



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ricardo Filipe Amado Simões

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Maria Manuela Rocha Helena e da Dra. Ana Filipa Lourenço e Monografia intitulada “Mecanismos de Evasão Bacteriana ao Sistema Imune” sob orientação da Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Ricardo Filipe Amado Simões

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Maria Manuela Rocha Helena e da Dra. Ana Filipa Lourenço e Monografia intitulada “Mecanismos de Evasão Bacteriana ao Sistema Imune” sob orientação da Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

Eu, Ricardo Filipe Amado Simões, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2018283694, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Mecanismos de evasão bacteriana ao sistema imune” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 1 de setembro de 2023.

Ricardo Filipe Amado Simões

(Ricardo Filipe Amado Simões)

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Sara Domingues, à Dra. Ana Filipa Lourenço e à Dra. Manuela Rocha, pela atenção, preocupação, disponibilidade e dedicação, e sem as quais o meu crescimento académico não seria possível.

Aos colaboradores e restantes colegas, tanto da Farmalabor como da Farmácia Rocha, pelo acolhimento, ensinamentos, melhorias e ajuda imprescindível.

Aos meus pais, avós e restante família, pela paciência, preocupação e apoio incondicional, nas fases boas e menos boas do percurso académico e pessoal.

Aos escuteiros, nomeadamente a toda a equipa da primeira secção, a todos os meus lobitos, e especialmente aos amigos que me acompanham à anos; Ao Rui, ao Tiago, ao Ivo, à Maduro, à Elena, à Inês e à Sara, por me fazerem crescer dentro e fora dos escuteiros.

À Diana e a todos no centro de explicações, pela confiança e pela experiência de poder deixar um pouco do que sei nos mais novos.

Aos amigos de Coimbra; à Bia, à Joana, ao Rui, ao Tiago, à Francisca, à Mariana, à Andreia e à Victoria, pelas memórias, jantares, jogos e muito mais; por fazerem destes 5 anos algo para nunca esquecer.

Ao Tiago, pelos velhos tempos, pelos tempos de hoje, e pelos tempos que não de vir.

À Inês, por me ensinar o valor do otimismo.

A todos os restantes, amigos e família,
um muito obrigado!

ÍNDICE

Parte I – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

ABREVIATURAS	6
1. Introdução.....	7
2. Análise SWOT	8
2.1 Pontos Fortes	8
2.2 Pontos Fracos.....	12
2.3 Oportunidades	13
2.4 Ameaças.....	14
3. Conclusão	15
4. Referências Bibliográficas.....	16

Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

ABREVIATURAS.....	18
1. Introdução.....	19
2. Análise SWOT	20
2.1 Pontos Fortes	20
2.2 Pontos Fracos.....	22
2.3 Oportunidades	23
2.4 Ameaças.....	24
3. Conclusão	25
4. Casos Práticos.....	26
5. Referências Bibliográficas.....	29

Parte III – Monografia "Mecanismos de Evasão Bacteriana ao Sistema Imune"

ABREVIATURAS.....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO.....	33
1. Sistema Imunitário.....	33
2. Evasão do Sistema Imune	36
2.1 Variação Antigénica	38
2.2 Alteração da Carga de Superfície.....	40
2.3 Camuflagem Estrutural	41
2.4 Proteínas Efetoras.....	41
2.5 Sobrevivência Intracelular	43
2.5.1 Inibição da Maturação Fagossômica	44
2.5.2 Inibição da Apoptose.....	45
2.5.3 Uso de Projeções Citoesqueléticas.....	47
2.6 Controlo sobre Citocinas.....	48
2.7 Proteção Oxidativa.....	51
2.8 Evasão Comensal	53
2.9 Evasão Bacteriana Incomum	55
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA
Farmalabor – Produtos Farmacêuticos, S.A.

ABREVIATURAS

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IA – Instrução de Acondicionamento

IF – Instrução de Fabrico

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PAD – Pedido de Alteração ao Documento

PQR – *Product Quality Review*

QP – *Qualified Person*

QTA – *Quality/Technical Agreements*

SOP – *Standart Operating Procedure*

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

Com o finalizar do meu tempo como estudante na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, a última etapa envolveu o ingresso em estágio curricular, como explicitado pelo plano de estudos do MICF (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas).

Deste modo, além do estágio obrigatório em farmácia comunitária, escolhi realizar adicionalmente estágio em indústria farmacêutica. Esta decisão baseou-se em vários fatores, entre eles a necessidade de experienciar várias áreas de atuação farmacêutica, de modo a fomentar a aprendizagem e a experiência de trabalho.

No entanto, fundamentalmente, esta decisão baseou-se na curiosidade em aprender como algo tão complexo e intrincado como a indústria farmacêutica consegue ser eficaz, produzindo milhares de produtos por dia, sem desfalcar, abrandar ou errar.

Juntando áreas tão diversas como a produção, o embalamento, a investigação, o controlo de qualidade e a garantia de qualidade, tudo num único local, sem se equivocar, era uma realidade que estava curioso por descobrir.

Assim sendo, de modo a realizar efetivamente o estágio proposto, escolhi a unidade de produção industrial da empresa Medinfar, a Farmalabor, sediada em Condeixa-a-Nova¹.

Esta é uma empresa de renome, de origem portuguesa, com um elevado portfólio de produtos, alguns excecionalmente conhecidos, como Halibut[®] e Aero-Om[®], e com uma elevada internacionalização, pelo que se tornou bastante atraente como local de estágio.

Sobre a mesma, esta foi fundada em 1970, crescendo até se tornar, hoje, numa empresa líder em Portugal na categoria de Saúde do Consumidor e Dermatologia, sendo ainda considerada a terceira maior empresa portuguesa. O seu foco vai desde cosméticos e suplementos, ao fabrico de produtos farmacêuticos, distribuição e comercialização².

Possui também uma filial em Marrocos, e uma área de distribuição um pouco por todo o mundo, desde a Europa, até ao Médio Oriente e Ásia².

Focando novamente no estágio, este assentou no departamento da Garantia de Qualidade, na área de Gestão de Documentação e Informação sob orientação da Dra. Ana Filipa Lourenço.

Teve a duração de 3 meses, nos quais coloquei em prática conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos de curso, mas mais precisamente, das áreas das unidades curriculares de Gestão e Garantia de Qualidade e de Assuntos Regulamentares, com um ênfase especial na primeira.

Assim sendo, o presente relatório de estágio pretende, sob a forma de uma análise SWOT, examinar o período de aprendizagem referido, estipulando os pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças do estágio ao qual me propôs.

