formato que lembra um cacho de uva, o que deu origem ao nome do gênero - a palavra *Staphylococcus*, em grego σταφύλι (*staphýli*), significa uva. Fisiologicamente, essas bactérias se apresentam como microrganismos não-móveis, não formadores de esporos, catalase-positiva e oxidase negativa. Quanto ao tipo de respiração, esses microrganismos são facultativos, ou seja, podem se multiplicar tanto na presença como na ausência de oxigênio. Podem ser resistentes a diversas condições ambientais, como ambientes secos e diferentes faixas de pH, temperatura e salinidade. São encontrados como parte da microbiota de animais e humanos, estando presentes, principalmente, na pele e narinas anteriores, sendo considerados patógenos oportunistas. Esse gênero é dividido em dois grupos distintos caracterizados pela presença ou ausência da enzima coagulase, responsável pela coagulação do plasma sanguíneo (Gulzar e Zehra, 2018).

O principal representante patogênico do grupo dos *Staphylococcus* coagulase-positivos é o *Staphylococcus aureus* subespécie *aureus*, que aqui iremos chamar apenas como *S. aureus*. Esses microrganismos são de grande importância para a saúde pública e são, portanto, muito estudados pela ciência. Esta espécie foi isolada e descrita no final do século XIX (Ogston, 1882; Rosenbach, 1884) e, desde então, vem sendo identificada como agente etiológico de diversos tipos de infecções (Rasheed e Hussein, 2021). A variedade de doenças que *S. aureus* pode causar se deve principalmente à grande diversidade de genes de virulência que tal microrganismo carrega em seu genoma. Esses fatores envolvem desde adesinas a enzimas e toxinas com diferentes sítios de ação. Alguns desses produtos estão ancorados à parede celular do microrganismo e participam dos processos de colonização do hospedeiro e evasão da resposta imune, enquanto outros são secretados e exercem papel importante nos processos de agressão aos tecidos e órgão do hospedeiro, e na exacerbação dos processos infecciosos (Cheung, Bae e Otto, 2021).

Além do seu potencial patogênico, esse grupo de bactérias mostra grande plasticidade genética, podendo receber, de modo relativamente fácil, genes horizontalmente transferidos, inclusive de outras espécies bacterianas (John *et al.*, 2019). Dessa forma, apresentam elevada

variabilidade genômica, quando são levados em consideração, por exemplo, seus perfis de virulência e resistência aos antibióticos.

1.2 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

O primeiro caso de uma infecção causada por MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) foi relatado em 1961 na Inglaterra (Jevons, 1961), logo após a introdução deste antimicrobiano no uso clínico para tratamento de infecções por *S. aureus*. Após sua identificação, a disseminação da resistência à meticilina entre esses microrganismos foi aumentando, e entre 1997 e 1999 era possível encontrá-la em diversas regiões como na América do Norte, América Latina, Europa e a região oeste do Pacífico (Diekema *et al.*, 2001). Em geral, durante este período, MRSA era o principal causador de quadros como infecções de corrente sanguínea (ICS), infecções de pele e tecidos moles, e de pneumonia nessas áreas (Diekema *et al.*, 2001). Mais recentemente, MRSA continua sendo um grande problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência (principalmente nas infecções hospitalares associadas ao uso de dispositivos médicos implantáveis) e ainda pela limitada opção terapêutica para o tratamento de infecções graves e disseminadas (Morrissette *et. al.*, 2020). A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos, como os MRSA, é conhecidamente mais elevada em hospitais, onde além da grande pressão seletiva que favorece o aparecimento de microrganismos resistentes a antibióticos, é maior o número de pacientes predispostos a infecções (seja por imunodeficiências ou procedimentos invasivos), dificultando, para esses casos, a escolha da terapia eficaz (Rodvold e Mcconeghy, 2014; Kullar *et al.*, 2016).

Por consequência da ampla disseminação dessas bactérias, o número de mortes devido a infecções por MRSA é preocupante. Segundo o Center for Disease Control and Prevention (CDC), nos Estados Unidos da América (EUA), o número estimado de casos de MRSA em pacientes hospitalizados, em 2017, chegou a 323.700. No mesmo ano, ocorreram aproximadamente 10.600 mortes devido a infecções causadas por MRSA (CDC, 2019), o que representa um número consideravelmente elevado, indicando que, aproximadamente, 3 em cada 100 pacientes infectados por MRSA foram a óbito. Em um documento de 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que a chance de morte entre os pacientes infectados por MRSA seriam 64% maiores do que entre os infectados com cepas de *S. aureus* suscetíveis à meticilina (MSSA) (WHO, 2014). Além disso, em 2017, a OMS classificou os MRSA como microrganismos de elevada prioridade na lista de patógenos priorizados para pesquisa e

desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (WHO, 2017), evidenciando a necessidade de se compreender os mecanismos envolvidos na disseminação dessa espécie.

Poucas opções foram criadas na última década como alternativas para o tratamento de infecções por *S. aureus* multirresistentes (Elnour e Ramadan, 2021). Isso vem ocorrendo devido a uma série de falhas de mercado, onde as indústrias farmacêuticas se posicionam de forma relutante quanto aos investimentos em pesquisas de novos antimicrobianos (Renwick *et al.*, 2016). Embora a vancomicina seja considerada a primeira escolha para o tratamento de infecções graves causadas por MRSA, seu uso pode apresentar alguns problemas devido a sua nefrotoxicidade e concentração mínima inibitória (CMI) elevada, levando a falhas na resolução desses casos (Cosimi *et al.*, 2017). As alternativas mais comuns para contornar esses problemas são os antibióticos como daptomicina, linezolida e telavancina (Cosimi *et al.*, 2017). Entre as opções existentes para substituição desses medicamentos pode-se citar a ceftarolina fosamil (Selvan e Ganapathy, 2016), uma cefalosporina de 5ª geração que teve seu uso clínico aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) no fim de 2010 e tem indicação de uso direcionado a casos de infecções de pele e pneumonia adquirida na comunidade, podendo também ser utilizada em casos de bacteremias associadas (Cosimi *et al.*, 2017). Porém, tais substituições são muitas vezes dificultadas devido à existência de poucos estudos clínicos controlados com antimicrobianos mais novos (Elnour e Ramadan, 2021).

A resistência à meticilina é mediada pela expressão do gene *mecA*, o qual está localizado em um elemento genético móvel conhecido como *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*). O gene *mecA* codifica uma transpeptidase alternativa denominada proteína de ligação à penicilina 2A (*Penicillin-binding protein 2A*, PBP2A; Hartman e Tomasz, 1984). As transpeptidases atuam promovendo as pontes peptídicas transversas do peptideoglicano. O que difere a PBP2A de outras transpeptidases de *S. aureus* é sua baixa afinidade de ligação aos antimicrobianos β -lactâmicos (classe a que pertence a meticilina), que atuam ligando-se a estas proteínas para evitar a síntese da parede celular desta bactéria. Dessa forma, os antimicrobianos não conseguem se ligar de maneira eficiente à PBP2A, e assim não inibem a multiplicação bacteriana, pois essa PBP alternativa permanece ativa, levando à síntese das pontes transversas da parede celular da bactéria (Hartman e Tomasz, 1984).

O SCC*mec* tem dois grupos de genes que são usados para sua classificação, sendo estes o complexo *mec* e o complexo *ccr*, ambos classificados em diferentes tipos baseados em suas sequências. Os genes do complexo *mec* compreendem o próprio *mecA* e os genes ligados à regulação da expressão do *mecA*, que são o indutor *mecI* e o regulador *mecR* (Hiramatsu, *et al.*,

1992; Arêde *et al.*, 2012), enquanto o complexo *ccr* envolve uma variedade de recombinases (*ccrA*, *ccrB* e *ccrC*), sendo, portanto, responsável pela mobilização e disseminação deste cassete cromossômico (Hiramatsu *et al.*, 2001). A combinação dos diferentes tipos de complexos *ccr* e *mec* define o tipo de elemento *SCCmec*. Até o momento, existem quinze tipos diferentes de *SCCmec* e muitos subtipos (Urushibara *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2022), que possuem grande importância na classificação epidemiológica dos MRSA, conforme será explicitado adiante. Além dos genes de resistência à meticilina, seus reguladores e o complexo *ccr*, o *SCCmec* comumente carrega elementos genéticos móveis como sequências de inserção e transposons, sendo que estes últimos podem carrear outros genes de resistência aos antimicrobianos (Liu *et al.*, 2016).

1.3 Mecanismos imunológicos no sangue

A resposta a invasões bacterianas acontece rapidamente após a invasão tecidual por um patógeno. Essa reação é desencadeada por diversos tipos celulares do hospedeiro através de seus receptores do tipo Toll (*toll-like receptors*; TLR) e receptores intracelulares de ácidos nucleicos (ex.: AIM2 e MDA-5), entre outros, em resposta ao reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) ou a presença de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). A partir daí, diversos mecanismos entram em ação, como é o exemplo da fagocitose e citotoxicidade mediada por células do sistema imune, produção e liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs), opsonização por componentes do sistema complemento, liberação de citocinas, quimiocinas, proteases etc. Os gradientes quimiocinéticos recrutam diversas células de defesa para o local da inflamação, sendo os neutrófilos as primeiras células imunes inatas recrutadas, seguidos pelos monócitos e células dendríticas (Gasteiger *et al.*, 2017).

Os neutrófilos são de suma importância em infecções causadas por *S. aureus*, e isso pode ser observado pela vasta gama de fatores de virulência da bactéria que são direcionadas ao enfrentamento dessa célula imune. A resposta neutrofílica a invasões ocorre em poucos minutos e envolve, além da fagocitose do agente invasor, a liberação de três diferentes tipos de grânulos: Os grânulos primários que contêm a enzima antibacteriana mieloperoxidase, diversos peptídeos antimicrobianos, lisozimas e serino-proteases. Já os grânulos secundários são compostos em grande parte por lactoferrina, que além de prevenir o crescimento bacteriano por sequestro de ferro livre, também aumenta a permeabilidade à lisozima para facilitar a quebra da parede celular bacteriana. Por fim, os grânulos terciários contêm gelatinase (MMP9) e outros

elementos capazes de degradar os principais componentes da membrana basal (Mayadas *et al.*, 2014). Outro mecanismo de defesa importante mediado por neutrófilos é a produção de NETs (*neutrophil extracellular traps* ou armadilhas extracelulares de neutrófilos). Tais estruturas consistem em uma rede composta de DNA nuclear ou mitocondrial, que é liberada em conjunto com histonas e proteínas granulares específicas devido à lise coordenada dos neutrófilos (Gasteiger *et al.*, 2017).

Após o período inicial da infecção, é acionada a resposta imune adaptativa, que é dependente da ação de células apresentadoras de antígenos e da produção de citocinas. Essa resposta é mediada pela ativação de linfócitos T que possuem seu receptor exclusivo TCR (*T cell receptors*) e interagem com células apresentadoras de antígenos a partir do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex, MHC*). Enquanto as células T que expressam proteínas do tipo CD4+ se diversificam de acordo com as citocinas reconhecidas no processo de ativação do TCR, adquirindo fenótipos especializados para diferentes tipos de infecção (fenótipos de células T auxiliares que tem suas funções definidas por perfis de expressão de citocinas ou *T helper*), as células TCD8+ se especializam de forma a eliminar células infectadas com patógenos intracelulares, e por isso são conhecidas como células T assassinas (ou *T killer*; Karauzum e Datta, 2017). Outros perfis de células T atuam de forma a auxiliar, de forma mais direta, a resposta inata em mucosas, sendo elas as células T $\gamma\delta$, células NK (*Natural Killers*) e células inatas linfóides (Murphy *et al.*, 2014). Já os linfócitos B são células geradoras de anticorpos que agem neutralizando proteínas importantes expressas por células bacterianas, como toxinas e outros fatores de virulência, e promovendo a opsonização (Montgomery *et al.*, 2014). Os componentes da resposta imune adaptativa não só têm atividade direta contra as bactérias, mas também potencializam a atividade das células do sistema imune inato, por exemplo, aumentando a ação e o recrutamento de fagócitos (Karauzum e Datta, 2017).

Conforme citado anteriormente, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) figuram como uma das estratégias de leucócitos para frear a infecção bacteriana no organismo do hospedeiro. AMPs são moléculas produzidas por células do sistema imunológico e secretadas para o meio extracelular de forma a atacar microrganismos que invadem a corrente sanguínea e/ou tecidos (Guerra *et al.* 2017). Tais peptídeos previnem e controlam infecções microbianas tanto por ataque direto a esses microrganismos como por modulação do sistema imune inato. Portanto, os AMPs vêm sendo muito estudados como potenciais moléculas para contornar o problema crescente da resistência aos antimicrobianos, por apresentarem ampla ação anti-inflamatória,

antimicrobiana e imunoestimulante (Martin *et al.*, 2015). Entre os AMPs produzidos por mamíferos, existem duas subfamílias distintas classificadas de acordo com suas estruturas e outras características biológicas, sendo elas as subfamílias de catelicidinas e defensinas. As defensinas são pequenos peptídeos catiônicos ricos em resíduos conservados de cisteína, podendo assumir conformações de α -hélice e β -folha. Já a subfamília das catelicidinas possui maior diversidade de estruturas e composições de aminoácido, sendo os seus diferentes membros definidos como catelicidinas por terem, em sua forma não processada e armazenada nas células, uma prosequência N-terminal conservada de cerca de 100 resíduos conhecida como domínio “cathelin”. (Zanetti, 2003; De Smet e Contreras, 2005; Lei *et al.*, 2019).

A catelicidina LL-37 é produzida por diferentes tipos celulares presentes no sangue e é importante na erradicação de infecções bacterianas causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, promovendo citotoxicidade tanto pela formação direta de poros nas membranas bacterianas quanto pela exacerbação da resposta imune por indução de produção de citocinas e quimiocinas (Friberg *et al.* 2020). LL-37 também inibe a ligação do LPS ao receptor CD14 em fagócitos mononucleares impedindo a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α). Além disso, foi apontado em um estudo de Fabisiak e colaboradores, de 2016, que essa catelicidina pode ser um fator iniciador da formação de NETs, tendo o papel de evitar a degradação delas por nucleases bacterianas (Fabisiak *et al.*, 2016).

A hNP-11 (*Human neutrophil peptide-1*), uma das mais importantes defensinas humanas, é produzida por estimulação de receptores TLRs, como o TLR-2, TLR-3 e TLR-5 e liberada nos grânulos de neutrófilos (Martin *et al.*, 2015). Além disso, os hNP 1-3 são quimiotáticos para monócitos, células dendríticas imaturas, linfócitos TCD4+ e TCD8+ e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- λ , IL-6, e IL-10, TNF- α e IL-1 β (Yang *et al.*, 2000; Lehrer e Ganz, 2002). Foi também observado seu possível papel na sepse, uma vez que as concentrações de hNP-1 no plasma desses pacientes eram elevadas em comparação a pacientes controle gravemente doentes (Martin *et al.*, 2015). Estudos já demonstraram a susceptibilidade de diversas linhagens de *S. aureus* a hNP-1 (Ericksen *et al.*, 2005; Pérez-Montarelo *et al.*, 2017), e essa defensina pode também ser inativada por mecanismos de evasão de *S. aureus*, tal como a sua degradação pela enzima estafiloquinase (Bokarewa, Jin e Tarkowski, 2006).

1.4 Patogenicidade e fatores de virulência

No início do processo infeccioso, as cepas de MRSA utilizam suas adesinas de superfície para sua ligação às células do hospedeiro, principalmente em tecidos danificados por traumas ou feridas, proporcionando assim a sua aderência e multiplicação nesses sítios. Várias adesinas de natureza principalmente proteica são alocadas no grupo das MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*), ou seja, componentes da célula bacteriana expressos em sua superfície que são capazes de reconhecer moléculas da matriz do hospedeiro, como laminina, fibronectina, vitronectina, colágeno, dentre outras (Foster, 2019).

Exemplos de adesinas estafilocócicas são o fator *clumping* B (codificado pelo gene *ClfB*) e as proteínas de superfície G e X (genes *SasG*, *SasX*), os quais se ligam às células epiteliais nasais. *SasX* é importante também para a formação de biofilme e evasão do sistema imune, promovendo a agregação bacteriana e consequente diminuição da fagocitose por neutrófilos, sendo o provável motivo para o sucesso e espalhamento da linhagem ST239 de MRSA na Ásia (Otto, 2012; Botelho *et al.*, 2019). Já as FnBPA e FnBPB (*Fibronectin Binding Protein A and B*) têm suma importância por se ligarem à fibronectina e ao fibrinogênio, componentes notáveis da matriz celular. A ligação do *S. aureus* à fibronectina também promove invasão celular, por um processo semelhante à endocitose, o qual envolve integrinas da célula hospedeira (Foster, 2019). Cna é uma proteína de superfície de *S. aureus* que se liga ao colágeno, e parece ter um papel em infecções como a artrite séptica e a osteomielite (Cheung, Bae e Otto, 2021).

A adesão de *S. aureus* também pode ocorrer em superfícies abióticas, como cateteres, próteses e equipamentos de ventilação mecânica, onde frequentemente há formação de biofilmes. Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade microbiana envolta em matriz extracelular formada por substâncias poliméricas de natureza polissacarídica, proteica e/ou DNA, produzida pela própria comunidade, que pode estar aderida tanto a superfícies bióticas ou abióticas. Estudos com *S. aureus* já evidenciaram que o fenótipo de células no ambiente de biofilmes (células sésseis) é distinto das células livres no meio (planctônicas). Tais diferenças se refletem no metabolismo e em outras funções fisiológicas das bactérias, devido à expressão diferencial de genes entre células planctônica e sésseis (Otto, 2018). Durante o desenvolvimento do biofilme, células bacterianas podem se destacar desses dispositivos, levando a infecções em sítios vitais, como é o caso da bacteremia, principalmente no caso do uso de cateter endovenoso central, e da pneumonia relacionada ao uso de ventilação mecânica (Figueiredo *et al.*, 2017;

Ciandrini *et al.*, 2020). Esse é um problema de interesse mundial, por ser muito atrelado à promoção de infecções secundárias, que se estabelecem em pacientes já acometidos por outras doenças, como por exemplo, a Influenza e a COVID-19, podendo *S. aureus* ser a causa de muitas mortes nesses cenários (Cusumano *et al.*, 2020).

Além de se aproveitar da quebra de barreira epitelial, *S. aureus* também pode, por si só, adentrar os tecidos, utilizando, por exemplo, a α -toxina para promover a clivagem de moléculas E-caderinas (importantes na adesão célula-célula) e assim, impactando as junções e citoesqueleto de actina das células do hospedeiro. A α -toxina é uma proteína formadora de poros, fazendo citólise de diversas células, entre elas os leucócitos e hemácias, e sua ação se dá a partir da ativação de receptores ADAM10, que possuem os domínios metaloprotease e desintegrina. Desintegrinas são potentes inibidores da agregação de plaquetas e da adesão celular integrina-dependente (Inoshima *et al.*, 2012; Berube e Wardenburg, 2013).

Infecções iniciais podem evoluir e adquirir caráter sistêmico a partir da invasão da corrente sanguínea, mediada por proteínas que promovem invasão de células endoteliais, e facilitada por mecanismos de escape do sistema imune. Entre os mecanismos de escape em *S. aureus* podemos citar proteases, inibidores de quimiotaxia e de fagocitose, inibidores de ação do complemento e de ligação a anticorpos, além de moléculas capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Gimza *et al.*, 2019; de Jong, van Kessel e van Strijp, 2019; Cheung, Bae e Otto, 2021).

Nesse cenário de evasão das estratégias de defesa do hospedeiro, as proteases apresentam diferentes funções, podendo neutralizar os peptídeos antimicrobianos e os componentes opsonizantes do sistema imune. Entre essas estão as proteases V8, serino-proteases *splABCDEF*, cisteína proteases *scpA*, metaloprotease aureolisina e staphopain (*sspB* e *sspC*; Gimza *et al.*, 2019). A aureolisina é uma metaloprotease capaz de clivar o componente C3 do sistema complemento, de maneira dependente de zinco, e estudos sugerem que essa proteína age de forma a mimetizar a ação das C3 convertases que convertem o C3 em C3a' e C3b'. Essa função mímética da aureolisina é provocada pela similaridade entre o sítio de clivagem da aureolisina e o sítio de ação da C3 convertase, que diferem em apenas dois aminoácidos. Além disso, a aureolisina é importante para a degradação e consequente inativação da catelicidina LL-37, que tem importante papel na resposta contra os *S. aureus* (de Jong, van Kessel e van Strijp, 2019). As serino-proteases são importantes moléculas que participam da maturação de outros produtos microbianos importantes para a virulência (Paharik *et al.*, 2016). A contribuição da serino-protease D para a patogênese de *S. aureus* ainda é pouco

elucidada, porém acredita-se que tais proteínas possam modular proteínas hospedeiras importantes para a patogênese bacteriana a partir de proteólise. Foi também sugerido que tal protease poderia atuar na hidrólise de receptores olfativos, contribuindo para a persistência dos estafilococos nas narinas em conjunto com outros componentes do operon *splABCDEF* (Zdzalik *et al.*, 2013).

Adicionalmente, *S. aureus* produzem nucleases que podem clivar as NETs produzidas por neutrófilos (Foster *et al.*, 2014; Herzog *et al.*, 2019), caracterizando um importante mecanismo de evasão do sistema imune. Já o gene *spa*, que codifica a proteína A de superfície de *S. aureus*, também pode promover a evasão do sistema imune, a partir da sua ligação à região Fc das IgGs (Imunoglobulinas G), o que promove a inibição dos processos de opsonização e fagocitose do hospedeiro. Além disso, a proteína A também atua como superantígeno de linfócitos B ao se ligarem à porção Fab das IgMs (Goodyear e Silverman, 2003; Cheung, Bae e Otto, 2021).

Entre as diversas leucocidinas de *S. aureus*, uma das mais estudadas é a leucocidina de Panton-Valentine (*Panton-Valentine Leukocidin*, PVL), que é formada por um sistema de dois componentes codificados pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*. O componente S reconhece um receptor de quimiocinas, recrutando o componente F, levando a dimerização das duas subunidades e, finalmente, à formação de poros na membrana da célula hospedeira (Alonzo e Torres, 2014). Outra estratégia utilizada por algumas cepas de MRSA é a produção de uma microcápsula polissacarídica que impede a opsonização e ação do sistema complemento, estando, porém, ausente em diversos clones epidemiologicamente importantes, como no clone norte-americano USA300 (Mohamed *et al.*, 2019). Proteínas como a Molécula Estafilocócica Ligadora de IgG Sbi (*Staphylococcal binder of immunoglobulin*) e a Proteína Homóloga a Superantígeno Estafilocócico SSL10 (*Staphylococcal superantigen-like 10*) participam no escape do sistema imune, por possuírem como foco a ligação na porção Fc das IgGs, prevenindo a fagocitose opsônica (Nasser *et al.*, 2019).

Outra interessante tática de evasão é a produção da Proteína Estafilocócica de Inibição ao Complemento SCIN (*Staphylococcal Complement Inhibitor*), codificada pelo gene *scn*, que inibe todas as três vias de ativação do sistema complemento. Isso acontece pelo fato desta proteína atuar na ligação, estabilização e inibição da C3 convertase, esta última importante na conversão de C3 em C3b. Logo tal mecanismo impede tanto a deposição de C3b como também a formação de C5a, um componente importante do sistema complemento que possui ação quimiotática (Sultan *et al.*, 2018). O escape de neutrófilos e suas espécies reativas de oxigênio

acontece devido a vários componentes bacterianos, entre eles a superóxido-dismutase (SOD), a qual converte o íon superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, a catalase (Cat), que tem como alvo o peróxido de hidrogênio e a alquil hidroperóxido redutase, esta última formada pelas subunidades AhpC e AhpC, que reduz o peróxido orgânico (Cheung, Bae e Otto, 2021).

No curso de infecções por MRSA podem entrar em ação alguns componentes bacterianos tóxicos, por exemplo as enterotoxinas que atuam como superantígenos, ativando inespecificamente células T e levando a hiperinflamação por liberação excessiva de citocinas. As enterotoxinas produzidas por *S. aureus*, como a enterotoxina P, são as responsáveis por casos de intoxicação alimentar por essa bactéria. Tal intoxicação acontece a partir da ingestão de toxinas já pré-formados em alimentos mal conservados.

Os mecanismos pelos quais as enterotoxinas causam êmese têm sido desvendados mais recentemente (Hu *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 2019). Estudos de ensaios eméticos realizados com saguis demonstraram que os mastócitos da submucosa do trato gastrointestinal e a histamina desempenham papéis críticos na emese induzida pela Enterotoxina A (SEA) nesses animais (Ono *et al.* 2019). Portanto, a partir desses estudos foi demonstrado que a ligação direta dessa enterotoxina com mastócitos induz a liberação de histamina, que atua contra o nervo serotoninérgico e/ou outro nervo vago. Adicionalmente, os estudos indicaram que tal estimulação poderia ser transmitida ao centro do vômito, causando reflexo de vômito. Além disso, esse mesmo grupo de autores já havia demonstrado que o aumento de serotonina pelos mastócitos também desempenha um papel importante na transmissão da estimulação emética no nervo vago aferente ou no sistema nervoso central (Hu *et al.*, 2007, Ono *et al.*, 2019). Também parece possível que a liberação aumentada de citocinas poderia, da mesma forma, contribuir para o aumento de serotonina, e conseqüente indução do vômito (Hu e Nakane, 2014). É importante ressaltar que o gene que codifica a enterotoxina P (*sep*) faz parte de um elemento genético móvel de origem fágica conhecido como Cluster de Evasão Imune (*Immune Evasion Cluster*, IEC), juntamente com os genes *chp*, *sak*, *scn* e *sea* (Ahmadrajabi *et al.*, 2017), que codificam, respectivamente, para as Proteínas de Inibição de Quimiotaxia (*Chemotaxis Inhibitory Protein*, CHP), Estafiloquinase, Proteína Inibidora de Complemento (*Staphylococcal Complement Inhibitor*, SCIN) e Enterotoxina A. Diferentes combinações desses genes podem ser encontradas dentro do IEC carregados por diferentes cepas.

S. aureus também produzem diversas modulinas fenol-solúveis (*Phenol-soluble modulins*, PSM). PSMs podem atuar formando poros na membrana de células de defesa levando à lise, auxiliar na sobrevivência bacteriana dentro de fagócitos e, ainda, desempenhar um papel

na arquitetura e no destacamento do biofilme (Fogel e Wardenburg, 2022). Já a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST1) estimula a produção exacerbada de IL-1, IL-2 e TNF- α , por ser um potente superantígeno, sendo sua ocorrência uma potencial ameaça pois pode agravar os quadros de infecções invasivas por *S. aureus*, levando a uma síndrome conhecida como Síndrome do Choque Tóxico, a qual pode levar o indivíduo a morte em poucos dias. Os superantígenos enterotoxinas B e C também podem levar a uma síndrome semelhante (Schlievert e Davis, 2020). A tabela a seguir (Tabela 1) resume os principais fatores de virulência de *S. aureus* citados anteriormente.

Tabela 1 - Fatores de virulência e evasão importantes de *Staphylococcus aureus*

| FUNÇÃO | FATOR DE VIRULÊNCIA | GENE CODIFICANTE |
|-----------------------------------|---|---|
| Adesão | Fator Clumping | <i>clfA</i> e <i>clfB</i> |
| Adesão | FnBPs (<i>Fibronectin binding proteins</i>) | <i>fnbA</i> e <i>fnbB</i> |
| Adesão | CNA (<i>Collagen binding protein</i>) | <i>cna</i> |
| Adesão; biofilme; modulação imune | Proteínas de superfície G e X | <i>SasG</i> , <i>SasX</i> |
| Biofilme | Proteínas de adesão intercelular | <i>icaR</i> , <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> |
| Exoenzima; modulação imune | Protease V8 | <i>sspA</i> |
| Exoenzima; modulação imune | Serino-proteases splABCDEF | <i>splA</i> , <i>splB</i> , <i>splC</i> , <i>splD</i> , <i>splE</i> , <i>splF</i> |
| Exoenzima; modulação imune | <i>Staphopain</i> | <i>sspB</i> e <i>sspC</i> |
| Exoenzima; modulação imune | Cisteíno-protease scpA | <i>scpA</i> |
| Exoenzima; modulação imune | Metaloprotease aureolisina | <i>aur</i> |
| Exoenzima; modulação imune | Termonuclease nuc | <i>nuc</i> |
| Exotoxina; modulação imune | SpA (<i>Staphylococcal protein A</i>) | <i>spa</i> |
| Exotoxina; modulação imune | PVL (<i>Panton-Valentine leukocidin</i>) | <i>lukS-PV</i> e <i>lukF-PV</i> |
| Exotoxina; modulação imune | PSMs (<i>phenol-soluble modulins</i>) | locus <i>psma</i> |
| Exotoxina; modulação imune | α -toxina | <i>hla</i> |
| Exoenzima; modulação imune | Estafiloquinase | <i>sak</i> |
| Modulação Imune | CHP (<i>Chemotaxis Inhibitory Protein</i>) | <i>chp</i> |

| | | |
|-----------------|---|---------------|
| Modulação Imune | Microcápsula | - |
| Modulação imune | Sbi (<i>Staphylococcal binder of immunoglobulin</i>) | <i>sbi</i> |
| Modulação Imune | Superóxido-dismutase | <i>sod</i> |
| Modulação Imune | Catalase | <i>cat</i> |
| Modulação Imune | CHP (<i>Chemotaxis Inhibitory Protein</i>) | <i>chp</i> |
| Modulação Imune | SCIN (<i>Staphylococcal Complement Inhibitor</i>) | <i>scn</i> |
| Exotoxina | Enterotoxina P | <i>sep</i> |
| Exotoxina | SSLs (<i>Staphylococcal superantigen-like proteins</i>) | <i>set</i> |
| Exotoxina | Enterotoxina A | <i>sea</i> |
| Exotoxina | TSST-1 (<i>toxic shock syndrome toxin-1</i>) | <i>tsst-1</i> |

Os fatores de virulência são finamente regulados por diversos mecanismos, muitos deles pouco elucidados. Porém, um dos mais importantes componentes dessa rede regulatória é o sistema Agr (*Accessory gene regulator*). Este sistema é acionado em alta densidade populacional bacteriana, devido ao acúmulo do peptídeo autoindutor do sistema Agr (*Autoinductor Peptide*, AIP), promovendo a regulação positiva de diversos genes como os que codificam proteases extracelulares, enterotoxinas e PSMs. A função regulatória do Agr é devido à proteína transcricional AgrA que controla, por exemplo, os PSMs, e ao RNAIII, que atua inibindo Rot (um repressor de toxinas), levando então ao aumento de exoproteínas. Adicionalmente, o RNAIII pode se ligar diretamente ao RNA mensageiro inibindo a sua tradução, como ocorre com o gene *spa*, que codifica a proteína A (Le e Otto, 2015).

1.5 Estrutura populacional de MRSA

Uma característica importante dos MRSA é a estrutura clonal de sua população. Acredita-se que alguns clones sejam melhor adaptados sob determinadas condições (ex.: geográficas, determinados nichos do hospedeiro, faixa etária dos pacientes etc.), predominando em determinados contextos (Facone *et al.*, 2014; Botelho *et al.*, 2019; Takadama *et al.*, 2020; Viana *et al.*, 2021). De forma a caracterizar as linhagens/clones de MRSA e compreender seus

mecanismos evolutivos, são utilizadas algumas técnicas moleculares. A mais aceita atualmente é a tipagem de sequenciamento de multilocus (*Multilocus Sequence Typing*, MLST). Esse método se baseia na análise de parte da sequência de nucleotídeos de sete genes constitutivos dessa espécie bacteriana (Enright *et al.*, 2000). Ao perfil alélico único dessas sete sequências é assinalado uma sequência-tipo (ou *Sequence-type*, ST). Complexos clonais (CC) são definidos como grupos de ST onde cada ST compartilha pelo menos cinco dos sete alelos idênticos com pelo menos um outro ST deste grupo (Figura 1). Ao diferenciar e agrupar amostras de MRSA geneticamente próximas, o MLST permite algumas inferências ao estudo epidemiológico da propagação desses microrganismos. Essa técnica, portanto, exige a amplificação, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ou WGS dos fragmentos dos sete genes, seguido de sequenciamento genético e análise dos polimorfismos. Porém, é preciso salientar que cepas pertencentes a clones diferentes podem apresentar o mesmo ST. Assim, outras técnicas são necessárias para caracterizar os clones, diferenciando amostras de um mesmo ST, e assim permitir uma avaliação epidemiológica mais apurada.

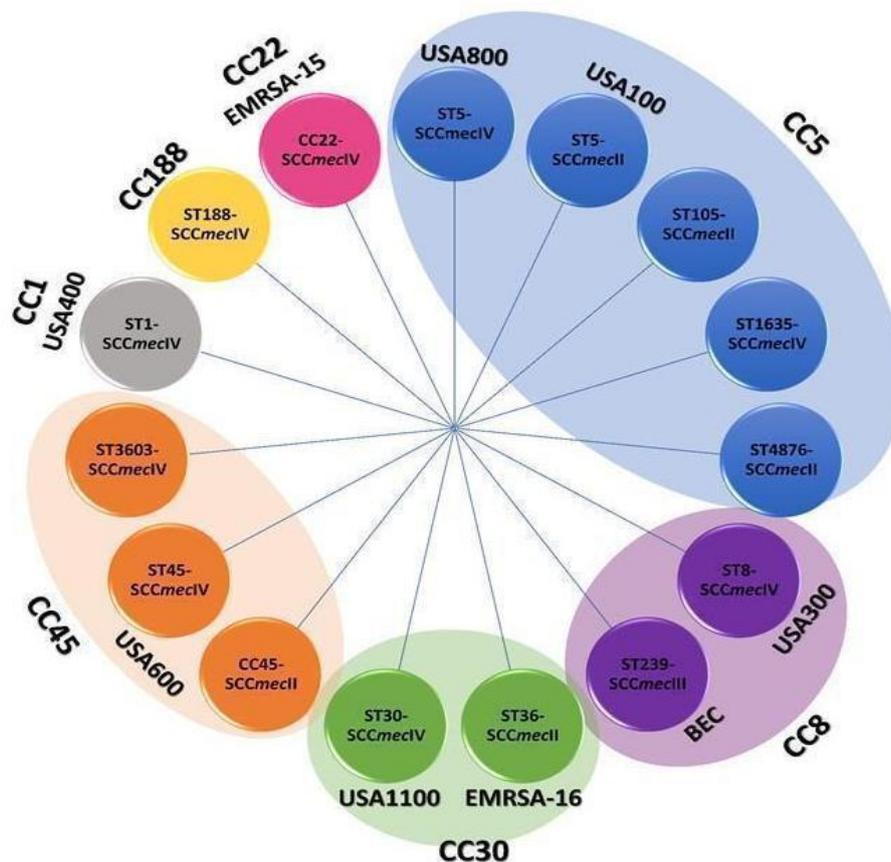


Figura 1 - Esquema representativo da organização das principais Sequências-tipo (ST) agrupadas em Complexos Clonais (CC) de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. CC= complexo clonal; ST= sequência-tipo; EMRSA = *Epidemic Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*, BEC = *Brazilian Epidemic Clone*.

Por esse motivo, juntamente com o MLST é realizada frequentemente a tipagem do *SCCmec*, de forma a melhor diferenciar as linhagens de MRSA. A tipagem do *SCCmec* usualmente se faz através da técnica de PCR, utilizando como alvo elementos específicos presentes no *SCCmec*. Adicionalmente, pode-se associar o MLST e a tipagem do *SCCmec* à tipagem do gene *spa*, que codifica a proteína A. Sua tipagem se baseia no sequenciamento e análise dos polimorfismos de uma região de repetição presente na sua região codificante (Frénay *et al.*, 1996). Apesar da associação dessas três técnicas serem muito utilizadas para a discriminação dos MRSA, em determinados casos, somente o sequenciamento completo de genomas (*Whole-genome sequencing*, WGS) apresenta uma resolução mais acurada das linhagens envolvidas em determinados surtos, principalmente quando clones distintos apresentam o mesmo tipo de MLST e de *SCCmec* (Beukers *et al.*, 2020).