2. Análise SWOT

<p style="text-align: center;">Pontos Fortes</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Acolhimento e ambiente caloroso.</i>• <i>Autonomia e capacidade de pesquisa autônoma.</i>• <i>Possibilidade de autoaprendizagem.</i>• <i>Conhecimento e formação.</i>• <i>Plano de estágio diverso.</i>• <i>Comparência em reuniões multidisciplinares.</i>	<p style="text-align: center;">Pontos Fracos</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Tempo de estágio.</i>• <i>Falha nos fluxos de informação.</i>
<p style="text-align: center;">Oportunidades</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Intervenção do Farmacêutico na Indústria.</i>	<p style="text-align: center;">Ameaças</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Pouca experiência curricular na área.</i>• <i>Falta de recursos humanos na área.</i>

2.1 Pontos Fortes

Acolhimento e ambiente caloroso

Desde o primeiro momento de entrada que senti que havia um grande esforço para acolher da melhor forma os estagiários, seja através das múltiplas formações ao longos dos primeiros dias, bem como pela oportunidade de visitar partes da fábrica, e de conhecer diversas pessoas em cargos distintos.

Nunca senti pressão excessiva em trabalhar para cumprir tempos específicos, e o ambiente, no geral, foi um de ensinamento e partilha de conhecimentos e experiências.

Além disso, encontrando-me num gabinete com várias outras pessoas, todas elas experientes na área, ou em várias vertentes dela, o esclarecimento de dúvidas, quando estas surgiam, era fácil e imediato, melhorando e acrescentando fluidez à minha aprendizagem.

Deste modo, considero que os pontos acima referidos foram uma mais-valia para o bom decorrer do estágio.

Autonomia e capacidade de pesquisa autónoma

Apesar de ser apenas um estagiário, desde cedo que me foi dada autonomia para desenvolver certas tarefas que me iam sendo confiadas.

Dessas, muitas requeriam a pesquisa em locais específicos, como sites, por exemplo Eudralex³ ou Infomed⁴, ou bases de dados empresariais. Estando inserido na área de Gestão Documental, era imprescindível ter acesso a esses recursos, de modo a completar as tarefas.

No entanto, a possibilidade de o fazer autonomamente impulsionou e ofereceu motivação e confiança ao trabalho realizado.

Possibilidade de autoaprendizagem

Como referido anteriormente, rapidamente obtive acesso às bases de dados da empresa, no começo do estágio.

Estas revelaram-se fulcrais, pois contêm informações e documentos que auxiliaram a minha formação na área. Um tipo de documentos que explorei demoradamente, de modo a melhor me inteirar sobre a temática da indústria, foram os Procedimentos Organizacionais Normalizados, ou *Standart Operating Procedures*, em inglês, ou em siglas PONs/SOPs, mais comumente referidos como SOPs.

Estes contêm informação sobre um dado procedimento operacional dentro da fábrica, como seja, por exemplo, o procedimento relativo à higienização, ou à boa gestão documental, ou até mesmo às diretivas para a libertação de lotes para o mercado. Todos estes procedimentos são redigidos e elaborados de acordo com as diretrizes que constam nas *guidelines* da Comissão Europeia, mais especificamente, no Eudralex – Volume 4.

Estes documentos tornaram-se cruciais para a minha aprendizagem, pois serviram para prolongar e complementar todo o conhecimento que já tinha adquirido previamente sobre a área, dentro das unidades curriculares da faculdade, mas que ali se tornara mais concreto e específico.

Além disso, estes documentos tornaram-se um prelúdio para as tarefas que iria realizar posteriormente, pois muitas requeriam algum conhecimento aludido aos SOPs, como por exemplo, sobre a gestão documental ou gestão de integridade de informação.

No entanto, tão importante como ter a possibilidade de ler os documentos, foi ter-lhes acesso rápido em qualquer momento do estágio, possibilitando uma ajuda para toda e qualquer resolução de problemas, capacitando-me para uma autoaprendizagem e para uma busca autónoma de informação. Isto contribuiu para rentabilizar tanto o meu tempo, como o dos meus colegas, impedindo algumas perdas de tempo que foram facilmente resolvidas com o acesso autónomo aos documentos.

Conhecimento e formação

Depois do curto período de formação, comecei o estágio propriamente dito, dentro da área de Gestão Documental. Nela, foram-me confiadas várias tarefas, sendo a principal a revisão, formatação e atualização de Instruções de Fabrico, mais conhecidas como IFs.

Havia uma séria necessidade de abordar esta tarefa, devido ao tempo limitado dos colaboradores. O volume de documentos a rever foi aumentando, até provocarem um consumo intenso de tempo, devido a terem que ser analisados individualmente, antes de serem enviados para o setor da produção. Depois do envio, estas IFs vão sendo preenchidas com os dados do lote ao longo do processo de fabrico, constituindo, no final, o registo de lote.

Deste modo, dediquei alguma parte do meu tempo a analisá-las, verificando a existência de Pedidos de Alteração ao Documento, ou PADs, fazendo a sua avaliação destes em conjunto com o farmacêutico responsável, garantindo a *compliance* da documentação com o dossier de AIM.

Realizei a mesma tarefa em Instruções de Acondicionamento, ou IAs, além de colaborar no processo de gestão/migração de *Quality Technical Agreements* ou QTAs, para o sistema documental. Não só, mas também, me foi confiado a verificação de lotes de validação a produzir. Estes requerem a sua identificação na IF e inclusão de documentação específica relativa a ensaios adicionais a realizar neste tipo de lotes. A avaliação das IFs é efetuada de acordo com o plano de pesagens, que indica que produtos, e lotes, irão ser produzidos nessa semana, para melhor ajustar as tarefas da Gestão Documental, consoante as prioridades encontradas.

Além disso, também fui incumbido da impressão e envio da documentação de lotes para o setor de produção, bem como a gestão temporária do arquivo de registos de lote. Colaborei igualmente, no processo de gestão de arquivo/destruição de registos de lote, conforme previsto nas GMP³. Deste modo, deverá ser retida a documentação de lote durante um período correspondente ao prazo de validade acrescido de um ano, ou no mínimo 5 anos após certificação, conforme for o maior espaço temporal. Após este período, poderá proceder-se ao processo de identificação e destruição da documentação. Os lotes de validação permanecem arquivados, conforme procedimento interno.

A adicionar à experiência de trabalho, também ganhei destreza na navegação por vários sistemas documentais e bases de dados, como seja o *Achiever Plus* e o *JD Edwards*, respetivamente.

Com tudo isto, posso confirmar que o meu conhecimento na área de indústria farmacêutica aumentou imenso, principalmente dentro do setor em causa, sentindo-me

bastante mais confiante com terminologias, procedimentos e tarefas a realizar, se eventualmente decidir enveredar por esta área.