Apesar de as amostras de MRSA estarem frequentemente associadas aos hospitais e outros serviços de atenção à saúde, as cepas resistentes à meticilina também causam infecções em indivíduos sadios, fora de instituições de saúde. De acordo com o CDC, pode-se definir uma infecção como comunitária quando a amostra de MRSA é isolada com menos de 48 h após a admissão hospitalar, não havendo histórico nos 12 meses anteriores à hospitalização de cirurgias, uso de cateteres permanentes ou de dispositivos médicos percutâneos, residência numa instituição de saúde a longo prazo, diálise, cultura prévia de MRSA, ou visitas ambulatoriais frequentes. Em casos que não se enquadrem nesta definição, a infecção é definida como hospitalar ou associada aos cuidados à saúde (Henderson e Nimmo, 2018). Desta forma, MRSA podem ser classificados como HA-MRSA (MRSA associados aos hospitais ou relacionados à assistência à saúde ou *Healthcare-associated MRSA*) ou CA-MRSA (MRSA adquiridos na comunidade ou *Community-associated MRSA*). As linhagens típicas de CA-MRSA podem, com certa frequência, se disseminar também em hospitais, causando infecções (Silva-Carvalho *et al.*, 2009). Porém, linhagens hospitalares clássicas, que frequentemente apresentam múltipla resistência aos antimicrobianos, raramente são observadas causando infecções em indivíduos sadios da comunidade (Figueiredo, 2017).

Existem várias diferenças fenotípicas, epidemiológicas e genéticas entre linhagens de HA-MRSA e CA-MRSA. CA-MRSA usualmente possuem os genes *lukS-PV* e *lukF-PV* (que codificam a leucocidina PVL), são normalmente suscetíveis a antimicrobianos não β -lactâmicos e carregam, tipicamente, *SCCmec* tipos IV ou V (Kateete *et al.*, 2019). Entre os CA-MRSA mais frequentemente isolados podemos citar as linhagens ST30(CC30)-*SCCmec*IV e ST8(CC8)-*SCCmec*IV (relacionados aos clones conhecidos como USA1100 e USA300;

respectivamente). Linhagens carreando PVL têm sido associadas às pneumonias e outras infecções necrotizantes (David e Daum, 2017).

Cepas de HA-MRSA, por sua vez, raramente carregam os genes codificantes para a PVL. Dentre as linhagens de HA-MRSA mais disseminadas no mundo encontram-se ST5(CC5)-SCC*mec*II, ST5(CC5)-SCC*mec*IV e ST239(CC8)-SCC*mec*III, relacionadas aos clones USA100 (clone New York/Japan), USA800 (clone Pediátrico) e clone Epidêmico Brasileiro (BEC); respectivamente). Ao contrário de CA-MRSA, cepas de HA-MRSA são, frequentemente, resistentes a agentes antimicrobianos não β -lactâmicos, como os aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas e fluoroquinolonas. Além disso, carregam principalmente SCC*mec* tipos I, II, ou III e podem causar infecções mais graves como infecções na corrente sanguínea (Kateete *et al.*, 2019).

Globalmente, as bacteremias provocadas por *S. aureus* são causadas em grande parte por cepas resistentes à meticilina, o que dificulta o tratamento e diminui a taxa de sobrevivência nesse tipo de infecção (Hassoun, Linden e Friedman, 2017). As infecções na corrente sanguínea levam, não raramente, a infecções sistêmicas graves e de difícil resolução, como a endocardite, sepse, osteomielite e choque séptico (Van Hal *et al.*, 2012). Infecções por MRSA são mais raras em países industrializados e com forte vigilância epidemiológica e hospitalar, como Dinamarca, Noruega e Suécia, ainda que seja observada uma tendência de crescimento do número de casos de bacteremia causados por *S. aureus* ao longo dos anos (Laupland, 2013; Paulsen *et al.*, 2015; Thorlacius-Ussing *et al.*, 2019; Eriksson *et al.*, 2019). Por exemplo, no condado de Nord-Trøndelag, na Noruega, entre os anos 1996 e 2011, a prevalência de MRSA em bacteremias causadas por *S. aureus* foi de apenas 0,8% (Paulsen *et al.*, 2015). No entanto, a situação é diferente em muitos países menos industrializados. Chile, Venezuela e Peru, por exemplo, têm porcentagens de MRSA em infecções da corrente sanguínea causadas por *S. aureus* que variam de 40 a 57%, enquanto o Brasil apresentou a maior taxa da América Latina no mesmo estudo, com prevalência de 62% de MRSA em amostras de bacteremia (Arias *et al.*, 2017).

1.6 O Complexo Clonal 5 (CC5)

As amostras CC5 têm aumentado em incidência em diferentes regiões do mundo (Gu *et al.*, 2020; Tkadlec *et al.*, 2021), inclusive no Rio de Janeiro, como apontado em um estudo recente conduzido pelo nosso grupo (Viana *et al.*, 2021). Dentre as amostras pertencentes ao CC5, as mais frequentes pertencem a linhagem ST5-SCC*mec*II (relacionadas ao clone New

York/Japan) e ST5(CC5)-SCCmecIV (relacionada ao clone Pediátrico; Roberts *et al.*, 2000; Enright *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2004). O clone Pediátrico foi inicialmente identificado em uma unidade pediátrica, em Portugal, por isso recebeu essa denominação. Desde então, vem sendo encontrado em vários outros países, inclusive no Brasil (Sá-Leão *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2000; de Miranda *et al.*, 2007; Sousa-Junior *et al.*, 2009, Viana *et al.* 2021). Além dos SCCmecII e IV, cepas ST5 podem também carrear outros tipos de SCCmec como os tipos I e V (Challagundla *et al.*, 2018).

A partir de 1998, surgiram relatos de amostras pertencentes ao ST105, uma linhagem também pertencente ao CC5 e que parece ter se originado a partir do ST5 (Challagundla *et al.*, 2018). Quando classificados pela MLST, a única diferença entre as amostras ST105 e ST5 é uma mutação pontual no alelo *yqiL* (Blanc *et al.*, 2007; Read, T. D., *et al.* 2020; Ferreira *et al.* 2021). Por ser uma linhagem que surgiu mais recentemente, pouco se conhece sobre as cepas ST105. No entanto, dados recentes apontam para a sua ampla disseminação em hospitais da cidade do Rio de Janeiro, predominando em amostras isoladas de infecções na corrente sanguínea (Viana *et al.*, 2021).

Estudos filogenéticos e análises genômicas trouxeram possíveis evidências sobre o caminho evolutivo traçado por cepas pertencentes ao CC5. Ao longo da evolução que originou as cepas ST105 a partir de um ancestral ST5, alguns fatores de virulência como o gene que codifica a enterotoxina P (*sep*) e o gene da serino-protease D (*splD*) foram perdidos. No entanto, o ST105 adquiriu o fenótipo de resistência às fluoroquinolonas (Challagundla *et al.*, 2018, Viana *et al.*, 2021). Segundo Viana e colaboradores (2021) e Challagundla e colaboradores (2018), a perda do gene *sep*, mesmo na presença de outros genes do IEC, foi anterior à diversificação das ST5 em ST105, sendo ausente em uma subpopulação de ST5, e sua perda foi mantida em toda população ST105 que se sucedeu à diversificação clonal do ST5 para ST105. Já o gene para a serino-protease D (*splD*) é encontrado compondo o operon *splABCDEF* de forma intermitente ao longo da evolução das ST5 e parece ter sido definitivamente excluído do genoma acessório das ST5-MRSA por um ancestral próximo ao da diversificação do clone ST105 (Viana *et al.*, 2021). É possível que a perda desses fatores de virulência citados esteja associada a uma vantagem adaptativa das cepas ST105, o que permanece por ser estudado (Viana *et al.*, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

Um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa (Viana *et al.*, 2021), realizado com 600 amostras de MRSA, teve como objetivo promover um painel multicêntrico sobre a epidemiologia molecular de MRSA na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, bem como uma análise filogenética e evolutiva das cepas CC5, predominantes na Região. Tais amostras foram isoladas de 2014 a 2017, a partir de 51 hospitais localizados nessa Região, e obtidas de sangue, outros sítios de infecção e colonização nasal. A partir dos dados de Viana *et al.* (2021) foi possível constatar que cepas da linhagem ST239-SCC*mec*III (BEC), as quais anteriormente foram caracterizadas como as mais prevalentes nos hospitais brasileiros, foram substituídas por cepas CC5, independentemente do sítio clínico ou hospital analisado.

Analisando por origem clínica as amostras classificadas como CC5, Viana *et al.* (2021) relataram que três principais linhagens encontradas no sangue foram ST105-SCC*mec*II (54,7%), ST5-SCC*mec*II (29,4%) e ST5-SCC*mec*IV (25,6%). Buscando desvendar os eventos evolutivos que ocorreram durante a evolução das amostras CC5, e que levaram a origem e possível especialização das cepas ST105-SCC*mec*II para causar infecções na corrente sanguínea, foram realizadas, por aqueles autores, análises genômicas e filogenômicas de 180 amostras CC5. Essas análises genômicas apontaram algumas características das cepas ST105 brasileiras (denominadas clone RdJ na publicação citada) como:

- a) uma mutação pontual não-sinônima no gene *aur* (que codifica a metaloprotease aureolisina);
- b) ausência de *spID* (que codifica a serino-protease D),
- c) ausência de *sep* (que codifica o superantígeno enterotoxina P).

Além disso, os autores observaram que cepas ST105-SCC*mec*II isoladas no Rio de Janeiro resistiram mais à fagocitose em ensaios utilizando monócitos da linhagem THP-1, além de apresentarem taxas de sobrevivência aumentada após interação com as células monocíticas, quando comparadas com ST5-SCC*mec*IV e ST5-SCC*mec*II (Viana *et al.*, 2021). Embora as alterações genéticas citadas remontem a história da evolução do clone ST105 brasileiro, seu impacto na epidemiologia e na sua prevalência em infecções na corrente sanguínea é desconhecido. Através da estratégia de clonagem molecular, é possível comparar cepas isogênicas que diferem apenas pela presença ou ausência de um determinado gene, ou que apresentem diferentes alelos, no caso do *aur*, e assim analisar o papel desses determinantes na capacidade de evasão do sistema imune do clone ST105-SCC*mec*II de MRSA.

3 OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo – o qual é parte do projeto de Tese de Doutorado de Alice Slotfeldt Viana, cujos experimentos foram realizados sob a supervisão e coorientação da mesma – consistiu em pesquisar uma possível vantagem da perda do gene *splD*, por cepas do clone RdJ (ST105-SCC*mecII*), nas infecções de corrente sanguínea. Para abordar essa questão, escolhemos pesquisar determinados aspectos da evasão do sistema imune que são importantes na defesa contra infecções na corrente sanguínea, utilizando as seguintes estratégias:

- a) Analisar um possível papel da SplD na sobrevivência de amostras clínicas (SplD negativas ou SplD positivas), e ainda de cepas isogênicas MW2D (SplD positiva) e MW2B (SplD negativa), frente aos peptídeos antimicrobianos catelicidina humana LL-37 (produzida por neutrófilos e macrófagos) e a defensina hNP-1 (produzida por neutrófilos e monócitos).
- b) Avaliar um possível papel da SplD na fagocitose por monócitos THP-1 utilizando as cepas isogênicas MW2B (SplD negativa) e MW2D (SplD positiva), e ainda a SplD recombinante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção das amostras bacterianas utilizadas neste estudo

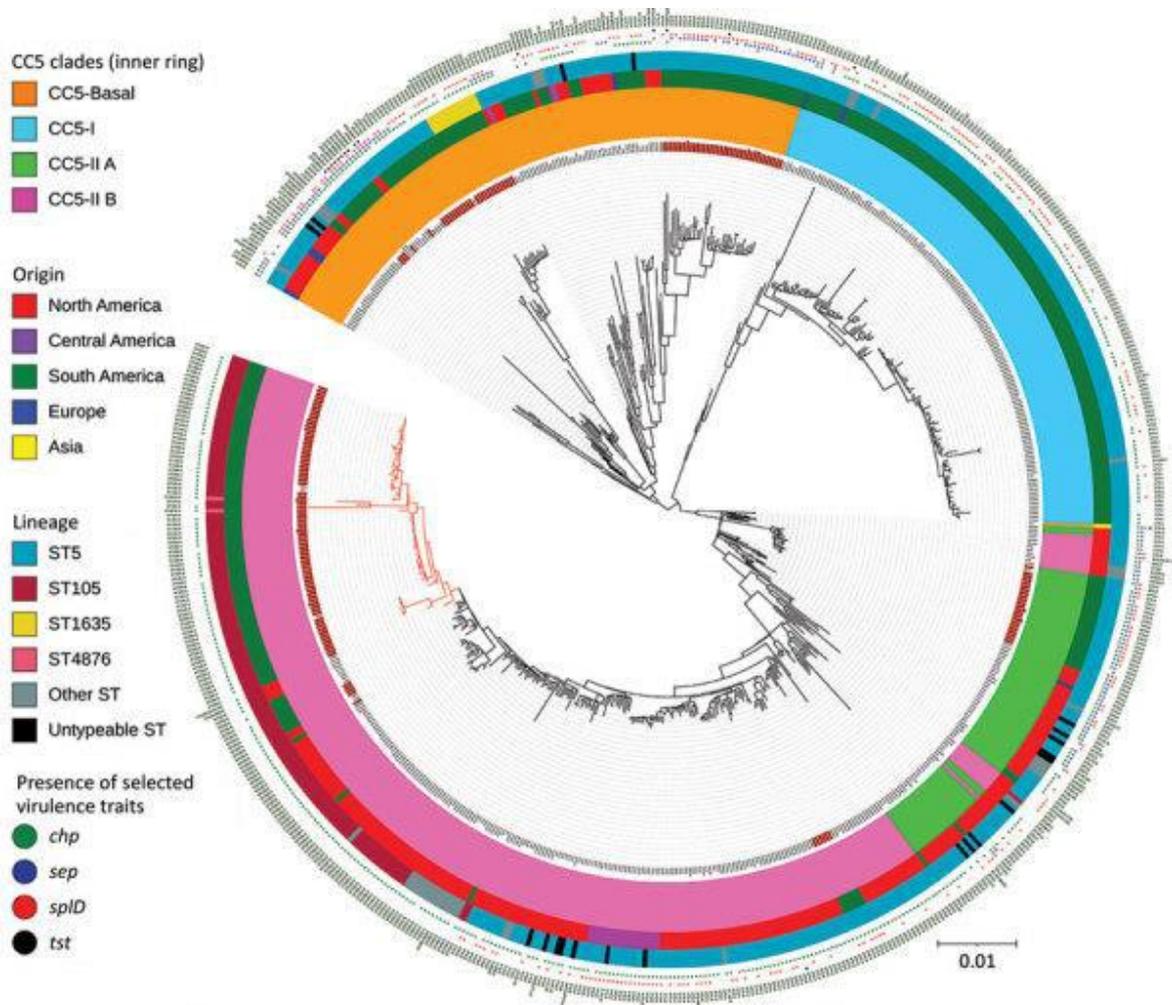


Figura 2 – Árvore filogenética das amostras pertencentes ao Complexo Clonal 5 coletadas, sequenciadas e incluídas no estudo de Viana e colaboradores (2021).

No estudo de Viana e colaboradores (2021), foi descrita a distribuição em uma árvore filogenética das amostras CC5 coletadas no Rio de Janeiro que foram sequenciadas pelo nosso grupo (Figura 2). Dessa forma, verificamos que na clade filogenética mais basal (CC5-Basal) se agrupam as amostras da que possuem *SCCmecIV*, como a linhagem ST5-*SCCmecIV*. Já uma parte das amostras ST5-*SCCmecII*, com perfil multirresistente, se agrupam na clade CC5-II A e as ST105-*SCCmecII* surgem por diversificação das ST5-*SCCmecII* na clade CC5-II B. Com base nessa distribuição, foram selecionadas, no trabalho citado, 2 amostras representativas de cada linhagem que se agrupavam em cada uma das clades citadas, para a realização dos ensaios de fagocitose. Tendo em vista os resultados obtidos e validados, foram utilizadas neste estudo

uma amostra de cada linhagem, dentre as duas utilizadas para os ensaios de sobrevivência aos peptídeos antimicrobianos pelo estudo anterior (Tabela 2).

Tabela 2 - Amostras bacterianas selecionadas para o ensaio de sobrevivência na presença de hNP-1 e catelicidina humana LL-37.

| Linhagem | Amostra | Origem Clínica |
|-----------------------------------|----------|----------------|
| ST5-SCC <i>mecIV</i> ^a | CR14-026 | Swab nasal |
| ST5-SCC <i>mecII</i> | CR15-071 | Swab nasal |
| ST105-SCC <i>mecII</i> | CD16-016 | Sangue |

^aST – *Sequence Type* obtido por *Multilocus Sequence Typing* (MLST); SCC*mec* – Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*

Além das cepas clínicas selecionadas, as cepas isogênicas MW2D (*splD* positiva) e MW2B (*splD* negativa) (Côrtes *et al.* 2021) foram também analisadas, a fim de avaliar um possível papel da serino-protease D na susceptibilidade das amostras aos peptídeos antimicrobianos. Essas amostras foram manipuladas geneticamente em nosso laboratório, através da estratégia de clonagem molecular, conforme descrito anteriormente por Côrtes *et al.* (2021). Os procedimentos descritos seguir foram realizados em etapa anterior da pesquisa do nosso grupo e foram incluídos neste estudo para entendimento da construção das amostras mutantes utilizadas nesta etapa da pesquisa.

4.2 Construção das amostras mutantes isogênicas contendo ou não o gene *splD*

As amostras mutantes foram obtidas a partir da transformação por eletroporação da amostra selvagem MW2, que é relacionada ao clone USA400 [linhagem ST1(CC1)-SCC*mecIV*], e apresenta todos os genes do operon *spl* (*splABCEF*), exceto o gene *splD*, sendo portanto um nocaute natural para *splD*. A cepa MW2B é a amostra derivada da cepa MW2, porém contendo o vetor pCNB vazio. O vetor pCNB corresponde ao vetor pCN49 no qual foi clonado um promotor de expressão *P_{blaZ}* (pCN49:*P_{blaZ}*). Já a cepa MW2D é um clone isogênico da MW2B, na qual foi clonado o pCN49:*P_{blaZ}-splD*, ou seja, possui o gene *splD* clonado no pCN49 (pCN49-*splD* ou pCND). O fragmento genético correspondente à sequência do gene *splD* foi obtido a partir da amostra 08-28 (relacionada ao clone USA400; parte da coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, IMPG/UFRJ) por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonado no plasmídeo de expressão pCN49. O pCN49 foi obtido a partir

da cepa de *S. aureus* RN9610, cedida pelo pesquisador Dr. Richard Novick, e é um plasmídeo vetor com marcador de resistência para a eritromicina (Charpentier *et al.*, 2004). Após amplificação por PCR do promotor P_{blaZ} , conforme protocolo de Charpentier *et al.* (2004) este inserto foi clonado primeiramente no vetor pGEM, sendo o plasmídeo recombinante inserido em células de *E. coli* DC10B. Essa etapa é importante uma vez que, por conta de uma mutação no gene codificador de *dam*-metilase nas DC10B, a subclonagem nas células de *S. aureus* é facilitada por conta da não metilação do DNA exógeno, que falha em ativar o sistema de restrição e modificação. Após isso, o inserto P_{blaZ} foi enfim retirado do pGEM e inserido no plasmídeo pCN49, originando o vetor de expressão pCN49B. A clonagem do gene *splD* no pCN49B ocorreu a partir dos mesmos passos utilizados para a clonagem do promotor P_{blaZ} , e tal plasmídeo passou a ser chamado de pCND (Bandeira, 2016).

4.3 Preparo dos inóculos bacterianos

Para a realização dos experimentos, as amostras bacterianas foram cultivadas em meio sólido tripticaseína de soja (*Trypticase Soy Agar*; TSA; Isofar, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a partir de um estoque de cultura pura mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de cultura TSB (*Trypticase Soy Broth*; TSB; Isofar, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) acrescido de glicerol para uma concentração final de 10%. Após incubação por 18 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, aproximadamente 2 a 3 colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo infusão de cérebro e coração (*Brain-Heart Infusion*; BHI; Isofar, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após incubação sob agitação (250 rpm) por 18 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a cultura bacteriana em fase estacionária foi diluída em novo tubo contendo caldo BHI até que fosse atingida a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) igual a 0.08. Desse tubo foi retirada uma alíquota necessária para que se atinja o número de células adequado para o ensaio (2×10^5), que foi avolumado em 1 mL de tampão fosfato de potássio 10 nM pH 7,4 em eppendorf e centrifugado a 6000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o pellet foi ressuspense em 1 mL de PBS, obtendo-se assim uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente 2×10^5 UFC/mL. As suspensões bacterianas foram utilizadas nos ensaios descritos a seguir (susceptibilidade a peptídeos antimicrobianos e ensaio de fagocitose).

4.4 Sobrevivência bacteriana na presença de hNP-1 e LL-37

Tendo em vista os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, que demonstraram que as bactérias da linhagem ST105-SCC*mecII* sobreviveram mais do que bactérias ST5-SCC*mecII* e ST5-SCC*mecIV* no sobrenadante das culturas de interação com monócitos THP-1

(Viana *et al.*, 2021), e considerando que esse efeito pode ser devido não somente a resistência à fagocitose aumentada das cepas ST105-SCC*mecII*, mas também a uma menor suscetibilidade aos peptídeos antimicrobianos, achamos importante testar a sobrevivência dessas linhagens bacterianas na presença desses peptídeos purificados. É sabido, por exemplo, que a aureolisina, uma importante metaloprotease de *S. aureus*, atua na inativação de peptídeos antimicrobianos, como a catelicidina LL-37 (Chavakis, Preissner e Herrmann, 2007) e, portanto, atua facilitando a evasão bacteriana. Em estudos anteriores de nosso grupo foi observado que a aureolisina das cepas ST105-SCC*mecII*, que se expandiram na cidade do Rio de Janeiro, apresenta uma substituição de aminoácido, no sítio de reconhecimento da protease, que poderia eventualmente afetar tal mecanismo aumentando ou diminuindo tal reconhecimento (Viana *et al.* 2021).

As taxas de sobrevivência em presença de concentrações variadas de hNP-1 e LL-37 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram calculadas através da inoculação das bactérias em soluções contendo os peptídeos antimicrobianos seguida da determinação de bactérias sobreviventes, após o período de incubação, conforme preconizado por Pérez-Montarelo *et al.* (2017) e Kraus *et al.* (2008).

As bactérias foram cultivadas em caldo BHI e as suspensões bacterianas foram preparadas conforme acima (Item 4.3). Alíquotas de 20 µL das suspensões bacterianas foram inoculadas em tubos tipo Eppendorf contendo 20 µL de solução dos peptídeos antimicrobianos em diferentes concentrações. As concentrações necessárias para o ensaio foram definidas a partir de diversos experimentos pilotos anteriores feitos com ambos os peptídeos, que demonstraram faixa de concentração ótima de 1,25 g/mL a 20 µg/mL em solução tampão fosfato de potássio 10 nM pH 7,4 no caso da defensina hNP-1 e de 0,5 µg/mL a 4 µg/mL para a catelicidina LL-37.

As culturas bacterianas foram ainda inoculadas em tubos controle contendo apenas o tampão, sem os peptídeos antimicrobianos. As bactérias foram mantidas em contato com os peptídeos durante 2 h a 37°C e após incubação duas alíquotas de 10 µL de cada tubo de reação foram retiradas, diluídas e semeadas por *spots* para contagem de colônias das bactérias sobreviventes através de determinação da concentração de UFC/mL. O mesmo procedimento foi realizado para os controles sem os peptídeos. Cada experimento foi realizado com duas réplicas biológicas, e para cada réplica duas determinações de UFC/mL foram realizadas (réplicas técnicas). Após a realização dos testes com diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, foi calculada a concentração capaz de levar a morte de 50% da população, através de regressão não-linear (IC₅₀).

4.5 Ensaios de fagocitose

As células THP-1 são linhagens de células monocíticas obtidas a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya *et al.*, 1980). Tal linhagem apresenta plena capacidade fagocítica e é amplamente utilizada em estudos de interação de células do sistema imune com bactérias (Melehani *et al.*, 2015). As células THP-1 foram cultivadas em garrafas plásticas próprias para cultura de células contendo meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640; LGC Biotechnologia, Cotia, SP, Brasil). As células foram mantidas em incubação a 37 °C com 5 % de CO₂, e foram realizadas duas passagens semanais dessas células a uma concentração de 10⁶ células/L até o momento dos experimentos.

Antes de cada ensaio, uma alíquota da cultura de células THP-1 foi retirada para contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 100 vezes. A quantidade de células necessária para o experimento foi transferida para um tubo cônico tipo Falcon, o material foi centrifugado a 200 x g por 5 minutos e o *pellet* ressuspenso em meio RPMI fresco, para uma concentração final de 2,5 x 10⁶ células/mL. As suspensões de células foram mantidas por, no mínimo, 1 h a 37 °C, 5 % de CO₂ e, em seguida, 5 x 10⁵ células em um volume de 200 µL foram distribuídas em cada poço de placas de 96 poços de fundo chato para a realização dos ensaios de interação.

As cepas isogênicas MW2B (SplD negativa) e MW2D (SplD positiva) utilizadas neste ensaio foram cultivadas em meio BHI e as suspensões de células bacterianas padronizadas conforme descrito no Item 4.3. Tais suspensões foram tratadas com o marcador de fluorescência Syto9, que marca o DNA intracelular (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; concentração final de 25 nM), por 15 min no escuro. Após este período, as suspensões bacterianas foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS estéril, a fim de retirar o excesso de Syto9. Em seguida, o *pellet* de bactérias foi ressuspenso em 500 µL de PBS (concentração final de 5x10⁷ UFC/mL). Alíquotas de 50 µL foram inoculadas nos tubos contendo 5 x 10⁵ células THP-1 por poço, o que corresponde à Multiplicidade de Infecção (MOI) de 10, ou seja, 10 bactérias para cada célula THP-1.

Após 30 min a 37°C, os tubos foram colocados em gelo, a fim de interromper o processo de fagocitose. Em seguida, as culturas foram lavadas uma vez com PBS pH 7,4 (através da adição de 500 µL de PBS, centrifugação a 6000 rpm e retirada de sobrenadante) e ressuspenso no mesmo tampão. Em seguida, essas suspensões foram analisadas através de citometria de

fluxo (FACSCalibur; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Foram adquiridas 10.000 células THP-1 que apresentem a localização esperada no *gate* de aquisição celular (*forward scatter* e *side scatter gating*), calculada segundo o controle, o qual foi composto de apenas células THP-1 sem adição de bactérias. A taxa de fagocitose foi normalizada para porcentagem de células fagocíticas fluorescentes (Syto9-positivas) em relação à população total de células THP-1 adquiridas.

4.5.1 Ensaios de fagocitose utilizando a proteína recombinante SplD

Tendo obtido os resultados dos ensaios de fagocitose utilizando as cepas isogênicas mutantes *splD*-positiva e negativa (MW2D e MW2B), questionamos se a presença da proteína SplD na cultura de interação seria capaz de mimetizar o fenótipo observado na cepa MW2D (que apresenta o gene *splD*), quando aplicada na cultura de interação de monócitos com a bactéria que não apresenta o gene *splD* (MW2B).

Para isso, utilizamos a proteína SplD recombinante, purificada e comercialmente disponível (Cusabio Technology LLC, Houston, TX, USA) nas concentrações de 50nM e 5nM. A proteína purificada foi ressuspensa em glicerol a 20% em água destilada (solução esterilizada por filtração) para 9,8uM, conforme instruções do fabricante. Foram feitas as diluições necessárias de forma a aplicar o mesmo volume de solução de SplD e perfazer as concentrações finais de 50nM e 5nM nas culturas de monócitos e bactérias. Foi incluído um tubo de células THP-1 em que foi aplicado igual volume do veículo (glicerol 20% em água destilada).

Neste ensaio, foi utilizada apenas a cepa MW2B. As células bacterianas inoculadas foram marcadas por fluorescência e os monócitos THP-1 foram cultivados conforme descrito acima (item 4.3 e 4.5). A quantificação da taxa de fagocitose foi feita através de citometria de fluxo.

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de sobrevivência com os peptídeos antimicrobianos foram analisados comparando as cepas pertencentes às linhagens ST105-SCC*mecII*, ST5-SCC*mecII* e ST5-SCC*mecIV*, bem como as mutantes MW2B e MW2D, através de regressão não-linear e cálculo da IC_{50} (*half maximal inhibitory concentrations*). Os dados obtidos nos ensaios de fagocitose foram analisados no programa FlowJo™ v10.8 Software (BD Life

Sciences). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa computacional GraphPad Prism versão 9 (<https://www.graphpad.com/>) e o grau de confiança considerado foi de 95% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Sobrevivência bacteriana na presença dos peptídeos antimicrobianos hNP-1 e LL-37

5.1.1 Comparação da sobrevivência de amostras clínicas pertencentes às linhagens ST5-SCC*mecII/IV* e ST105-SCC*mecII* aos peptídeos antimicrobianos

Os ensaios de sobrevivência bacteriana das amostras clínicas na presença dos peptídeos antimicrobianos tiveram como objetivo comparar as amostras clínicas, pertencentes às linhagens CC5 (SplD positivas e SplD negativas), quanto a taxa de sobrevivência em diferentes concentrações do peptídeo, de modo a se calcular a concentração necessária para eliminar 50% da população (IC_{50}). Assim, o objetivo deste ensaio inicial foi avaliar um possível papel da proteína SplD na interação da bactéria com os peptídeos antimicrobianos, os quais são liberados pelas células do sistema imune durante um processo infeccioso natural na corrente sanguínea.

Analisando a quantificação em UFC/mL após o tempo de exposição das amostras bacterianas aos peptídeos, verificamos que houve decaimento da população bacteriana de forma dose-dependente nas concentrações utilizadas neste ensaio. Este decaimento pode ser visto nas Figuras 2A, 2B e 2C, nas quais foram plotadas a concentração dos peptídeos antimicrobianos utilizados no ensaio (representados no eixo x) com a quantificação de UFC/mL após interação bacteriana com os peptídeos (eixo y). Os valores de IC_{50} para cada amostra foram calculados, a fim de avaliar se houve diferença na concentração necessária para eliminar metade da população bacteriana.

Em relação ao ensaio utilizando o peptídeo antimicrobiano hNP-1, a amostra CR14-026 (ST5-SCC*mecIV*) obteve o valor de IC_{50} igual a 3,893 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a amostra CR15-071 (ST5-SCC*mecII*) obteve IC_{50} igual a 2,412 $\mu\text{g/mL}$ e a CD16-016 (ST105-SCC*mecII*) apresentou resultado de 4,758 $\mu\text{g/mL}$. Porém, quando analisamos estatisticamente os valores da quantificação em UFC/mL das cepas testadas (CR14-026, CR15-071 e CD16-016) após a interação com hNP-1 obtivemos um valor de $p = 0.1157$.

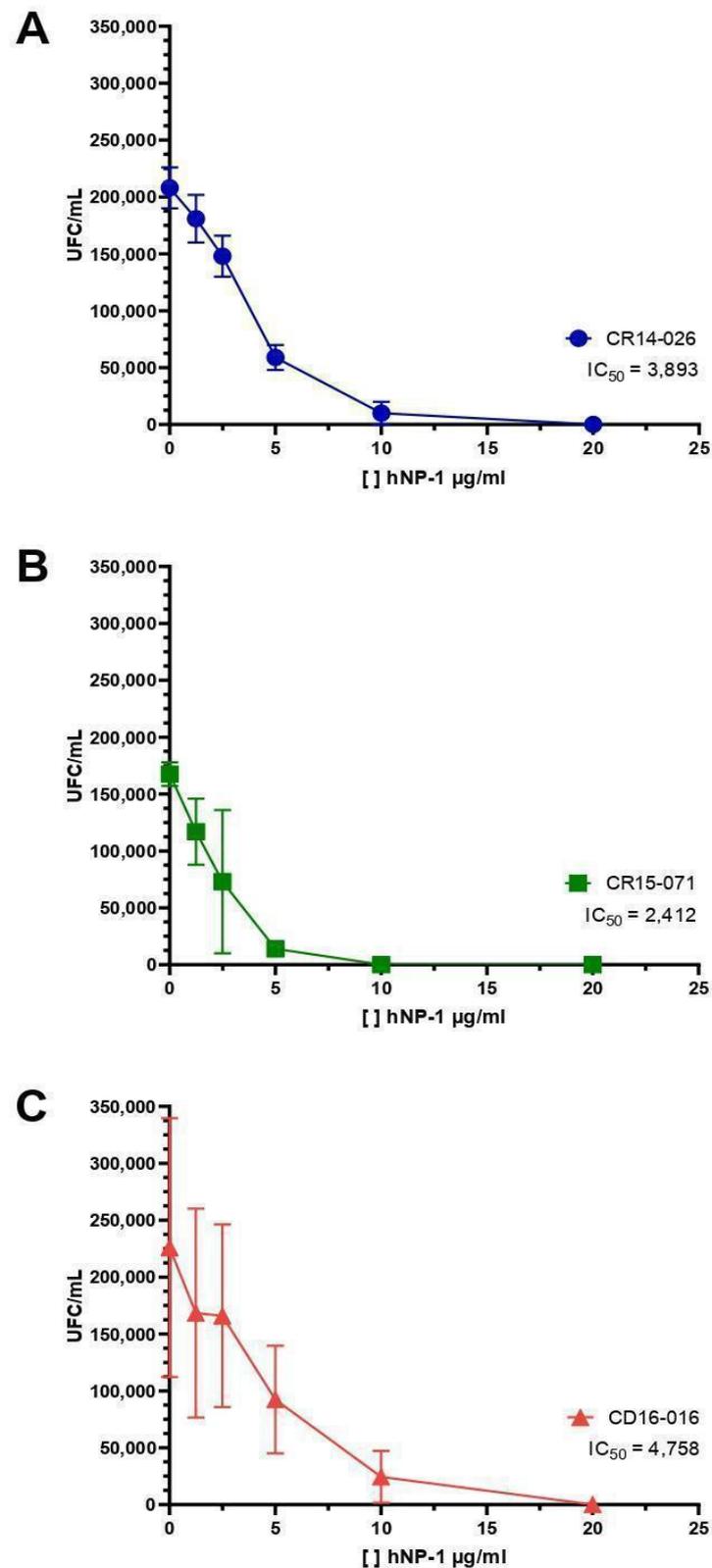


Figura 3 - Ensaio de sobrevivência das amostras clínicas ST5-SCC*mec*IV CR14-026 (A), ST5-SCC*mec*II CR15-071 (B) e ST105-SCC*mec*II CD16-016 (C) na presença do peptídeo antimicrobiano hNP-1. O eixo y corresponde à contagem de UFC/mL após 2 horas de interação das cepas com as diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, representadas no eixo x. Cada ponto na curva representa a média de 4 réplicas e o valor de IC_{50} foi calculado a partir de testes de regressão não linear. UFC = Unidades formadoras de colônias; IC_{50} = *half maximal inhibitory concentration*.

Com relação aos experimentos em que foi utilizada catelicidina LL-37, a amostra CR14-026 (ST5-SCC*mec*IV) obteve o valor de IC₅₀ igual a 0,5691 µg/mL, CR15-071 (ST5-SCC*mec*II) obteve IC₅₀ igual a 0,7196 µg/mL e a amostra CD16-016 (ST105-SCC*mec*II) obteve IC₅₀ igual a 1,759 µg/mL. Nesses experimentos utilizando a LL-37 obtivemos um valor $p=0,9846$. Portanto, ao serem analisados os valores de IC₅₀ nos ensaios envolvendo ambos os peptídeos, as amostras CD16-016 (ST105) mostraram exigir concentrações ligeiramente maiores de peptídeos antimicrobianos para que sua população fosse reduzida em 50%, mas esses resultados não foram matematicamente significativos. O decaimento da contagem de UFC/mL das amostras clínicas expostas à catelicidina LL-37 está representado na Figura 3.