Plano de estágio diverso

O plano de estágio, além de servir como uma ferramenta organizacional do estágio em si, também nos apresentou várias formações, das mais variadas áreas.

Estas, não só servem para inteirar o colaborador sobre procedimentos a tomar em locais e contextos específicos da fábrica, como sendo um exemplo a higienização aquando entrada no setor da produção, mas também ajudam a familiarizar o estagiário num ambiente pouco habitual.

Uma grande vantagem sua é a de permitir a existência de formações de áreas distintas, permitindo-me adquirir conhecimento, ainda que básico, mas que deveras importante, sobre temáticas dentro do setor industrial, como a manutenção, os procedimentos ambientais, os de integridade de dados e gestão documental, entre outros.

Ao se apresentar diversificado, o plano permitiu a integração de conhecimentos distintos, que normalmente não seriam ensinados, a menos que se dirigissem ao pessoal específico do setor onde se inserem.

Comparência em reuniões multidisciplinares

Ao longo dos 3 meses, foi-me possibilitada a presença em reuniões nas quais a área da Gestão Documental participasse, seja presencialmente ou *online*.

Estas incluíam temas como a discussão do plano de pesagens entre vários departamentos da Farmalabor, de forma a analisar casos mais críticos de produtos, IFs, IAs, bem como fornecedores ou clientes, que merecessem especial atenção e esforço redobrado.

Estas reuniões foram importantes para me fazer perceber quais os atributos farmacêuticos necessários ter mais em conta para uma produção eficiente de um produto. Um dos atributos a analisar é, por exemplo, a necessidade da validação de um dado processo de fabrico, no caso de existir uma alteração de equipamento, como um granulador ou uma compressora. Estes automaticamente requerem uma produção inicial de lotes de validação, de forma a cumprir com todas as conformidades desejadas, nas fases posteriores de fabrico.

Desse modo, são efetuadas análises adicionais nestes lotes (avaliando fatores como a homogeneidade de conteúdo na mistura final, compressibilidade com variação de durezas e velocidades e perfis de dissolução) de forma a garantir que qualquer alteração introduzida no

processo não impacta a qualidade final do produto, bem como não o impede de ser robusto, reproduzível e capaz.

Como referido, nestas reuniões foram discutidos estes e outros critérios importantes a ser analisados, no dia-a-dia da produção industrial medicamentosa.

Outro tipo de reuniões muito importante para me inteirar na área industrial foram as reuniões de pedidos de elementos, realizadas em modo *online*, nas quais participavam membros da área regulamentar, tanto da Farmalabor, como da Medinfar. Nestas, eram analisados pedidos de informação, de relatórios ou de contratos, por parte de clientes ou fornecedores, que posteriormente eram reencaminhados para áreas específicas, e debatidos entre todos na reunião.

Ao participar nestas reuniões, pude verificar a verdadeira carga regulamentar que precede qualquer passo nesta área, na qual até simples pedidos de informação podem resultar em quantidades enormes de trabalho, de pesquisa e de procura de informação.

Por fim, presenciei e participei também em reuniões *Kayzen*, dentro da área onde estive inserido. Estas reuniões, realizadas semanalmente, têm como objetivo apresentar o trabalho realizado ao longo da semana, bem como apresentar indicadores de melhoria de processos ou tarefas, de modo a mostrar, visualmente, através de gráficos, o trabalho feito, o que falta fazer, e as dificuldades em fazê-lo.

Normalmente, estas reuniões eram feitas entre as áreas de Gestão Documental, a de Gestão de Relatórios de Qualidade do Produto, ou *Product Quality Reviews*, ou em sigla PQRs, e entre o Diretor Técnico, ou *Qualified Person*, QP em sigla, do Departamento da Garantia da Qualidade, de modo a apresentar uma visão geral destas áreas em conjunto.

Através destas reuniões, retive a importância de planear e registar todas as ações efetuadas ao longo da semana, para posteriormente serem analisadas, discutidas e melhoradas, em conjunto com outros colaboradores.

2.2 Pontos Fracos

Tempo de estágio

Apesar de parecerem uma grande quantidade, 3 meses não são tempo suficiente para experienciar muito do que a indústria farmacêutica tem para oferecer, nomeadamente em termos de departamentos diferentes, como o Controlo de Qualidade ou a Produção.

Devido ao facto da área de Gestão Documental ter, já de si, uma grande carga de trabalho associada, não me foi possível experienciar muitas outras áreas distintas, que porventura poderiam acrescentar algo mais para a minha formação académica e pessoal.

Falha nos fluxos de informação

Apesar de ter uma componente fortemente documental, a área de Gestão Documental também está encarregue de responder a pedidos de informação, por parte de outros colaboradores da Farmalabor, Medinfar ou de clientes e fornecedores externos.

No entanto, muitos dos pedidos apenas podem ser respondidos e analisados por áreas ou pessoas específicas, com conhecimento para tal.

Devido ao facto de não haver um procedimento normalizado para a gestão do fluxo de informação, estipulando as áreas, ou pessoas, a quem os clientes, fornecedores ou colaboradores devem enviar diretamente os pedidos, acaba por haver um amontoar de emails e pedidos na Gestão Documental.

Isto culmina numa tarefa simples, a de reencaminhamento de emails para as áreas/pessoas necessárias, mas que invariavelmente, acaba por consumir muito tempo. Tempo esse que deve ser o mais proveitosamente utilizado, numa área tão vasta e importante como a Gestão Documental, que é necessária a cada segundo, para o bom funcionamento da fábrica.

Se fosse implementada uma boa gestão do fluxo de informação, os pedidos iriam diretamente para os locais necessários, evitando uma intervenção pela área referida, agradando tanto aos colaboradores e clientes, que se dirigem diretamente à pessoa que precisam, poupando tempo, mas também à Gestão Documental, ficando livre para realizar tarefas mais urgentes.

2.3 Oportunidades

Intervenção do Farmacêutico na Indústria

Apesar deste estágio me guarnecer com conhecimento, experiência e ritmo de trabalho, o que mais obtenho dele é uma visão geral da intervenção do farmacêutico na área da indústria farmacêutica.

O curso do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas é, sem dúvida, um curso completo e diverso, formando-nos para várias áreas farmacêuticas, como a vertente hospitalar e a comunitária. No entanto, sinto que a atuação na indústria foi escassamente explicada, pelo menos não abordando todas as zonas onde o farmacêutico é crucialmente necessário, como a Gestão Documental, a gestão de processos de validação, entre muitas outras.