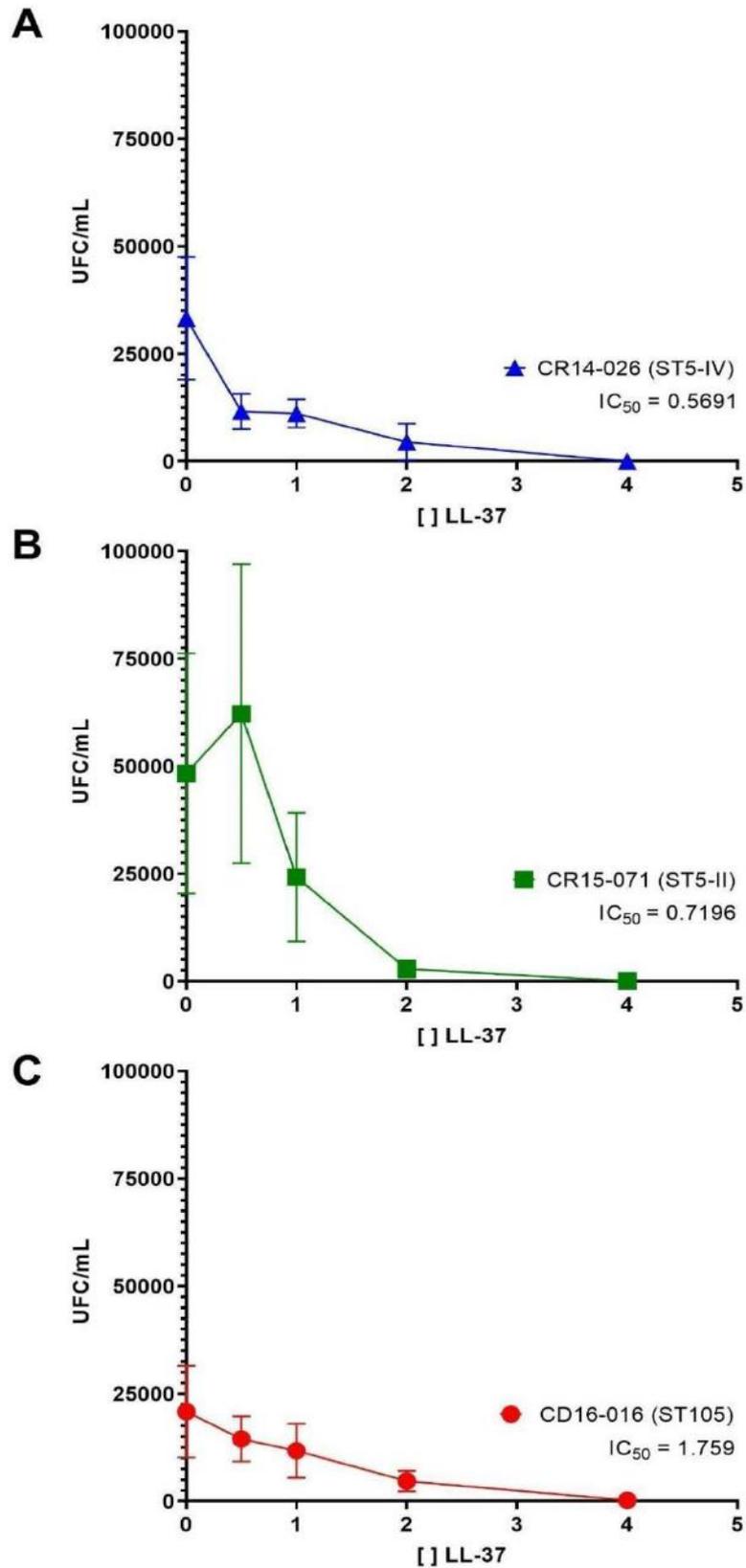


Figura 4 - Ensaio de sobrevivência das amostras clínicas ST5-SCC*mec*IV CR14-026 (A), ST5-SCC*mec*II CR15-071 (B) e ST105-SCC*mec*II CD16-016 (C) na presença do peptídeo antimicrobiano LL-37. O eixo y corresponde à contagem de UFC/mL após 2 horas de interação das cepas com as diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, representadas no eixo x. Cada ponto na curva representa a média de 4 réplicas e o valor de IC₅₀ foi calculado a partir de testes de regressão não linear UFC = Unidades formadoras de colônias; IC₅₀ = *half maximal inhibitory concentration*.

5.1.2. Comparação da sobrevivência das cepas isogênicas MW2B e MW2D

Os ensaios de sobrevivência bacteriana das cepas isogênicas capazes ou não de expressar a SplD na presença dos peptídeos antimicrobianos buscaram aprofundar as investigações sobre o papel da perda do gene *splD* por cepas ST105-SCC*mecII* em infecções de sangue (Figuras 4 e 5). Para isso, foram utilizadas cepas isogênicas, ou seja, apresentando o mesmo background genético, possuindo apenas como diferencial a presença ou ausência do gene codificador da proteína SplD.

Assim como nos ensaios utilizando as amostras clínicas, ao se analisar a curva de sobrevivência formada após interação das cepas isogênicas com os peptídeos antimicrobianos foi possível observar uma diminuição da contagem de UFC com o aumento da concentração da catelicidina LL-37 e do peptídeo hNP-1. Em relação ao cálculo de IC₅₀, em ensaios utilizando a hNP-1, a concentração de peptídeo que levaria à morte 50% da população inicial foi 10,37 µg/mL para a cepa MW2B (SplD negativa) e 17,96 µg/mL para MW2D (SplD positiva). Nestes ensaios, obtivemos o valor de $p=0,3909$. Já nos experimentos de interação das cepas isogênicas com a catelicidina LL-37, o IC₅₀ das amostras foi de 2,69 µg/mL para a MW2B e 2,10 µg/mL para a MW2D, sendo obtido um valor $p=0,9311$.

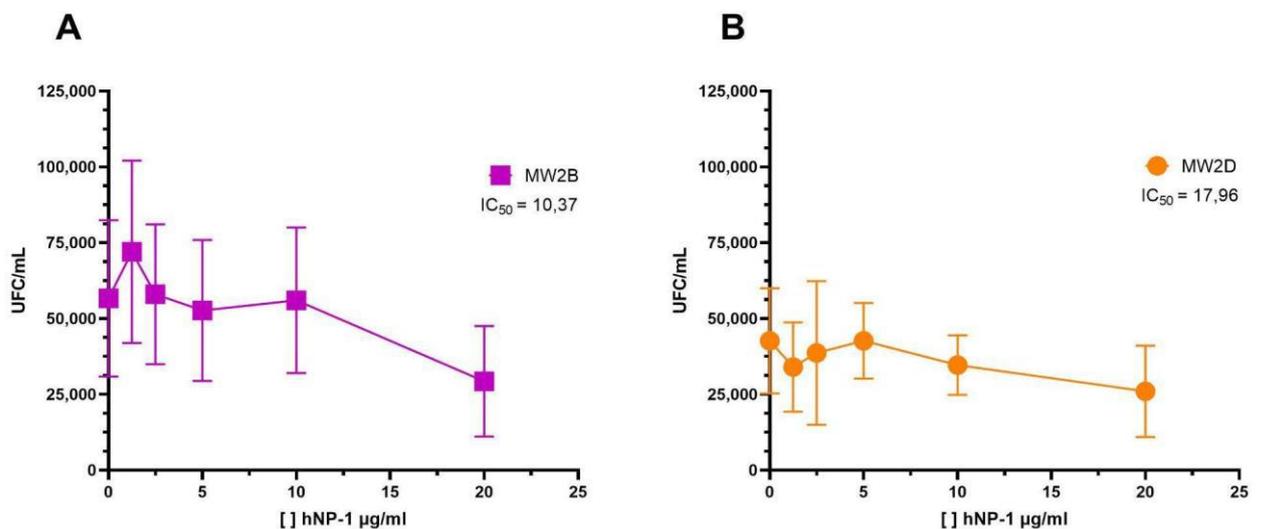


Figura 5 - Ensaio de sobrevivência das amostras mutantes isogênicas MW2B (amostra contendo plasmídeo sem *splD*; A) e MW2D (amostra contendo o plasmídeo e o gene *splD*; B) na presença do peptídeo antimicrobiano hNP-1. O eixo y corresponde à contagem de UFC/mL após 2 horas de interação das cepas com as diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, representadas no eixo x. Cada ponto na curva representa a média de 3 réplicas e o valor de IC₅₀ foi calculado a partir de testes de regressão não linear. UFC = Unidades formadoras de colônias; IC₅₀ = *half maximal inhibitory concentration*.

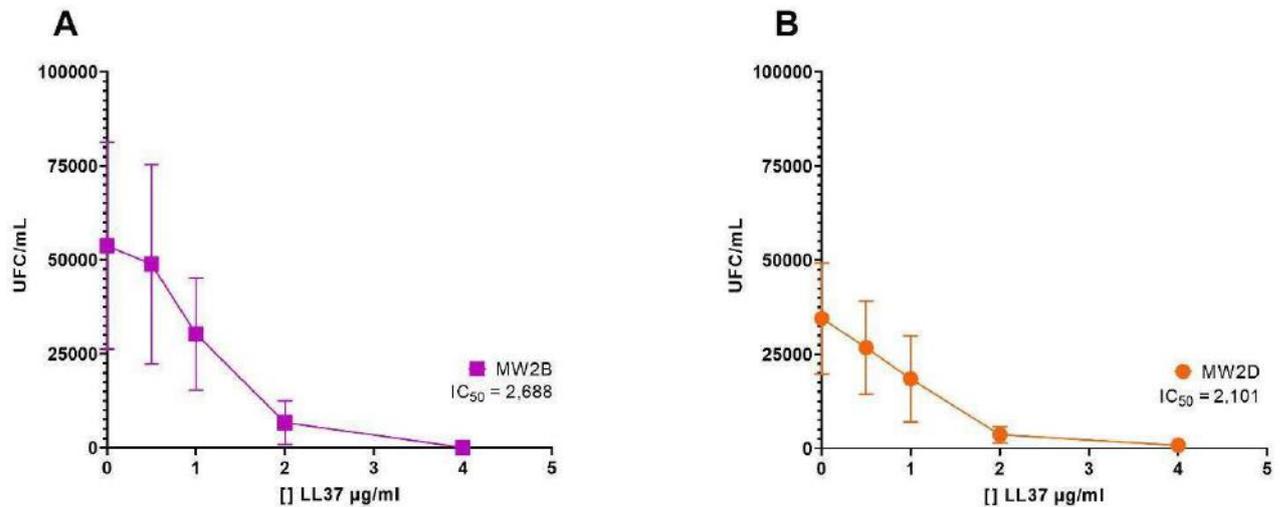


Figura 6 - Ensaio de sobrevivência das amostras mutantes isogênicas MW2B (amostra contendo plasmídeo sem *spID*; A) e MW2D (amostra contendo o plasmídeo e o gene *spID*; B) na presença do peptídeo antimicrobiano LL37. O eixo y corresponde à contagem de UFC/mL após 2 horas de interação das cepas com as diferentes concentrações dos peptídeos antimicrobianos, representadas no eixo x. Cada ponto na curva representa a média de 4 réplicas e o valor de IC_{50} foi calculado a partir de testes de regressão não linear. UFC = Unidades formadoras de colônias; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration.

5.2 Ensaio de fagocitose

Os ensaios de fagocitose foram realizados utilizando as cepas isogênicas contendo ou não o gene para a expressão da proteína SplD (*spID*). Estes experimentos tiveram como objetivo verificar a capacidade de evasão da fagocitose por monócitos THP-1 das cepas de MRSA isogênicas MW2B (SplD negativa) e MW2D (SplD positiva), a fim de investigar se a perda do gene *spID* por cepas ST105-SCC*mecII* poderia estar implicada na sua maior frequência em infecções na corrente sanguínea.

Nos experimentos com a cepa MW2B (pCN49 vazio) a taxa média de fagócitos (monócitos capazes de fagocitar pelo menos uma bactéria) foi de 89,15%, enquanto nos experimentos com a cepa isogênica MW2D (pCN49-*spID*) que expressa *spID*, essa taxa foi igual a 97,85% (média de 2 experimentos independentes). Adicionalmente, a quantificação da intensidade média de fluorescência (MFI), indicada pela citometria de fluxo, e que mede o número total de bactérias fagocitadas, apontou diferenças entre as duas cepas. Os valores de MFI foram normalizados por meio de porcentagem, a fim de se obter a porcentagem do valor de MFI da cepa MW2B em relação ao total do MFI da cepa MW2D, sendo tal valor calculado por meio da fórmula $p = (x/y) * 100$ (onde x = menor valor de MFI entre as cepas analisadas e y = o maior valor de MFI entre as cepas analisadas). A cepa MW2B apresentou taxa de MFI equivalente a 34,5% do valor de MFI apresentado pela cepa MW2D. Isso indica que o valor de

MFI da cepa MW2B foi 65,5% menor que o da cepa MW2D. Como dissemos, o valor de MFI é um indicativo da quantidade de células bacterianas fagocitadas; portanto, uma taxa de MFI aumentada para MW2D indica que os monócitos THP-1 expostos a essa cepa produtora de SplD conseguiram fagocitar uma maior quantidade de bactérias do que aqueles que foram desafiados com a cepa MW2B (*splD*-negativa). No gráfico, pode ser observada essa diferença pelo deslocamento das curvas para o lado direito no eixo x, indicando que a maior parte das células expostas a MW2D apresentou fluorescência mais alta do que àquelas expostas a MW2B.

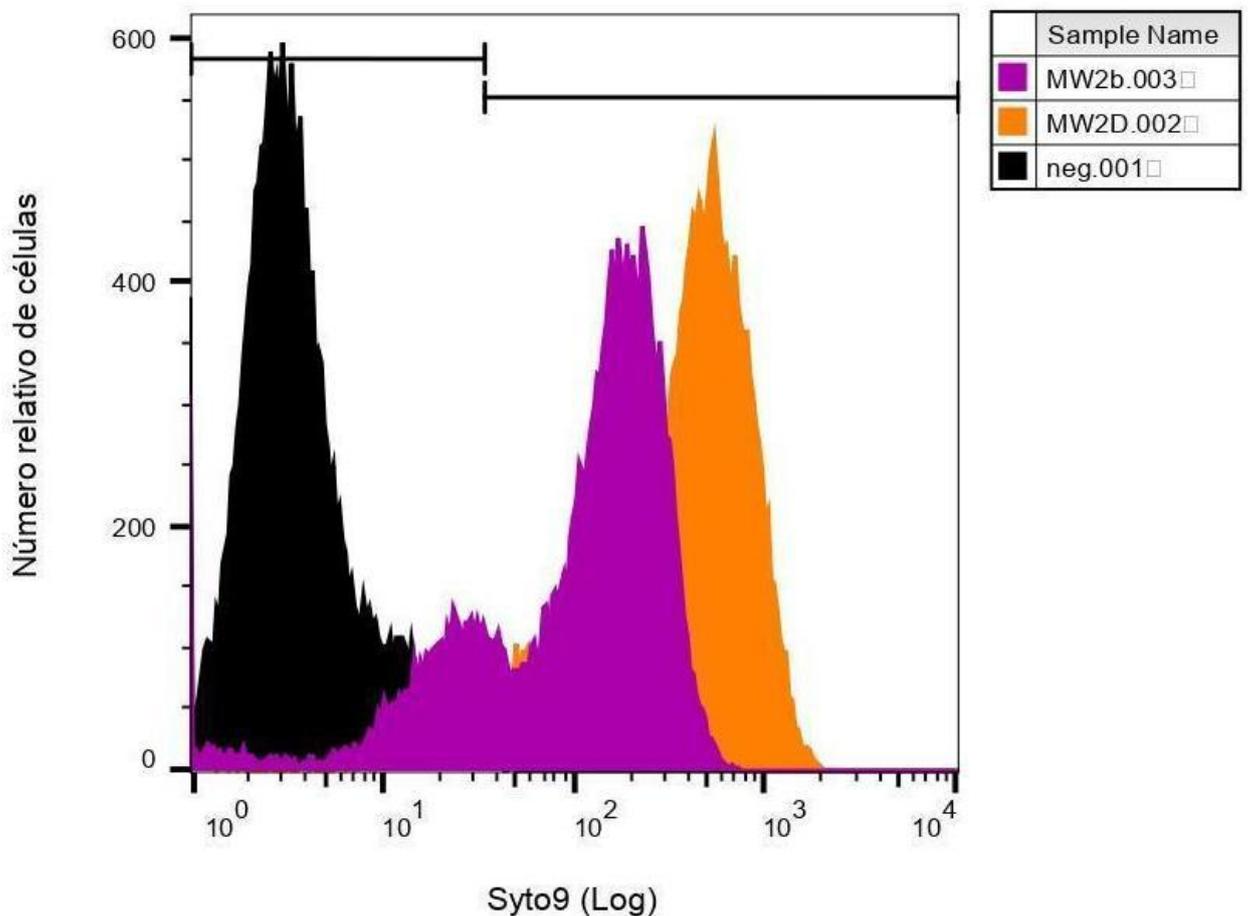


Figura 7 - Ensaio de fagocitose com as amostras mutantes isogênicas MW2D e MW2B. O pico de cor preta representa o controle negativo utilizado neste estudo, enquanto o pico de cor roxa representa a cepa MW2B e o laranja a MW2D. O eixo y do gráfico representa o número relativo de células obtido por meio da citometria de fluxo, enquanto o eixo x representa a intensidade de fluorescência obtida representada por log do valor de fluorescência de Syto9.

5.2.1 Ensaios de fagocitose utilizando a protease SplD recombinante

De forma a confirmar os dados obtidos com os clones isogênicos derivados da cepa MW2, experimentos de fagocitose foram realizados com a cepa MW2B (SplD negativa) na ausência ou na presença da protease SplD recombinante. A taxa de fagócitos (% de monócitos

fluorescentes) na ausência e na presença de 5nM ou 50nM da protease recombinante foi igual a 98,5, e 99,8 % e 99,9 %. Do mesmo modo que o observado nos ensaios de fagocitose para os clones MW2B e MW2D, os dados obtidos a partir da MFI apresentaram uma diferença considerável entre a taxa de fagocitose da cepa MW2B em experimentos realizados na ausência ou presença da SplD recombinante. O valor de MFI da cepa MW2B (SplD negativa) na ausência da proteína recombinante foi de 63,9, enquanto os valores de MFI do ensaio de fagocitose para esta mesma cepa na presença de 5 nm ou 50 nm de SplD recombinante foi de 88,9 e 85,7; respectivamente. Nesses experimentos, um único ensaio independente foi realizado; porém, duas concentrações da protease recombinante foram analisadas.