A oportunidade de experienciar, em primeira mão, as diferentes vertentes de atuação do farmacêutico é algo que qualquer estudante anseia, deixando-me grato por tê-lo feito. Ainda mais do que isso, a possibilidade de visitar e poder observar e conhecer uma fábrica da indústria farmacêutica é algo raro, e que me guarnece de conhecimento sobre os

equipamentos e processos usados na produção, algo que apenas tinha contactado vagamente no percurso académico, bem como teoricamente pela Gestão Documental.

A capacidade de conseguir esquematizar um mapa mental com algumas áreas de atuação, como o Planeamento Industrial, Gestão de Desvios e Gestão Documental, e suas interligações e conexões, também é algo que apenas conseguiria tendo vivido este estágio, e é, com certeza, algo que será extremamente útil, caso venha a seguir esta área profissionalmente.

2.4 Ameaças

Pouca experiência curricular na área

Apesar dos conhecimentos transmitidos pelo Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas serem múltiplos e diversificados, uma área que notei alguma falha foi precisamente na área de Gestão Documental, pois o grande foco da formação está na indústria no geral, bem como nas suas partes mais laboratoriais, como o Controlo de Qualidade, e não tanto nas secções regulamentares.

Apesar de duas unidades curriculares relacionadas com o assunto terem sido lecionadas, como sendo a de Assuntos Regulamentares e a de Gestão e Garantia da Qualidade, apenas a segunda me foi verdadeiramente útil, guarneecendo-me de conhecimentos que usaria efetivamente no período de estágio.

No entanto, ainda assim diria que apenas uma unidade curricular verdadeiramente relacionada com esta área não é suficiente, e incentivaria a que mais conhecimentos pudessem ser integrados sobre a Gestão Documental, durante o curso, pois é realmente uma área vasta, mas realmente necessária para o bom funcionamento da indústria.

Falta de recursos humanos na área

Talvez devido ao facto de não ser considerada uma área tão apetecível ou prática como o Controlo de Qualidade, pelas suas funções laboratoriais, a área de Gestão Documental apresentava-se com algum défice em recursos humanos.

Aliado a isso, e pelo facto de ser considerada uma área “geral”, onde não há apenas uma única tarefa a ser desenvolvida, a quantidade de tarefas, pedidos e urgências tendia a acumular-se, resultando numa sobrecarga de trabalho.

Além disso, e como explicitado anteriormente, a falta de um procedimento normalizado para retratar os fluxos de informação também acrescenta mais uma dificuldade que a Gestão Documental tinha que superar.

No final, este excesso de trabalho pode mesmo comprometer a eficácia e eficiência da nossa função como farmacêuticos, pois apesar de não interferir diretamente com o produto final do nosso trabalho, devido à existência de procedimentos de dupla verificação documental nas várias fases do processo, pode desgastar-nos e impedir-nos de dedicar tempo e recursos noutras áreas do setor, onde o contributo do farmacêutico é igualmente essencial.

3. Conclusão

O estágio na unidade de produção industrial Farmalabor foi, sem dúvida, um dos pontos mais enriquecedores do percurso académico, considerando-me privilegiado por poder tê-lo realizado.

Com ele aprendi imenso sobre a indústria farmacêutica, sobre algumas das suas ligações e detalhes internos, e fundamentalmente, sobre a necessidade crucial da existência do departamento da Garantia da Qualidade, nomeadamente da área de Gestão Documental.

Dessa forma, devido à área não ser, inicialmente, das que daria maior preferência, o facto é que contornei essa ideia, ao longo dos meses de estágio, e hoje considero não só uma área interessante como fulcral para o bom funcionamento da indústria.

Ao interligar-se com tantas outras, esta área também fornece um ótimo ponto de partida para muitos outros departamentos, e, sem a sua existência, todos esses certamente teriam muito mais dificuldade a ultrapassar obstáculos, no dia-a-dia.

Com ela, não só fomentei a atenção e o foco em pormenores, como aprendi a priorizar tarefas, a gerir o tempo consoante estas, e a integrar ensinamentos, tanto curriculares, como provenientes de colegas e colaboradores.

4. Referências Bibliográficas

- ¹ GRUPO MEDINFAR. (2023). **Grupo Medinfar**. [Consultation date march 15th 2023]. Available from: <https://www.medinfar.pt/pt>
- ² GRUPO MEDINFAR. (2023). **Quem somos**. [Consultation date march 15th 2023]. Available from: <https://www.medinfar.pt/pt/sobre-nos/quem-somos>
- ³ EUROPEAN COMMISSION. (1989). **Eudralex – Volume 4 – Good Manufacturing Practices (GMP) guidelines**. [Consultation date march 20th 2023]. Available from: https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_en
- ⁴ INFARMED. (2003). **Infomed – Base de Dados de Medicamentos de Uso Humano**. [Consultation date march 21th 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/>

PARTE II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Farmácia Rocha – Condeixa-a-Nova

ABREVIATURAS

DCI – Denominação Comum Internacional

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

OTC – “*Over The Counter*”

RCM – Resumo das Características do Medicamento

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

Integrado no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) insere-se a conclusão de um estágio em Farmácia Comunitária, de forma a completar o nosso percurso académico.

Apesar do seu cariz obrigatório, é apenas com este estágio que conseguimos compreender uma das maiores vertentes de atuação farmacêutica, sendo também a mais próxima do público, e através da qual somos geralmente reconhecidos pela sociedade em geral.

Neste aspeto, o estágio foi fundamental para contrariar o estigma presente na mentalidade da generalidade da população, no qual o farmacêutico é abordado como um simples dispensador de fármacos.

Os meses passados em estágio foram suficientes para eliminar essa noção da minha mente, e espero ter sido capaz de também a eliminar da mente das pessoas que atendi, de forma a melhorar a perceção da nossa profissão perante elas.

Apesar de não ser tão diverso ou complexo como a indústria farmacêutica, na qual realizei o anterior período de estágio, é um ambiente igualmente desafiador, com as suas próprias dificuldades, e no qual o atendimento ao público é tão importante como a gestão eficaz da farmácia, no *backoffice*.

Quanto ao local de estágio, escolhi a Farmácia Rocha, sediada na localidade de Condeixa-a-Nova, devido à sua localização, à sua existência de longa data e ao ambiente e colaboradores, que já me eram familiares, graças ao estágio de verão realizado no mesmo local, no ano de 2021.

Esta farmácia possui alguma riqueza em tradição, pois é das mais antigas da localidade referida, além de ainda realizar a preparação de manipulados, algo que tem vindo a esbater-se no esquema mais industrializado da atualidade.

Este período de estágio ocorreu sob orientação da Dra. Manuela Rocha, diretora técnica da farmácia, bem como com ajuda, apoio e ensinamentos de todo o restante corpo farmacêutico presente.

Sendo assim, este relatório pretende examinar o estágio referido, sob a forma de uma análise SWOT, categorizando e expondo os pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças deste período de aprendizagem.

2. Análise SWOT

Pontos Fortes <ul style="list-style-type: none">• <i>Equipa diversa, experiente e prestável</i>• <i>Casa de Saúde Rainha Santa Isabel</i>• <i>Receção de medicamentos hospitalares</i>• <i>Elaboração de medicamentos manipulados</i>• <i>Serviços e atendimento</i>	Pontos Fracos <ul style="list-style-type: none">• <i>DCI e nomes comerciais</i>• <i>Desvalorização no atendimento</i>
Oportunidades <ul style="list-style-type: none">• <i>Formações</i>• <i>Aconselhamento com OTCs</i>	Ameaças <ul style="list-style-type: none">• <i>Pontos de venda de MNSRM</i>• <i>Lacunas formativas</i>

2.1 Pontos Fortes

Equipa diversa, experiente e prestável

Devido ao curto contacto com farmácia comunitária, no estágio de verão alguns anos antes, necessitei de recomeçar de novo nas aprendizagens deste setor. Ainda seria algum tempo até estar confortável para iniciar o atendimento ao balcão, por isso primeiramente foquei-me nas tarefas de *backoffice*.

Receção e gestão de encomendas, bem como de *stocks*, e de organização de gavetas e prateleiras foram as primeiras a que me dediquei, com o auxílio inicial dos colaboradores presentes.

Estes foram fundamentais para me inteirar no trabalho farmacêutico, e revelaram-se sempre prontos a ajudar em qualquer tarefa, ou a esclarecer qualquer dúvida que surgisse. Dessa forma, posso indicar que o acolhimento e integração iniciais foram calorosos, permitindo uma melhor aprendizagem ou um lembrar de conhecimentos já adquiridos.

No âmbito dessa aprendizagem, também estive, durante algumas semanas iniciais, a observar os atendimentos realizados pelos meus colegas, de forma a preparar-me para quando eventualmente fosse para o balcão.

Isto permitiu não só conferir que todos possuíam uma elevada proficiência nesta prática, bem como perceber que cada um abordava o atendimento de ângulos diferentes, mas igualmente válidos, devido à sua experiência de trabalho anterior. Por exemplo, alguém que trabalhou algum tempo em indústria farmacêutica conseguia mais facilmente explicar o porquê

de medicamentos genéricos poderem ser considerados eficazmente semelhantes, ou bioequivalentes, aos de marca, pois conhecia intimamente os ensaios que são realizados para o comprovar.

Casa de Saúde Rainha Santa Isabel

Como referido, antes de iniciar o atendimento ao público, priorizei a observação à distância, bem como o manuseamento do programa Sifarma 2000[®], nomeadamente em relação à gestão e receção de encomendas.

No entanto, outra tarefa inicial que aumentou a minha capacidade futura para o atendimento foi o aviamento de receitas para a Casa de Saúde Rainha Santa Isabel.

Esta é uma unidade de saúde, localizada na mesma freguesia da farmácia, que presta diversos cuidados médicos especializados, como Psiquiatria ou Reabilitação Física, e à qual a farmácia é responsável por fornecer qualquer medicação que seja necessária. Assim, são enviadas mensalmente receitas que necessitam de ser aviadas, ficando o custo dos medicamentos ao encargo do instituto, ou da família do utente.

Esta tarefa fomentou a minha destreza e familiaridade não só com o programa informático, mas também com o ato de dispensar uma receita. Apesar de não ser totalmente representativo do ato em si, permite um treino mais prático do que uma simples observação, e ajudou-me a interiorizar o método de dispensa de receitas mais rapidamente.

Receção de Medicamentos Hospitalares

Por vezes, alguns dos nossos utentes recebiam medicação proveniente do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, com autorização do médico responsável, no caso de necessitarem de medicação específica do meio hospitalar, encontrando-se o doente em ambiente de ambulatório.

Nesse caso, a medicação é enviada do hospital para a farmácia que o doente usualmente frequenta, para que este a levante quando necessitar, sendo dispensada obrigatoriamente sob supervisão de um farmacêutico.

Ocorrendo o envio, é essencial rececionar a medicação no sistema informático, na chegada. Esta é feita preenchendo uma ficha com os dados do doente, do farmacêutico responsável pela receção, bem como com informação sobre o medicamento, como o seu nome, número de lote e quantidade disponibilizada.

Apesar desta tarefa estar restrita a farmacêuticos responsáveis, a sua observação foi-me útil para perceber um pouco da ligação entre farmácias e hospitais, e em como os vários serviços se interligam para melhor prestar assistência ao doente.

Elaboração de Medicamentos Manipulados

Apesar de já não ser a norma no setor, ocasionalmente surgem receitas contendo medicamentos manipulados para serem preparados na farmácia, podendo ser considerados Fórmulas Magistrais ou Preparados Oficiais, consoante sejam realizados sob orientações de uma receita médica, ou sob indicações compendiais, respetivamente.

Após a sua preparação, é necessário preencher uma ficha para cada um, muito semelhante à realizada nas aulas da cadeira de Farmácia Galénica. Esta é preenchida com o material e quantias utilizadas, método de fabrico, sendo posteriormente usados cálculos para determinar o valor final a pagar pelo doente.

Apesar de ser feito esporadicamente, é interessante visitar este método de preparação medicamentosa, e é importante não o deixar perder-se no tempo, pois não só contribui para a tradição da profissão, como também permite a criação de uma medicação específica para um doente que não a consiga obter noutro lado.

Serviços e Atendimento

Passado algumas semanas, finalmente comecei a realizar o atendimento ao público, o qual fui melhorando ao longo do tempo.

Nesse sentido, uma das características da farmácia que auxiliaram nesse aspeto foi a alta taxa de fidelização de utentes, o qual permite, com atendimentos repetidos, criar confiança e uma maior intimidade e à-vontade na resolução dos problemas e patologias apresentados ao balcão.

E como alguns dos utentes também frequentam com alguma frequência os serviços da farmácia, como medição de colesterol, glicémia e tensão arterial, é possível construir um histórico mental da medicação de cada um e compará-lo com os valores detetados para cada uma das medições.

Assim, podemos tentar verificar se existe alguma interação, sub ou sobredosagem medicamentosa que possa explicar alguns valores erróneos adquiridos, e sugerir, se necessário, uma intervenção com o médico para alterar a medicação.

2.2 Pontos Fracos

DCI e nomes comerciais

Ao longo do curso, somos imbuídos com uma extensa quantidade de nomes de substâncias ativas presentes nos medicamentos. Deste modo, sentimo-nos preparados o

suficiente para abordar as questões que nos são colocadas quando estas se referem à Denominação Comum Internacional, ou DCI.