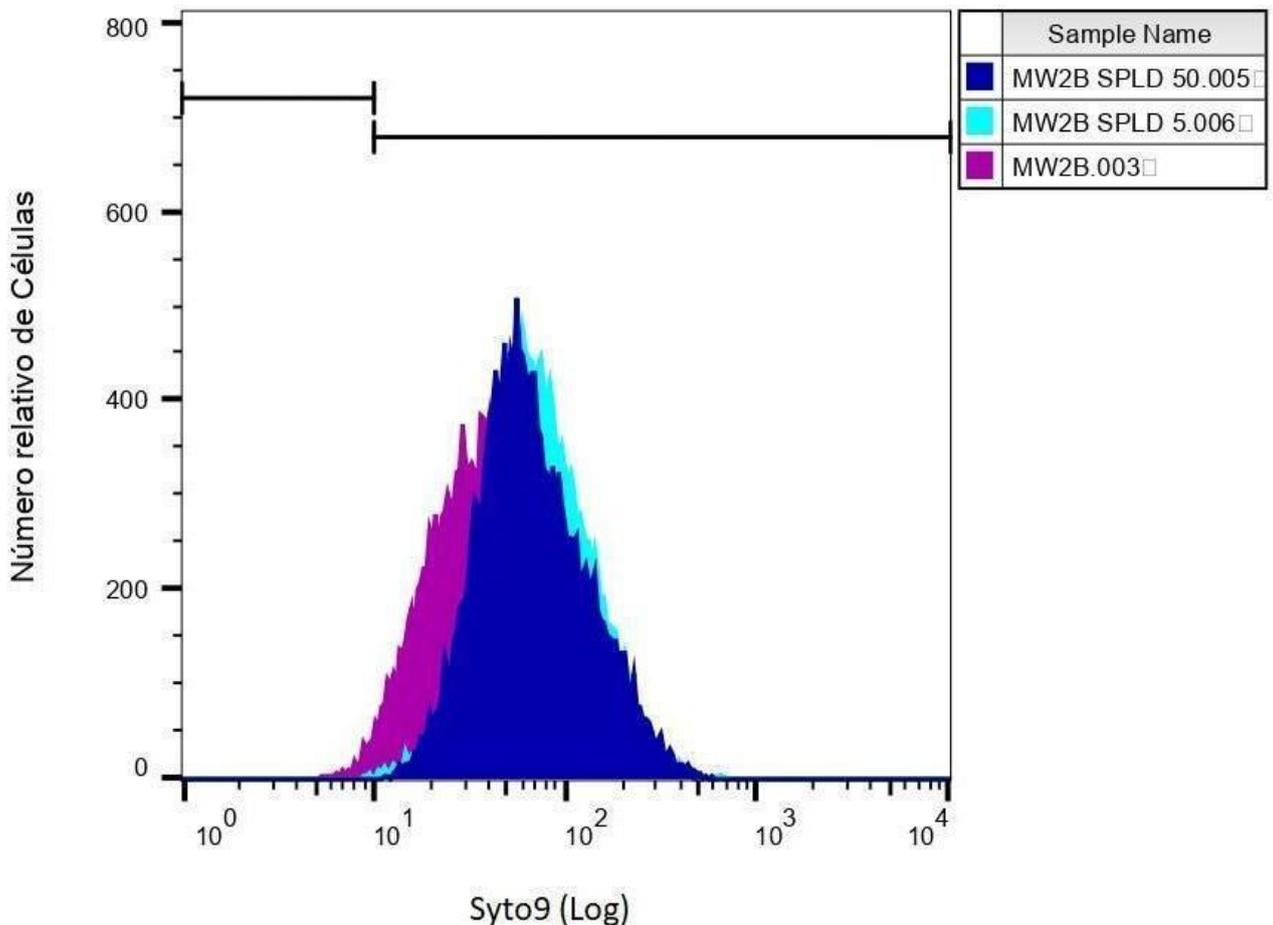


Figura 8 - Ensaio de fagocitose com a amostra mutante MW2B com ou sem a presença da proteína recombinante SplD em diferentes concentrações. O pico de cor roxa representa a cepa MW2B, enquanto o pico de cor azul representa a cepa MW2B + [] 50nM da proteína SplD e o ciano equivale a MW2B + [] 5nM da proteína SplD. O eixo y do gráfico representa o número relativo de células obtido por meio da citometria de fluxo, enquanto o eixo x representa a intensidade de fluorescência obtida representada por log do valor de fluorescência de Syto9.

6 DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) pode estar envolvido em quadros de infecções graves que incluem as infecções na corrente sanguínea (Holland, Bayer e Fowler, 2022). Essas infecções promovem elevados riscos para a saúde do indivíduo afetado, podendo, a partir da corrente sanguínea, haver disseminação bacteriana para outros órgãos, causando por exemplo osteomielite generalizada, endocardite e/ou pneumonia (Arshad e Misumida, 2021; Bassetti *et al.*, 2021; Sartorio *et al.*, 2022). Para que um patógeno tenha sucesso para sobreviver nesse ambiente adverso são necessários diversos fatores que o permita enfrentar os numerosos mecanismos da imunidade inata do hospedeiro, incluindo desde o processo de fagocitose à liberação de peptídeos antimicrobianos na corrente sanguínea (Gasteiger *et al.*, 2017).

As estratégias que diferentes patógenos adotam por meio de adaptações evolutivas para sobreviver nesse ambiente tão inóspito podem ser diversas. Essas podem incluir tanto a obtenção de genes ligados à virulência, evasão e eliminação de células de defesa quanto a perda desses genes (Duperthuy, 2020). Por exemplo, foi observado que a perda de certos genes citotóxicos e pró-apoptóticos em MRSA da linhagem ST1-SCC*mecIV* diminuiu sua capacidade de aderência, invasão e citotoxicidade em células de osteoblastos, porém aumentou sua capacidade de sobrevivência intracelular. Tal estratégia pode representar uma vantagem para a essas bactérias durante infecções na corrente sanguínea, por evitar a super ativação do sistema imune, além de propiciar bacteremias recorrentes e persistentes (Côrtes *et al.*, 2021). Diferentes cepas patogênicas desenvolveram ao longo da evolução novos modos de adaptação que estão em constante estudo, e cada vez mais genes ligados a esses fenômenos são caracterizados (Duperthuy, 2020).

Em trabalho anterior, nosso grupo analisou cerca de 600 amostras de MRSA provenientes de hospitais da Região Metropolitana do Rio de Janeiro e sequenciou uma parcela importante dessas amostras (cerca de 35%). As análises genômicas evidenciaram um aumento da frequência de amostras pertencentes à linhagem ST105-SCC*mecII* como agentes causadoras de infecções na corrente sanguínea. Por meio de análises filogenômicas e genômicas, algumas características importantes das cepas ST105-SCC*mecII* e cepas proximamente relacionadas – as quais formam um clone denominado RdJ– foram evidenciadas como potenciais alvos para a compreensão da adaptação desse clone como importante patógeno de bacteremias no Rio de Janeiro (Viana *et al.*, 2021). Dentre as características genômicas mais exclusivas do clone RdJ que foram conservadas durante sua evolução destaca-se a perda do gene *spID*.

Os experimentos aqui apresentados buscaram compreender se a perda do gene *splD* poderia representar uma vantagem para o clone RdJ em infecções de corrente sanguínea. Uma vez que os monócitos desempenham um papel importante nesse tipo de infecção (Chung *et al.*, 2019), dois ensaios foram escolhidos para testarmos tal hipótese: 1) sobrevivência bacteriana na presença de peptídeos antimicrobianos e 2) fagocitose por monócitos THP-1.

Ensaio com peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm sido frequentemente realizados para desafiar diversos microrganismos, havendo grande número de trabalhos publicados na literatura científica (Duperthuy, 2020). Esses peptídeos parecem agir de diferentes maneiras, muitas delas hipotéticas e ainda pouco investigadas. Entre elas estão os mecanismos bactericidas intracelulares como inibição da síntese de macromoléculas e inibição de atividades enzimáticas; porém, o ataque direto à membrana bacteriana, a partir da formação de poros, parece ser o principal e mais detalhado mecanismo de ação (Duperthuy, 2020). Assim, nossa estratégia inicial foi testar se a protease SplD poderia, de alguma forma, impactar a sobrevivência da bactéria após tratamento com a defensina hNP-1 e a catalecidina LL-37. Uma hipótese seria, por exemplo, que a SplD poderia degradar proteases bacteriana capazes de degradar AMPs e assim diminuir a sobrevivência bacteriana na presença do AMPs.

De fato, alguns trabalhos descrevem a indução da produção de proteases extracelulares microbianas como resposta direta à presença de AMPs. Algumas dessas proteases são de suma importância para a clivagem desses peptídeos, como é o exemplo PgtE, produzida por cepas de *Salmonella enterica*. Nesse microrganismo, a produção das PgtEs é regulada pelo sistema PhoPQ, que é ativado na presença de AMPs (Guina *et al.*, 2000). Outro trabalho que investigou o papel de uma protease na resistência de uma bactéria frente à AMPs foi Rompikuntal *et al.*, 2015, que mostrou que ao serem expostas a concentrações subinibitórias de LL-37, cepas de *Vibrio cholerae* ativaram uma maior secreção da protease PrtV. É interessante notar que após a mutação no gene responsável pela codificação da protease PrtV, a resistência à LL-37 não foi perdida, ainda que as amostras produtoras de PrtV mostrassem níveis mais elevados de resistência ao peptídeo, sugerindo que outras proteases também poderiam estar envolvidas no processo (Rompikuntal *et al.*, 2015).

Porém, em nossos ensaios, apesar das amostras clínicas *splD* positivas apresentarem menores valores de IC₅₀, esses resultados não tiveram significância estatística e não puderam ser confirmados nos experimentos onde os clones isogênicos SplD positivo e SplD negativo foram utilizados. Dessa forma, em conjunto, esses dados indicam que a SplD parece não estar

envolvida na sobrevivência das bactérias estudadas tanto na presença de hNP-1 como de LL-37.

Por outro lado, temos que considerar que os clones isogênicos (SplD positivo e SplD negativo) aqui estudados pertencem a uma linhagem (ST1-SCC*mecIV*) diferente àquela das cepas ST105-SCC*mecII*. Em relação às amostras clínicas, uma possibilidade é de que a pouca diferença observada pela ausência da SplD na cepa ST105-SCC*mecII* em relação a resistência aos AMPs seja fruto de um possível papel conjunto das proteases do operon *splABCDEF*, que apresentariam papéis redundantes entre si (Zdzalik *et al.*, 2013). Zdzalik e colaboradores em 2013 sugeriram que tais proteases tenham um papel sinérgico, uma vez que apresentam estruturas similares e pelo fato de que todos os genes pertencentes ao operon são co-transcritos por um único promotor. Essa hipótese pode ainda ser sustentada pela alta similaridade de aminoácidos compartilhados pela SplD e SplF (94.6%), o que indica que essas proteases têm grandes chances de realizarem papéis similares durante uma infecção (Paharik *et al.*, 2016). É também possível que a SplD não exerça um papel direto ou indireto na sobrevivência de *S. aureus* frente aos AMPs estudados.

No estudo publicado por Viana e colaboradores, em 2021 também foi demonstrado que amostras do clone RdJ apresentaram maior capacidade de evadir da fagocitose de células THP-1 (Viana *et al.*, 2021). No estudo citado, o grupo das amostras representativas do clone RdJ, que são naturalmente negativas para o gene da proteína SplD, apresentou taxas de fagocitose muito baixas (média de 2,9%), em comparação com amostras das outras linhagens CC5 (41,3% para amostras representativas do clone ST5(CC5)-SCC*mecII*-t539 e 35,8% para ST5(CC5)-SCC*mecIV*-t002. É interessante notar que, nos resultados obtidos no presente estudo, foi observado que a cepa que não apresenta o gene *splD* (cepa MW2B) mostrou taxas de MFI menores nos ensaios de fagocitose quando comparada à sua cepa isogênica MW2D, SplD positiva (34,5% do valor de MFI apresentado pela cepa MW2D).

O papel da proteína SplD na evasão do processo de fagocitose não é descrito na literatura científica, sendo essa protease estafilocócica muito pouco estudada. No entanto, quanto à capacidade de modular o sistema imunológico, SplD tem sido apontada como um potencial alergênico (Stentzel *et al.*, 2017; Teufelberger *et al.*, 2018; Teufelberger *et al.*, 2020). Um estudo recente (Teufelberger *et al.*, 2020) demonstrou a estimulação da citocina IL-33 pela proteína SplD, que leva ao desenvolvimento fenótipo Th2 de resposta imune celular. Considerando que o processo patogênico envolvido nas infecções de corrente sanguínea provoca uma resposta imune do tipo inflamatória (Th1), e que a resposta Th2 pode representar

um efeito protetor contra a sepse (Krishack *et al.*, 2019), é possível que a proteína SplD atue, na verdade, como um fator anti-virulência para o desenvolvimento da bacteremia e sepse. Portanto, a perda do gene codificante da proteína SplD, ao longo da evolução das amostras ST105, poderia significar uma vantagem adaptativa para o estabelecimento de infecções de corrente sanguínea.

Proteases, como a serino-protease SplD podem atuar clivando e destruindo moléculas e receptores, tanto da célula bacteriana quanto da célula do hospedeiro. Análises computacionais (*in silico*) realizadas por Paharik e colaboradores (Paharik *et al.*, 2016) realizaram um rastreamento quanto as proteínas que poderiam ser alvo para as serino-proteases codificadas pelo operon *splABCEDF* de *S. aureus*. Neste estudo, mostraram que a proteína SplD é capaz de clivar a proteína mucina, presente no tecido epitelial (Paharik *et al.*, 2016), o que poderia contribuir para o espalhamento da infecção pelos pulmões.

Com relação aos resultados obtidos na fagocitose, ainda não sabemos se a SplD atuaria direta ou indiretamente no fagócito ou na célula bacteriana. Porém, sabemos de experimentos anteriores que o espectro de ação da SplD sobre o *S. aureus* parece ser bastante restrito (Zdzalik *et al.*, 2013). Experimentos estão sendo realizados no momento para responder a esta pergunta. É possível, por exemplo, que a SplD atue degradando alguma proteína do fagócito que atue como regulador negativo da fagocitose. É sabido, por exemplo, que nocautes em genes envolvidos na via de acetilação em monócitos THP-1 ativam a fagocitose de *S. aureus* (Lindner *et al.*, 2021). Portanto, caso a ação da SplD inibindo a fagocitose ocorra devido sua ação em células THP-1, essa nos parece uma interessante via a ser analisada.

É possível ainda que a proteína SplD atue na clivagem de alguma proteína de *S. aureus*, que seja importante para o processo de fagocitose. A regulação de virulência é uma rede intrincada de moléculas que promovem o equilíbrio fino entre o estímulo à expressão de fatores de virulência a sua repressão, de forma que as bactérias consigam permanecer no organismo hospedeiro, causando danos e se disseminando, porém sem ser eliminada pela intensa resposta imune. Dessa forma, considerando a hipótese de que a proteína SplD atue regulando moléculas relacionadas à fagocitose de *S. aureus*, a sua exclusão do genoma bacteriano pode levar ao aumento ou diminuição da molécula alvo e, portanto, na modulação da sua atividade. A exemplo disso, já foi demonstrado que o RNA não codificante SprC regula a proteína autolítica AtlA em *S. aureus*, interferindo na evasão da fagocitose por monócitos e macrófagos humanos (Zhou *et al.*, 2022).

Dentre os alvos identificados para a ação da proteína SplD, são citados os receptores olfativos, que são expressos nas narinas – local preferido para a colonização por *S. aureus*. Foi sugerido que a presença de SplD favoreça a colonização da bactéria nesse sítio anatômico. (Zdzalik *et al.*, 2013). Nesse sentido, é interessante ressaltar que as cepas ST105-SCCmecII foram encontradas com menos frequência colonizando as narinas quando comparadas as demais linhagens circulando no mesmo período (Viana *et al.*, 2021).

Os resultados por nós obtidos mostram uma possível ação da SplD que vai em direção oposta aos trabalhos que estudam as proteases secretadas por *S. aureus*. Isso porque estes normalmente associam as proteases a uma atividade protetora por meio da modulação do sistema complemento e da inibição de fagocitose opsonizada, enquanto em nossos estudos as amostras SplD-negativas demonstraram menor taxa de fagocitose. Pietrocola e colaboradores mostraram que ao submeter o soro à presença das proteases Aur, V8 e Staphopain A e B, havia a completa inibição de todas as vias do sistema complemento (Pietrocola *et al.*, 2017). Em 2012, Kolar *et al.* utilizaram uma amostra USA300 LAC mutante que não produz proteases secretadas (Aur, SspA, SspB, ScpA e SplA) e a comparou, a partir de diversos ensaios, com a amostra selvagem isogênica, que produz níveis normais destas proteases. Os resultados mostraram que a presença dessas proteases levou a uma maior resistência a componentes antimicrobianos como a indolicidina e histatina 5, além de levar a uma menor taxa de fagocitose das amostras selvagens (Kolar *et al.*, 2012). Smagur *et al.* observaram que a estafilopaina B cliva CD11b e CD31 e, conseqüentemente, possui um papel na evasão de fagocitose por monócitos e neutrófilos (Smagur *et al.*, 2009). Aqueles autores concluíram que as proteases extracelulares em conjunto possuem, muito provavelmente, papel definido na proteção e interação benéfica com o sistema imune em *S. aureus*. Entretanto, os resultados utilizando as cepas isogênicas MW2D e MW2B, e confirmados através da adição da proteína recombinante SplD, sugerem que a SplD parece atuar neste caso como um fator antivirulência.