No entanto, muitas vezes é o nome comercial do medicamento que prevalece, tanto nalgumas receitas como na mente de muitos utentes, pelo que uma grande dificuldade que apresentei foi na ligação entre estas substâncias ativas e os seus nomes comerciais, os quais raramente são referidos no curso.

Apesar de, com o tempo e a prática, esta questão se atenuar, não deixa de ser difícil conectar inúmeros nomes que nunca antes ouvimos às suas devidas substâncias, além de consumir algum tempo no atendimento, devido à hesitação e desconhecimento inicial.

Desvalorização no atendimento

Com o avançar do tempo, a minha confiança no atendimento foi aumentando, sentindo-me capaz de abordar casos mais complexos e exigentes.

No entanto, devido a ser apenas um estagiário, muitos dos meus aconselhamentos eram simplesmente ignorados ou colocados de parte, quando abordava certas pessoas que desconfiavam das minhas capacidades.

Apesar de essa posição ser compreensível, não deixa de me retirar confiança para futuros atendimentos. Não obstante, em casos seletivos, fui capaz de, com repetidos atendimentos de sucesso, convencer algumas pessoas a mudar de opinião, o qual abordo como uma conclusão positiva.

2.3 Oportunidades

Formações

Ao longo do período de estágio na farmácia, foi possível experienciar diversas formações ligadas à introdução de novos medicamentos no mercado, ou à explicação de medicamentos já introduzidos e comercializados. Estas foram realizadas por delegados ligados às empresas detentoras dos produtos em destaque.

A título de exemplo, algumas das formações que assisti dirigiram-se a uma gama de produtos antiparasitários para animais, outras para fármacos com combinações de paracetamol e ibuprofeno, e outras para produtos venotrópicos.

Essas formações, além de servirem para publicitar o fármaco, complementaram o que já tinha sido adquirido durante as aulas, relembrando conceitos e substâncias que porventura podiam estar mais esquecidos. Além disso, foram uma grande oportunidade para colocar

questões, discutir fármacos e substâncias novas e promover um debate saudável entre profissionais da área.

Aconselhamento com OTCs

Medicamentos sujeitos a receita médica não podem ser dispensados livremente pelos farmacêuticos aos utentes, por isso o único espectro medicamentoso onde este profissional o pode fazer, de modo a tentar auxiliar nas patologias apresentadas, é nos medicamentos não sujeitos a receita médica, ou “*Over The Counter*” (OTCs). Isto, obviamente, apenas em patologias ligeiras e com gravidade leve.

Desse modo, ter uma vasta gama de OTCs nas prateleiras da farmácia permite não só apresentar maior variedade ao doente, como também para o farmacêutico, ajudando-o a escolher a melhor opção para aquele doente em específico.

Com os 5 anos do curso, senti-me preparado para abordar a maioria das situações que requeriam este aconselhamento, verificando a adequação medicamentosa, interações com outros fármacos ou patologias, ou até mesmo quando a escolha mais acertada é, não um medicamento, mas uma consulta médica.

2.4 Ameaças

Ponto de venda de MNSRM

Como referido anteriormente, os medicamentos OTCs ou não sujeitos a receita médica são uma importante ferramenta no arsenal do farmacêutico. Estes permitem-no encontrar medicação apropriada ao utente, dentro dos parâmetros legais, para patologias autolimitadas e de gravidade leve, sendo que este dispõe de conhecimentos e experiência para os aconselhar devidamente.

No entanto, hoje em dia há um alastramento cada vez maior dos pontos de venda de medicamentos não sujeitos a receita, com preços concorrenciais aos da farmácia, mas muitas vezes sem profissionais com a formação devida para os aconselhar.

Deste modo, geram-se dois problemas graves para este setor: o primeiro é o da concorrência comercial dos pontos, que pode levar a uma preferência por parte do utente. No entanto, mais grave é o utente não ser aconselhado da melhor forma sobre o seu uso, algo que não aconteceria se frequentasse a farmácia.

Assim, ao encontrar um desses pontos perto da farmácia onde ocorreu o estágio, não pude deixar de pensar nestas consequências. Não só isso, mas também experienciei doentes

a procurar aconselhamento na farmácia, mas a ir comprar o fármaco no outro local, o que também não ajuda a melhorar esta situação.

Lacunas Formativas

Os 5 anos de curso na faculdade de farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) são bastante completos no que diz respeito à diversidade e completude de conhecimento farmacêutico.

No entanto, talvez devido à verdadeira enormidade que é este setor, é impossível obter e consolidar conhecimentos sobre todas as áreas em que a farmácia comunitária toca, no período de tempo de formação académica.

Desse modo, há várias áreas que julgo merecerem uma maior abordagem, pois senti que não estava à altura, na sua dispensa e aconselhamento.

Entre estas enumero a cosmética, a veterinária e a saúde ocular, pois apesar das primeiras terem cadeiras especialmente dedicadas a si, sinto que não foram suficientes para me sentir confortável, aquando o atendimento.

No entanto, tanto a experiência como as formações e os ensinamentos transmitidos pelos colegas permitiram melhorar esse sentimento de incerteza e desconhecimento parcial.

3. Conclusão

O finalizar do período de estágio na Farmácia Rocha fez-me perceber que a função do farmacêutico na sociedade é mais importante do que muitas pessoas levam a acreditar.

Apesar de já ter experienciado o setor industrial da área farmacêutica, e sentir que é importante à sua maneira, é o contacto direto com o público que torna a farmácia comunitária essencial para qualquer pessoa que a frequente.

A dispensa, aconselhamento, entreatajuda ou a simples transmissão de informação podem mudar e melhorar a vida de qualquer pessoa que assim o necessite. Esta aproximação ao público traz mais responsabilidade, mas também mais alegria em saber que o que fazemos faz a diferença.

Com este estágio lembrei e integrei conhecimentos, tanto de colegas como curriculares, fomentei a memória e aproveitei todas as experiências para melhorar profissionalmente.

Assim, concluo o estágio a perceber que ser farmacêutico é uma profissão exigente, mas rica e vasta, e que qualquer área que siga o objetivo permanecerá o da ajuda, direta ou indireta, ao doente.

4. Casos Práticos

Caso Prático 1 – Um senhor entra na farmácia com a pele da face, bem como a zona da testa, bastante vermelha, com alguma descamação e queixando-se de ter muito prurido, principalmente com a exposição solar, e à noite.

O quadro era bastante sugestivo de dermatite atópica, pelo que a primeira questão que apresentei foi se já estaria diagnosticado com essa patologia, ao que o senhor me respondeu afirmativamente. De seguida, perguntei o que costumava colocar nas lesões, ao que me mostrou um creme hidratante, pouco específico para a patologia em questão.

Continuando a queixar-se do prurido, percebi que era essa a sua principal preocupação, pelo que procurei um creme indicado para o aliviar, apresentando-lhe um creme da marca Barral[®], com função antiprurido¹.

De modo a acalmar a inflamação, pensei numa recomendação de hidrocortisona de venda livre. No entanto, ao consultar o protocolo de dispensa² deste tipo de medicamentos, apercebi-me de que lesões com zonas muito extensas, e localizadas no rosto requerem referência para consulta médica. Deste modo, recomendei-lhe consultar um médico, além de lhe fornecer alguns conselhos acerca da patologia em questão.

Estes incluíram bastante hidratação, evitar stress, exposição solar ou maior sudorese na zona afetada, evitar banhos muito quentes, ou esfregar demasiado com a toalha, de modo a não agravar as lesões, evitar coçar e preferir roupas de algodão.

Caso Prático 2 – Uma senhora dirige-se ao balcão da farmácia para pedir um Cêgripe^{®3} de forma a aliviar os sintomas gripais que sente, como dor de cabeça e cansaço. Quando questionada se já tomou algo, indica a toma de Brufen 400mg^{®4}, mas sem resolução sintomatológica.

Questionando-me sobre o Cêgripe^{®3}, composto por paracetamol e clorfenamina, perguntei se sofria de alguma patologia como hipertensão ou asma, devido à possível interferência do anti-histamínico na sua composição, ao que a senhora me responde afirmativamente quanto à asma. Descartei imediatamente este medicamento, aconselhando-a também a deixar de tomar o Brufen 400mg^{®4}, pois provoca broncoconstrição, e indiquei-lhe que pode agravar a dor de cabeça, devido à menor oxigenação cerebral.

Sobre isso, a senhora indicou que o começou a tomar devido à dor de cabeça, e que foi piorando ao longo do tempo. Além disso, mencionou não utilizar a bomba há algum tempo.

Pela conversa, percebi que a sintomatologia poderá ter surgido devido à falta de utilização da bomba, decorrente de uma possível crise. Desse modo, aconselhei a sua utilização

correta, bem como os riscos decorrentes de uma falta de adesão, e dispensei um Ben-U-Ron 500mg^{®5}, de forma a aliviar a dor de cabeça.

Caso Prático 3 – Uma senhora entra na farmácia a necessitar de algo para aliviar a febre do filho, uma criança de 11kg. Depois de verificar que a febre não se prolongava à mais de 3 dias, sugeri a toma de um xarope de paracetamol, o Ben-U-Ron 40mg/ml^{®6}.

De modo a ajustar a toma ao peso da criança, realizei os cálculos tendo por base a concentração do xarope (40mg/ml) e a concentração da dose individual para toma de 8 em 8 horas (20mg/kg).

Sendo que 20mg equivalem a 1kg, 11kg necessitariam de 220mg do fármaco, no esquema de dosagem referido. Assim, sendo que o xarope possui uma concentração de 40mg por 1ml, 220mg será equivalente a 5,5ml de xarope.

Dessa forma, deverá ser essa a dose administrada a cada 8 horas, até melhoria dos sintomas. Se tal não acontecesse em 3 dias, aconselhei à consulta com um médico.

Caso Prático 4 – Um senhor dirige-se à farmácia queixando-se de uma gripe, procurando algo para a melhorar, e quando questionado responde com sintomatologia de diarreia à um dia e dores musculares.

Devido a estar presente também uma receita sua, bem como o seu histórico de medicação, consegui perceber que tomava uma estatina, Sinvastatina Stada 40mg^{®7}, ao mesmo tempo que um fibrato, e que o seu início de toma coincidia com o início das dores musculares. Desta forma, coloquei a hipótese de poder ser devido à atuação destes fármacos, como suportado pelo RCM da estatina.

Além disso, verifiquei que adquiriu um antibiótico uns dias antes, pelo que a diarreia poderia ser proveniente disso.

Assim, não sendo provável a existência da gripe, recomendei um ajuste de medicação com o médico para evitar as dores musculares, e aconselhei Prolif^{®8}, um probiótico indicado para tratar a diarreia aguda, e bastante hidratação para repor as perdas pela diarreia.

Caso Prático 5 – Um senhor aproxima-se da farmácia argumentando que precisava de Dulcolax^{®9} para a evacuação do intestino. Como ele já tinha levado uma caixa há algumas semanas atrás, questionei se ainda necessitaria de outra, e avisei-o de antemão dos perigos da habituação do intestino à atuação de laxantes de contacto, como o bisacodilo presente no fármaco.

Acerca disto, ele responde que às vezes necessita mesmo de tomar, mas mesmo assim lhe custa, devido a apresentar hemorroidas. Com essa informação, decidi apresentar-lhe uma opção mais apropriada à sua condição, um laxante osmótico.

Aconselhei-lhe o Laevolac^{® 10}, explicando-lhe que a sua atividade osmótica permite uma menor irritação intestinal, bem como habituação nula e melhor tolerabilidade pelas hemorroidas, e que apesar do seu início de ação lento, pode ser tomado por mais tempo do que o medicamento anterior.

Para auxílio das hemorroidas, indiquei-lhe Faktu^{® 11}, uma pomada de aplicação retal após defecação contendo um agente hemostático local, que coagula o tecido necrótico e contrai os vasos sanguíneos de forma a controlar as hemorroidas.

Além disso, referi-lhe várias ações para melhorar o fluxo intestinal, como maior hidratação, o estabelecimento de um horário de defecação, melhorar a dieta com fibras e praticar exercício físico frequentemente.

Alguns dias depois, noutra visita à farmácia, o senhor relatou melhorias nessa condição e agradeceu os aconselhamentos.