Por outro lado, existe uma gama de receptores celulares do hospedeiro que são ativados por proteases. Esses receptores já foram vistos como tendo papel importante na exacerbação da resposta imune após ativação por alguns tipos de proteases (Shpacovitch *et al.*, 2008). Palm e colaboradores elucidaram o papel de PAR1 (protease activated receptor) e PAR2, ao lado de receptores TRL2 de fibroblastos, em resposta a interação com a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, observando a produção de mediadores inflamatórios como a IL-6, TGF- β 1 e CXCL8 (Palm *et al.*, 2015). Já Boogaard e colaboradores descreveram a atenuação do quadro de pneumonia e sepse induzida por pneumococos em camundongos que possuíam *knockout* no

gene responsável pela expressão de PAR2 (Boogaard *et al.*, 2018). Já foi relatado também uma maior expressão das defensinas humanas da classe β (hBD) no epitélio mediada pela sinalização promovida pelos receptores PARs. Tal fenômeno foi observado após a exposição de células epiteliais gengivais à *Porphyromonas gingivalis*. Mutantes de *P. gingivalis* na qual o gene para uma, ou mais proteases, foi nocauteado, apresentou menor expressão do mRNA hBD-2 (Chung *et al.*, 2004). Ao reunir trabalhos envolvendo esses receptores ativados por proteases, Shpacovitch e colaboradores listaram algumas ações efetoras baseadas na ativação dos PARs, percebendo que esses receptores são importantes não só para a modulação do sistema imune inato, mas também do sistema adaptativo. Tais receptores estariam envolvidos na ativação e recrutamento de leucócitos, regulação da produção de citocinas, quimiocinas e ROS pelas células do sistema imune (Shpacovitch *et al.*, 2008).

Em 2021, Chandrabalan e colaboradores estudaram o papel da SpIB na regulação da barreira endotelial. Eles viram que essa protease ativa especificamente PAR2, mas não PAR1 e PAR4. O receptor PAR2 é canonicamente ativado pela tripsina, mas também pode ser ativado por enzimas de neutrófilos, sendo a resposta celular à ativação por diferentes componentes distintos. O estudo mostrou que o sítio de ativação do PAR2 pela SpID é diferente do alvo da tripsina, e sua ativação por essa protease recruta as moléculas efetoras $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{i/oB}$ e β -arrestinas 1 e 2. A ação de diferentes efetores por PARs já foi associada a regulação de níveis transcricionais de citocinas pró-inflamatórias, e Chandrabalan mostrou que a ativação de PAR2 por SpIB levou a uma liberação de citocinas pró-inflamatórias em células endoteliais. Essa resposta pró-inflamatória foi revertida a partir da inibição de $NF-\kappa\beta$, indicando que esse fator de transcrição é importante na resposta desencadeada a partir da ativação de PAR2 pela SpID (Chandrabalan *et al.*, 2021). Além disso, Kang e colaboradores demonstram que a ativação de PAR2 de células THP-1 pela tripsina tem como consequências a maior proliferação dessas células de forma concentração/tempo dependente. Portanto, a clivagem de PAR2 leva a ativação de monócitos THP-1. Essa ativação levou também à liberação de $TNF-\alpha$ pelos monócitos THP-1, e o trabalho concluiu que os macrófagos humanos são ativados a partir da clivagem de PAR2 por serino-proteases com ação similar a tripsina, e que essa ativação leva à produção e secreção de mediadores inflamatórios (Kang *et al.*, 2005). Assim, baseado nos nossos dados, uma hipótese interessante para pesquisas futuras seria analisar o papel da SpID na ativação de PARs. Caso ocorresse, tal ativação poderia levar a uma exacerbação da resposta imune e subsequente aumento da taxa de fagocitose para as amostras SpID positivas. Em contrapartida, uma maior sobrevivência à fagocitose de amostras SpID negativas (como a ST105-SCC*mecII*) seria

observada, uma vez que durante a infecção promovida por tais amostras haveria uma inibição da ativação de PARs.

Uma possível limitação deste estudo foi que algumas análises, principalmente àquelas envolvendo os peptídeos antimicrobianos, apresentaram uma certa dispersão dos resultados, representado pelo desvio padrão elevado. Tal resultado parece apontar para a necessidade do aumento do número de experimentos independentes, ou a utilização de outras estratégias experimentais, para que conclusões mais precisas quanto ao que parece uma ausência de um papel para a SplD na sobrevivência bacteriana frente a tais peptídeos. Assim, pretendemos realizar experimentos de cinética com os peptídeos antimicrobianos visando desafiar cepas clínicas SplD positivas e negativas, bem como os clones MW2D e MW2B. Além disso, pretendemos realizar também esses experimentos utilizando a cepa MW2D, tanto na presença e ausência de SplD recombinante. Além disso, outra possível limitação deste estudo foi que os clones isogênicos SplD positivos e negativos utilizados pertencem a linhagem ST1-SCC*mecIV*. Portanto, como perspectivas futuras, pretendemos também construir clones moleculares isogênicos derivados de uma cepa da linhagem ST105-SCC*mecII*, contendo ou não o gene *splD*, visando validar com diferentes estratégias os resultados aqui apresentados, tendo em vista a originalidade deles.

7 CONCLUSÃO

Em relação ao ensaio utilizando o peptídeo antimicrobiano hNP-1 amostras ST5-SCC*mecIV* e ST5-SCC*mecII* (SplD positivas) apresentaram valores de IC₅₀ ligeiramente menores que a ST105-SCC*mecII* (SplD negativas). Entretanto, o cálculo de IC₅₀ dos resultados de ensaios utilizando a hNP-1 frente aos clones isogênicos, revelou um valor ligeiramente aumentado para o clone MW2B comparado ao MW2D. Nos dois experimentos valores de *p* se apresentaram >0.05. Portanto, tais dados sugerem que a SplD não parece interferir na atividade bactericida de hNP-1 frente aos *S. aureus*.

Do mesmo modo experimentos utilizando a catelecidina LL-37, as amostras ST5-SCC*mecIV* e ST5-SCC*mecII* demonstraram também valores de IC₅₀ um pouco menores que a ST105-SCC*mecII*. Nos experimentos de interação dos clones isogênicos com a LL-37, os valores de IC₅₀ das amostras MW2B e MW2D foram semelhantes. Da mesma forma que os resultados para a defensina hNP-1 apresentaram valores de *p* >0.05. Assim, tais dados sugerem que a SplD também parece não interferir na atividade da LL-37 frente aos *S. aureus*.

Nos experimentos de fagocitoses utilizando as amostras isogênicas MW2B e MW2D, a taxa de MFI foi maior para MW2D (SplD positiva), indicando que a aptidão dos monócitos THP-1 para fagocitar um número maior de células bacterianas estava aumentado na presença de SplD. Corroborando tal efeito da SplD sobre a fagocitose, a taxa de MFI também estava, da mesma forma, aumentada na presença da proteína recombinante SplD.

Assim, nossos resultados utilizando duas estratégias diferentes sugerem um papel para a protease SplD aumentando a fagocitose bacteriana por monócitos THP-1. Portanto, é possível que a perda do gene para *splD* poderia representar uma vantagem adaptativa para cepas da linhagem ST105-SCC*mecII*, propiciando pelo menos em parte sua melhor adaptação em infecção na corrente sanguínea, visto que, na ausência dessa serino-protease, estariam mais capacitadas para evadir do processo de fagocitose.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadrajabi, R., Layegh-Khavidaki, S., Kalantar-Neyestanaki, D. e Fasihi, Y. (2017). Molecular analysis of immune evasion cluster (IEC) genes and intercellular adhesion gene cluster (ICA) among methicillin-resistant and methicillin-sensitive isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Prev. Med. Hyg.*, 58, E308–E314.
- Alonzo, F., 3rd e Torres, V.J. (2014). The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Mol. Biol. Ver.* 78, 199–230.
- Arêde, P., Milheiriço, C., de Lencastre, H., e Oliveira, D.C. (2012). The anti-repressor MecR2 promotes the proteolysis of the mecA repressor and enables optimal expression of β -lactam resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* 8, e1002816.
- Arias, C.A., Reyes, J., Carvajal, L.P., Rincon, S., Diaz, L., Panesso, D., Ibarra, G., Rios, R., Munita, J.M., Salles, M.J., Alvarez-Moreno, C., Labarca, J., Garcia, C., Luna, C.M., Mejia-Villatoro, C., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Rodriguez-Noriega, E., Narechania, A. e Seas, C. (2017). A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of *Staphylococcus aureus* bacteremia in nine Latin American countries. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61.
- Arshad, S., e Misumida, N. (2021). Rapid development of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) purulent pericarditis in the setting of endocarditis. *CJC Open*, 3, 1505–1508.
- Bandeira, P. (2016). Análise comparativa da virulência entre amostras de CA-MRSA e HA-MRSA pertencentes ao clone ST1-SCCmecIV – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 142 f.
- Bassetti, M., Labate, L., Melchio, M., Robba, C., Battaglini, D., Ball, L., Pelosi, P., e Giacobbe, D. R. (2022). Current pharmacotherapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia. *Expert Opin. Pharmacother.*, 23, 361–375.
- Berube, B.J. e Wardenburg, J.B. (2013). *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*, 5, 1140–1166.
- Beukers, A.G., Newton, P., Hudson, B., Ross, K., Gottlieb, T., O’Sullivan, M., Daley, D.A., Pang, S., Coombs, G.W. e van Hal, S.J. (2020). A multicentre outbreak of ST45 MRSA containing deletions in the *spa* gene in New South Wales, Australia. *J. Antimicrob. Chemother.*, 75, 1112–1116.
- Blanc, D.S., Petignat, C., Wenger, A., Kuhn, G., Vallet, Y., Fracheboud, D., Trachsel, S., Reymond, M., Troillet, N., Siegrist, H.H., Oeuvray, S., Bes, M., Etienne, J., Bille, J., Francioli, P. e Zanetti, G. (2007). Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a small geographic area over an eight-year period. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3729–3736.
- Bokarewa, M.I., Jin, T. e Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38, 504–509.
- Boogaard, F. E., Brands, X., Duitman, J., de Stoppelaar, S. F., Borensztajn, K. S., Roelofs, J. J. T. H., Hollenberg, M. D., Spek, C. A., Schultz, M. J., van ’t Veer, C., e van der Poll, T. (2018). Protease-activated receptor 2 facilitates bacterial dissemination in pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.*, 217, 1462–1471.
- Botelho, A.M.N., Cerqueira e Costa, M.O., Moustafa, A.M., Beltrame, C.O., Ferreira, F.A., Côrtes, M.F., Costa, B.S.S., Silva, D.N.S., Bandeira, P.T., Lima, N.C.B., Souza, R.C., de Almeida, L.G.P., Vasconcelos, A.T.R., Narechania, A., Ryan, C., O’Brien, K., Kolokotronis, S.O., Planet, P.J., Nicolás, M.F. e Figueiredo, A.M.S. (2019). Local diversification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239 in South America after its rapid worldwide dissemination. *Front. Microbiol.*, 10, 82.
- CDC (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Disponível em <https://www.cdc.gov>. Acesso em 26/01/2022
- Challagundla, L., Reyes, J., Rafiqullah, I., Sordelli, D.O., Echaniz-Aviles, G., Velazquez-Meza, M.E., Castillo-Ramírez, S., Fittipaldi, N., Feldgarden, M., Chapman, S.B., Calderwood, M.S., Carvajal, L.P., Rincon, S., Hanson, B., Planet, P.J., Arias, C.A., Diaz, L. e Robinson, D.A. (2018). Phylogenomic classification and the evolution of clonal complex 5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Western Hemisphere. *Front. Microbiol.*, 9, 1901.
- Chandrabalan, A., Thibeault, P. E., Smiljanov, B., Mittmann, L. A., Deinhardt-Emmer, S., Nordengrün, M., Iqbal, J., Mrochen, D. M., Chamling, B., Rauch, B. H., Reichel, C. A., Ramachandran, R., Bröker, B. M., e

- Darisipudi, M. N. (2021). Staphylococcus aureus-serine protease-like protein B (SplB) activates PAR2 and induces endothelial barrier dysfunction. *bioRxiv*.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y. e Novick, R.P. (2004). Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6076–6085.
- Chavakis, T., Preissner, K.T. e Herrmann, M. (2007). The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol.*, 28, 408–418.
- Cheung, G.Y.C., Bae, J.S. e Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12, 547–569.
- Chung, H., Lee, J. H., Jo, Y. H., Hwang, J. E., e Kim, J. (2019). Circulating monocyte counts and its impact on outcomes in patients with severe sepsis including septic shock. *Shock*, 51, 423–429.
- Chung, W. O., Hansen, S. R., Rao, D., e Dale, B. A. (2004). Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. *J. Immunol.*, 173, 5165–5170.
- Ciandrini, E., Morroni, G., Cirioni, O., Kamysz, W., Kamysz, E., Brescini, L., Baffone, W. e Campana, R. (2020). Synergistic combinations of antimicrobial peptides against biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on polystyrene and medical devices. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 21, 203–210.
- Côrtes, M.F., Botelho, A.M.N., Bandeira, P.T., Mouton, W., Badiou, C., Bes, M., Lima, N.C.B., Soares, A.E.R., Souza, R.C., Almeida, L.G.P., Martins-Simoes, P., Vasconcelos, A.T.R., Nicolás, M.F., Laurent, F., Planet, P.J. e Figueiredo, A.M.S. (2021). 00 Virulence, 12, 951–967.
- Cosimi, R.A., Beik, N., Kubiak, D.W. e Johnson, J.A. (2017). Ceftaroline for severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A systematic review. *Open Forum Infect. Dis.*, 4, ofx084.
- Cusumano, J.A., Dupper, A.C., Malik, Y., Gavioli, E.M., Banga, J., Caban, A.B., Nadkarni, D., Obla, A., Vasa, C. V., Mazo, D. e Altman, D. R. (2020). *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients infected with COVID-19: A case series. *Open Forum Infect. Dis.*, 7, ofaa518.
- David, M.Z. e Daum, R.S. (2017). Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 409, 325–383.
- de Jong, N.W.M., van Kessel, K.P.M. e van Strijp, J.A.G. (2019). Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectr.*, 7.
- de Miranda, O.P., Silva-Carvalho, M.C., Ribeiro, A., Portela, F., Cordeiro, R.P., Caetano, N., Vidal, C.F.L. e Figueiredo, A.M.S. (2007). Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13, 1165–1172.
- De Smet, K. e Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.*, 27, 1337–1347.
- Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N., Beach, M. e SENTRY Participants Group. (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.*, 32 Suppl 2, S114-32.
- Duperthuy, M. (2020). Antimicrobial peptides: Virulence and resistance modulation in Gram-negative bacteria. *Microorganisms*, 8, 280
- Elnour, A.A. e Ramadan, A. (2021). Vancomycin: an overview on current alternative antibiotic therapy to vanquish. *J. Pharm. Health Serv. Res.*, 12, 597–599.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J. e Spratt, B.G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1008–1015.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. e Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 7687–7692.
- Ericksen, B., Wu, Z., Lu, W. e Lehrer, R.I. (2005). Antibacterial activity and specificity of the six human α -defensins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 269–275.

- Eriksson, B.K.G., Thollström, U.B., Nederby-Öhd, J. e Örtqvist, Å. (2019). Epidemiology and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Stockholm County, Sweden, 2000 to 2016: overview of a “search-and-contain” strategy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 2221–2228.
- Fabisiak, A., Murawska, N. e Fichna, J. (2016). LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol. Rep.*, PR, 68, 802–808.
- Faccone, D., Togneri, A.M., Podesta, L., Perez, M., Gagetti, P., Sanchez, S., Romero, G. e Corso, A. (2014). MRSA Pediatric clone expressing *ermC* plus *InuA* genes causing nosocomial transmission and healthcare workers colonization in a neonatal intensive care unit. *Infect. Genet. Evol.*, 25, 78–80.
- Ferreira, C., Costa, S.S., Serrano, M., Oliveira, K., Trigueiro, G., Pomba, C. e Couto, I. (2021). Clonal lineages, antimicrobial resistance, and PVL carriage of *Staphylococcus aureus* associated to skin and soft-tissue infections from ambulatory patients in Portugal. *Antibiotics (Basel)*, 10, 345.
- Figueiredo, A.M.S. (2017). What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Virulence*, 8, 640–642.
- Figueiredo, A.M.S., Ferreira, F.A., Beltrame, C.O. e Côrtes, M.F. (2017). The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 43, 602–620.
- Fogel, L.A. e Wardenburg, J.B. (2022). *Staphylococcus aureus* PSMs are a double-edged sword. *Nat. Microbiol.*, 7, 12–13.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K. e Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12, 49–62.
- Foster, T.J. (2019). The MSCRAMM family of cell-wall-anchored surface proteins of gram-positive cocci. *Trends Microbiol.*, 27, 927–941.
- Frénay, H.M., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandembroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J. e Mooi, F.R. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 15, 60–64.
- Friberg, C., Haaber, J.K., Vestergaard, M., Fait, A., Perrot, V., Levin, B.R. e Ingmer, H. (2020). Human antimicrobial peptide, LL-37, induces non-inheritable reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.*, 10, 13121.
- Gasteiger, G., D’Osualdo, A., Schubert, D.A., Weber, A., Bruscia, E.M. e Hartl, D. (2017). Cellular innate immunity: An old game with new players. *J. Innate Immun.*, 9, 111–125.
- Gimza, B.D., Larias, M.I., Budny, B.G. e Shaw, L.N. (2019). Mapping the global network of extracellular protease regulation in *Staphylococcus aureus*. *MSphere*, 4.
- Goodyear, C.S. e Silverman, G.J. (2003). Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a Staphylococcal Toxin. *J. Exp. Med.*, 197, 1125–1139.
- Gu, F., He, W., Xiao, S., Wang, S., Li, X., Zeng, Q., Ni, Y. e Han, L. (2020). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections at Ruijin Hospital in Shanghai from 2013 to 2018. *Sci. Rep.*, 10, 6019.
- Guerra, F.E., Borgogna, T.R., Patel, D.M., Sward, E.W. e Voyich, J.M. (2017). Epic Immune Battles of History: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 7.
- Guina, T., Yi, E. C., Wang, H., Hackett, M., e Miller, S. I. (2000). A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.*, 182, 4077–4086.
- Gulzar, M. e Zehra, A. (2018). *Staphylococcus aureus*: A brief review. *Int J Vet Sci Res*, 020–022.
- Hartman, B.J. e Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 158, 513–516.
- Hassoun, A., Linden, P.K. e Friedman, B. (2017). Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit. Care*, 21.
- Henderson, A. e Nimmo, G.R. (2018). Control of healthcare- and community-associated MRSA: recent progress and persisting challenges. *Br. Med. Bull.*, 125, 25–41.

- Herzog, S., Dach, F., de Buhr, N., Niemann, S., Schlagowski, J., Chaves-Moreno, D., Neumann, C., Goretzko, J., Schwierzeck, V., Mellmann, A. e Kahl, B.C. (2019). High nuclease activity of long persisting *Staphylococcus aureus* isolates within the airways of cystic fibrosis patients protects against NET-mediated killing. *Front. Immunol.* 10, 2552.
- Hiramatsu K. (1992). Molecular genetics of MRSA. *Nihon Rinsho* 50, 938–944.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. e Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*, 9, 486–493.
- Holland, T. L., Bayer, A. S., e Fowler, V. G. (2022). Persistent MRSA bacteremia: Resetting the clock for optimal management. *Clin. Infect. Dis.*.
- Hu, D.L., Zhu, G., Mori, F., Omoe, K., Okada, M., Wakabayashi, K., Kaneko, S., Shinagawa, K. e Nakane, A. (2007). Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. *Cell. Microbiol.* 9, 2267–2277.
- Hu, D.L. e Nakane, A. (2014). Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur. J. Pharmacol.* 722, 95–107.
- Inoshima, N., Wang, Y. e Bubeck, W.J. (2012). Genetic requirement for ADAM10 in severe *Staphylococcus aureus* skin infection. *J. Invest. Dermatol.*, 132, 1513–1516.
- Jevons, M.P. (1961). “celbenin” - resistant staphylococci. *BMJ*, 1, 124–125.
- John, J., George, S., Nori, S.R.C. e Nelson-Sathi, S. (2019). Phylogenomic analysis reveals the evolutionary route of resistant genes in *Staphylococcus aureus*. *Genome Biol. Evol.*, 11, 2917–2926.
- Kang, C.-S., Tae, J., Lee, Y.-M., Kim, B.-S., Moon, W.-S., e Kim, D.-K. (2005). Protease-activated receptor 2 is associated with activation of human macrophage cell line THP-1. *Immune Netw.*, 5, 193.
- Karazum, H. e Datta, S.K. (2017). Adaptive Immunity Against *Staphylococcus aureus*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 409, 419–439.
- Kateete, D.P., Bwanga, F., Seni, J., Mayanja, R., Kigozi, E., Mujuni, B., Ashaba, F.K., Baluku, H., Najjuka, C. F., Källander, K., Rutebemberwa, E., Asiimwe, B.B. e Joloba, M.L. (2019). CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrob. Resist. Infect.*, 8, 94.
- Kolar, S. L., Ibarra, J. A., Rivera, F. E., Mootz, J. M., Davenport, J. E., Stevens, S. M., Horswill, A. R., e Shaw, L. N. (2013). Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *MicrobiologyOpen*, 2, 18–34.
- Kraus, D., Herbert, S., Kristian, S.A., Khosravi, A., Nizet, V., Götz, F. e Peschel, A. (2008). The GraRS regulatory system controls *Staphylococcus aureus* susceptibility to antimicrobial host defenses. *BMC Microbiol.*, 8, 85.
- Krishack, P. A., Louviere, T. J., Decker, T. S., Kuzel, T. G., Greenberg, J. A., Camacho, D. F., Hrusch, C. L., Sperling, A. I., e Verhoef, P. A. (2019). Protection against *Staphylococcus aureus* bacteremia-induced mortality depends on ILC2s and eosinophils. *JCI Insight*, 4(6).
- Kullar, R., Vassallo, A., Turkel, S., Chopra, T., Kaye, K.S. e Dhar, S. (2016). Degowning the controversies of contact precautions for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A review. *Am. J. Infect. Control*, 44, 97–103.
- Laupland, K.B., Lyytikäinen, O., Søgaaard, M., Kennedy, K.J., Knudsen, J.D., Ostergaard, C., Galbraith, J.C., Valiquette, L., Jacobsson, G., Collignon, P., Schönheyder, H.C. e International Bacteremia Surveillance Collaborative. (2013). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 19, 465–471.
- Le, K.Y. e Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front. Microbiol.*, 6, 1174.
- Lehrer, R.I. e Ganz, T. (2002). Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.*, 14, 96–102.
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D.H. e He, Q. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am. J. Transl. Res.* 11, 3919–3931.
- Lindner, B., Martin, E., Steininger, M., Bundalo, A., Lenter, M., Zuber, J., e Schuler, M. (2021). A genome-wide CRISPR/Cas9 screen to identify phagocytosis modulators in monocytic THP-1 cells. *Sci. Rep.*, 11, 12973.

- Liu, J., Chen, D., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Xu, Z. e Shirliff, M.E. (2016). Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.*, 101, 56–67.
- Llobet, E., Campos, M. A., Giménez, P., Moranta, D., e Bengoechea, J. A. (2011). Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect. Immun.*, 79, 3718–3732.
- Martin, L., van Meegern, A., Doemming, S. e Schuerholz, T. (2015). Antimicrobial peptides in human sepsis. *Front. Immunol.*, 6, 404.
- Mayadas, T.N., Cullere, X. e Lowell, C.A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.*, 9, 181–218.
- Melehan, J.H., James, D.B.A., DuMont, A.L., Torres, V.J. e Duncan, J.A. (2015). *Staphylococcus aureus* leukocidin A/B (LukAB) kills human monocytes via host NLRP3 and ASC when extracellular, but not intracellular. *PLoS Pathog.* 11, e1004970.
- Melo, M.C.N., Silva-Carvalho, M.C., Ferreira, R.L., Coelho, L.R., Souza, R.R., Gobbi, C.N., Rozenbaum, R., Solari, C.A., Ferreira-Carvalho, B.T. e Figueiredo, A.M.S. (2004). Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. *J. Hosp. Infect.*, 58, 276–285.
- Mohamed, N., Timofeyeva, Y., Jamrozy, D., Rojas, E., Hao, L., Silmon de Monerri, N.C., Hawkins, J., Singh, G., Cai, B., Liberator, P., Sebastian, S., Donald, R.G.K., Scully, I.L., Jones, C.H., Creech, C.B., Thomsen, I., Parkhill, J., Peacock, S.J., Jansen, K.U., Anderson, A.S. (2019). Molecular epidemiology and expression of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States. *PloS One*, 14, e0208356.
- Montgomery, C.P., Daniels, M., Zhao, F., Alegre, M.L., Chong, A.S. e Daum, R.S. (2014). Protective immunity against recurrent *Staphylococcus aureus* skin infection requires antibody and interleukin-17A. *Infect. Immun.*, 82, 2125–2134.
- Morrisette, T., Alosaimy, S., Abdul-Mutakabbir, J.C., Kebriaei, R. e Rybak, M.J. (2020). The evolving reduction of vancomycin and daptomycin susceptibility in MRSA-salvaging the gold standards with combination therapy. *Antibiotics (Basel)*, 9, 762.
- Murphy, A.G., O’Keeffe, K.M., Lalor, S.J., Maher, B.M., Mills, K.H.G. e McLoughlin, R.M. (2014). *Staphylococcus aureus* infection of mice expands a population of memory $\gamma\delta$ T cells that are protective against subsequent infection. *J. Immunol.*, 192, 3697–3708.
- Nasser, A., Moradi, M., Jazireian, P., Safari, H., Alizadeh-Sani, M., Pourmand, M.R. e Azimi, T. (2019). *Staphylococcus aureus* versus neutrophil: Scrutiny of ancient combat. *Microb. Pathog.*, 131, 259–269.
- Ogston, A. (1882). Micrococcus poisoning. *J. Anat. Physiol.*, 16, 526–567.
- Ono, H.K., Hirose, S., Narita, K., Sugiyama, M., Asano, K., Hu, D.L. e Nakane, A. (2019). Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. *PLoS Pathog.* 15, e1007803.
- Otto, M. (2012). MRSA virulence and spread. *Cell. Microbiol.*, 14, 1513–1521.
- Otto M. (2018). Staphylococcal Biofilms. *Microbiol. Spectr.*, 6.
- Paharik, A.E., Salgado-Pabon, W., Meyerholz, D.K., White, M.J., Schlievert, P.M. e Horswill, A.R. (2016). The *spl* Serine proteases modulate *Staphylococcus aureus* protein production and virulence in a rabbit model of pneumonia. *MSphere* 1.
- Palm, E., Demirel, I., Bengtsson, T., e Khalaf, H. (2015). The role of toll-like and protease-activated receptors in the expression of cytokines by gingival fibroblasts stimulated with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Cytokine*, 76, 424–432.
- Paulsen, J., Mehl, A., Askim, Å., Solligård, E., Åsvold, B.O. e Damås, J.K. (2015). Epidemiology and outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and sepsis in a Norwegian county 1996–2011: an observational study. *BMC Infectious Diseases*, 15, 116.
- Pérez-Montarelo, D., Viedma, E., Murcia, M., Muñoz-Gallego, I., Larrosa, N., Brañas, P., Fernández-Hidalgo, N., Gavalda, J., Almirante, B. e Chaves, F. (2017). Pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* endovascular infection isolates from different clonal complexes. *Front. Microbiol.*, 8, 917.

- Pietrocola, G., Nobile, G., Rindi, S., e Speziale, P. (2017). *Staphylococcus aureus* manipulates innate immunity through own and host-expressed proteases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 7.
- Rasheed, N.A. e Hussein, N.R. (2021). *Staphylococcus aureus*: An overview of discovery, characteristics, epidemiology, virulence factors and antimicrobial sensitivity. *Eur. J. Mol. Clin. Med.*, 8, 1160–1183.
- Read, T.D., Jacko, N.F., Petit, R.A., Pegues, D.A., e David, M.Z. (2020). 852. Genomic clusters of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) causing bloodstream infections (BSIs) in hospitalized adults, 2018-19. *Open Forum Infect. Dis.* 7, S466–S467.
- Renwick, M.J., Brogan, D.M. e Mossialos, E. (2016). A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)* 69, 73–88.
- Roberts, R.B., Chung, M., de Lencastre, H., Hargrave, J., Tomasz, A., Nicolau, D.P., John Jr, J.F., Korzeniowski, O. e Tri-State MRSA Collaborative Study Group. (2000). Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. *Microb. Drug Resist.*, 6, 245–251.
- Rodvold, K.A. e McConeghy, K.W. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin. Infect. Dis.*, 58 Suppl 1, S20-7.
- Rompikuntal, P. K., Vdovikova, S., Duperthuy, M., Johnson, T. L., Åhlund, M., Lundmark, R., Oscarsson, J., Sandkvist, M., Uhlin, B. E., e Wai, S. N. (2015). Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One*, 10(7), e0134098.
- Rosenbach, F. (1884) *Mikroorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen*. Wiesbaden, Germany: Bergmann.
- Sá-Leão, R., Sanches, I.S., Dias, D., Peres, I., Barros, R.M. e de Lencastre, H. (1999). Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1913–1920.
- Sartorio, M. U. A., Munari, A. M., Carlucci, P., Erba, P., Calcaterra, V., e Fabiano, V. (2022). MRSA femoral osteomyelitis from superinfected scabies lesions: A pediatric case report. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19, 1007.
- Schlievert, P.M. e Davis, C.C. (2020). Device-associated menstrual toxic shock syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.*, 33.
- Selvan, S.R. e Ganapathy, D. (2016). Efficacy of fifth generation cephalosporins against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-A review. *Res. J. Pharm. Technol.*, 9, 1815.
- Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M. D., Luger, T. A., e Steinhoff, M. (2008). Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 83, 1309–1322.
- Silva-Carvalho, M.C., Bonelli, R.R., Souza, R.R., Moreira, S., dos Santos, L.C.G., Conceição, M.S., Junior, S.J.M., Carballido, J.M., Rito, P.N., Vieira, V.V. e Figueiredo A.M.S. (2009). Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65, 300–305.
- Smagur, J., Guzik, K., Bzowska, M., Kuzak, M., Zarebski, M., Kantyka, T., Walski, M., Gajkowska, B., e Potempa, J. (2009). Staphylococcal cysteine protease staphopain B (SspB) induces rapid engulfment of human neutrophils and monocytes by macrophages. *Biol. Chem.*, 390, 361–371.
- Sousa-Junior, F.C., Silva-Carvalho, M.C., Fernandes, M.J.B.C., Vieira, M.F.P., Pellegrino, F.L.P.C., Figueiredo, A.M.S., de Melo, M.C.N. e Milan, E.P. (2009). Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 42, 877–881.
- Stentzel, S., Teufelberger, A., Nordengrün, M., Kolata, J., Schmidt, F., van Crombruggen, K., Michalik, S., Kumpfmüller, J., Tischer, S., Schweder, T., Hecker, M., Engelmann, S., Völker, U., Krysko, O., Bachert, C., e Bröker, B. M. (2017). Staphylococcal serine protease-like proteins are pacemakers of allergic airway reactions to *Staphylococcus aureus*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 139, 492-500.e8.
- Stempel, N., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Vieillard, J., Lesouhaitier, O., Brenner-Weiss, G., e Overhage, J. (2013). Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 8(12), e82240.
- Sultan, A.R., Swierstra, J.W., Lemmens-den Toom, N.A., Snijders, S.V., Maňásková, S.H., Verbon, A. e van Wamel, W.J.B. (2018). Production of staphylococcal complement inhibitor (SCIN) and other immune

modulators during the early stages of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in a mammalian cell culture medium. *Infect. Immun.*, 86.

Takadama, S., Nakaminami, H., Kaneko, H. e Noguchi, N. (2020). A novel community-acquired MRSA clone, USA300-LV/J, uniquely evolved in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.*, 75, 3131–3134.

Teufelberger, A. R., Nordengrün, M., Braun, H., Maes, T., De Grove, K., Holtappels, G., O'Brien, C., Provoost, S., Hammad, H., Gonçalves, A., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., Bröker, B. M., Bachert, C., e Krysko, O. (2018). The IL-33/ST2 axis is crucial in type 2 airway responses induced by *Staphylococcus aureus*-derived serine protease-like protein D. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 141, 549-559.e7.

Teufelberger, A. R., Van Nevel, S., Hulpiau, P., Nordengrün, M., Savvides, S. N., De Graeve, S., Akula, S., Holtappels, G., De Ruyck, N., Declercq, W., Vandenabeele, P., Hellman, L., Bröker, B. M., Krysko, D. V., Bachert, C., e Krysko, O. (2020). Mouse strain-dependent difference toward the staphylococcus aureus allergen Serine protease-like protein D reveals a novel regulator of IL-33. *Front. Immunol.*, 11, 582044.

Thorlacius-Ussing, L., Sandholdt, H., Larsen, A.R., Petersen, A. e Benfield, T. (2019). Age-dependent increase in incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia, Denmark, 2008-2015. *Emerg. Infect. Dis.*, 25.

Tiwari, K. B., Gatto, C., Walker, S., e Wilkinson, B. J. (2018). Exposure of *Staphylococcus aureus* to targocil blocks translocation of the major autolysin atl across the membrane, resulting in a significant decrease in autolysis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 62.

Tkadlec, J., Capek, V., Brajerova, M., Smelikova, E., Melter, O., Bergerova, T., Polivkova, S., Balejova, M., Hanslianova, M., Fackova, D., Neradova, K., Tejkalova, R., Vagnerova, I., Bartonikova, N., Chmelarova, E., Drevinek, P. e Krutova, M. (2021). The molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Czech Republic. *J. Antimicrob. Chemother.*, 76, 55–64.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., e Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171–176.

Urushibara, N., Aung, M.S., Kawaguchiya, M. e Kobayashi, N. (2020). Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type XIV (5A) and a truncated SCC*mec* element in SCC composite islands carrying *speG* in ST5 MRSA in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.*, 75, 46–50.

van der Maten, E., de Jonge, M.I., de Groot, R., van der Flier, M. e Langereis, J.D. (2017). A versatile assay to determine bacterial and host factors contributing to opsonophagocytotic killing in hirudin-anticoagulated whole blood. *Sci. Rep.*, 7, 42137.

van Hal, S.J., Jensen, S.O., Vaska, V.L., Espedido, B.A., Paterson, D.L. e Gosbell, I.B. (2012). Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 25, 362–386.

Viana, A.S., Botelho, A.M.N., Moustafa, A.M., Boge, C.L.K., Ferreira, A.L.P., da Silva Carvalho, M.C., Guimarães, M.A., Costa, B.S.S., de Mattos, M.C., Maciel, S.P., Echevarria-Lima, J., Narechania, A., O'Brien, K., Ryan, C., Gerber, J.S., Carvalho, B.T.F., Figueiredo, A.M.S. e Planet, P.J. (2021). Multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with bacteremia and monocyte evasion, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 27, 2825–2835.

Wang, W., Hu, Y., Baker, M., Dottorini, T., Li, H., Dong, Y., Bai, Y., Fanning, S., e Li, F. (2022). Novel SCC*mec* type XV (7A) and two pseudo-SCC*mec* variants in foodborne MRSA in China. *J. Antimicrob. Chemother.*

WHO (2014). Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. Disponível em: <https://www.who.int/en/>. Acesso em 26/01/2022

WHO (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: <https://www.who.int/en/>. Acesso em 26/01/2022

Yang, D., Chen, Q., Chertov, O. e Oppenheim, J.J. (2000). Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.*, 68, 9–14.

Zanetti, M. (2004). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 75, 39–48.

Zdzalik, M., Kalinska, M., Wysocka, M., Stec-Niemczyk, J., Cichon, P., Stach, N., Gruba, N., Stennicke, H.R., Jabaiah, A., Markiewicz, M., Kedracka-Krok, S., Wladyka, B., Daugherty, P.S., Lesner, A., Rolka, K., Dubin, A., Potempa, J. e Dubin, G. (2013). Biochemical and structural characterization of SplD protease from *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 8, e76812.

Zhou, J., Zhao, H., Yang, H., He, C., Shu, W., Cui, Z., e Liu, Q. (2022). Insights into the impact of small RNA SprC on the metabolism and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 12, 746746.