5. Referências Bibliográficas

- ¹ BARRAL. (2020). **Creme anti-prurido**. [Consultation date may 30th 2023]. Available from: <https://www.barral.pt/product/creme-anti-prurido/>
- ² INFARMED. (2015). **Hidrocortisona – Protocolo de Dispensa Exclusiva em Farmácia**. [Consultation date may 30th 2023]. Available from: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2106346/Protocolo+de+Dispensa+Exclusiva+em+Farm%C3%A1cia+%28EF%29+Hidrocortisona/8f8e743a-db37-421f-9de8-049f389e848e?version=1.1>
- ³ INFARMED. (2023). **Cêgripe – RCM**. [Consultation date june 5th 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- ⁴ INFARMED. (2023). **Brufen 400mg – RCM**. [Consultation date june 5th 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- ⁵ INFARMED. (2020). **Ben-U-Ron 500mg comprimidos – RCM**. [Consultation date june 5th 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- ⁶ INFARMED. (2020). **Ben-U-Ron 40mg/ml xarope – RCM**. [Consultation date june 25th 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- ⁷ INFARMED. (2021). **Sinvastatina Stada 40mg – RCM**. [Consultation date july 10th 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- ⁸ INFARMED. (2021). **Prolif – RCM**. [Consultation date 10th july 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- ⁹ INFARMED. (2014). **Dulcolax – RCM**. [Consultation date 23th july 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- ¹⁰ INFARMED. (2013). **Laevolac – RCM**. [Consultation date 23th july 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- ¹¹ INFARMED. (2013). **Faktu – RCM**. [Consultation date 23th july 2023]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

PARTE III

MONOGRAFIA

“Mecanismos de evasão bacteriana ao sistema imune”

Monografia orientada pela Professora Doutora Sara Domingues

ABREVIATURAS

AMPs – Péptidos antimicrobianos

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintetase indutível

LAM – Lipocerabinomanano

LLO – Listeriolisina O

LPS – Lipopolissacárido

NF-kB – Fator nuclear kB

NO – Óxido nítrico

PtpA – Tirosina fosfatase

SpA – Proteína estafilocócica A

TLR – *Toll-Like Receptor*

TNF – Fator de necrose tumoral

RESUMO

O sistema imunitário humano é extremamente complexo, capaz de abordar muitas ameaças que o coloquem em risco. No entanto, seres como as bactérias evoluíram paralelamente a este, adaptando-se para melhor o ludibriar e evadir, de forma a garantir a sua própria sobrevivência.

Este tema está presente em grande destaque no atual surgimento indesejável de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos, predominantemente em meios hospitalares, que adquirem mutações e genes de resistência, evoluindo e modificando o seu comportamento e vulnerabilidade.

Métodos como a variação antigénica ou a inibição apoptótica podem superar as defesas do organismo, e originar diversas patologias. Dessa forma, para sabermos como os combater, é necessário conhecê-los.

É nesse contexto que esta pesquisa procura resumir, dentro da complexidade do tema, alguns métodos mais comuns de evasão bacteriana ao sistema imune.

Palavras-chave: Sistema Imunitário; Evasão Imunitária; Bactérias.

ABSTRACT

The human immune system is extremely complex, capable of dealing with multiple threats that put it at risk. However, organisms like bacteria evolved along with it, adapting to better deceive and evade it, guaranteeing their survival.

This topic is greatly discussed in today's emergence of antibiotic resistant bacteria, predominantly in hospital environments, which acquire mutations and resistance genes, evolving and modifying their behaviour and vulnerability.

Methods like antigenic variation or apoptotic inhibition can overcome the body's defences, leading to diverse diseases. In that regard, it is necessary to know them in order to fight them.

In that context, this research intends to compile, within the topic's complexity, some of the most common immune system bacterial evasion methods.

Keywords: immune system; immune evasion; bacteria.

INTRODUÇÃO

As bactérias convivem com o organismo humano desde o início da sua existência, pelo que é previsível terem desenvolvido métodos para escapar ao seu alcance imunitário, de modo a prolongarem a sua sobrevivência e hipóteses de multiplicação.

Apesar do sistema imune humano ser bastante adaptável e capaz de lidar com ameaças provenientes de múltiplos seres invasores, não é infalível, e estes seres podem aproveitar-se de algumas falhas existentes para permanecerem ilesos. Alternativamente, podem até criar oportunidades para escape, ou para usarem o sistema imune contra si mesmo.

Além disso, mesmo as bactérias comensais ao organismo humano usam estas estratégias.

Estes mecanismos de evasão caracterizam-se pela sua complexidade, envolvendo mecanismos moleculares diversos, e pela sua vastidão, pois apesar de alguns serem comuns a muitas bactérias, outros são mais específicos, atuando contra defesas específicas do organismo, como certas células ou vias celulares.

Desta forma, serão analisados apenas alguns dos mecanismos de evasão imunitária mais comuns, usados pelas bactérias para garantir a sua sobrevivência, colocando-os em perspetiva usando exemplos bacterianos associados.

I. Sistema Imunitário

O sistema imune é dos sistemas mais complexos que conhecemos, ainda mais do que o cérebro humano. Está reunido sobre diversos órgãos, e é mediado por células e movimentos celulares e proteicos altamente especializados, tendo como objetivo final a proteção do organismo humano de ameaças externas, como vírus e bactérias, assim como de internas, como tumores e desenvolvimentos celulares descontrolados.

Como órgão primário para a defesa do organismo, temos o maior órgão do corpo, a pele. Esta, combinada com as barreiras mucosas, atua como o primeiro impedimento à penetração de seres invasores, pois não só funcionam como barreiras físicas, como contêm certos componentes que potenciam esse efeito. Substâncias como o muco, existente nas mucosas, permitem fixar os agentes patogénicos, possibilitando a sua remoção por mecanismos fisiológicos, como o espirro ou a tosse, ou por neutralização pelas células do sistema imune¹.

Por sua vez, o microbioma normal do nosso corpo, existente em toda a extensão do nosso organismo, desde o intestino até à pele, também atua como mecanismo de defesa natural. Este produz substâncias antimicrobianas que impedem a progressão dos invasores¹.

Além disso, também impede a colonização do local por competir diretamente com os agentes patogénicos por nutrientes e espaço.

Além disso, estas substâncias antimicrobianas existem naturalmente pelo corpo, sob a forma de enzimas, que, não só inativam os microrganismos, como os fixam, para posterior atuação das células do sistema imune, que patrulham as mucosas², sendo ativadas mediante um contacto com o ser estranho.

Todas estas características, incluindo zonas com particularidades específicas, como pH muito baixo no estômago, ou a existência de cílios nas vias respiratórias, ajudam a fortalecer estas barreiras primárias¹.

No entanto, se houver, de facto, entrada do ser no organismo humano, a via celular do sistema imune terá de atuar. Estas células, como linfócitos e macrófagos, são produzidas em órgãos específicos do corpo humano³.

Estes estão divididos em duas categorias: os órgãos linfáticos primários e secundários¹. Os primeiros incluem a medula óssea e o timo, sendo na medula que se forma a maioria das células do sistema imune, e no timo que ocorre a maturação de um tipo específico de célula, os linfócitos T³⁻⁴.

Como órgãos secundários, cujo objetivo é auxiliar e fornecer zonas de atuação das células do sistema imune, encontramos o sistema e nódulos linfáticos, o baço e as amígdalas¹.

O sistema linfático funciona como uma rede complexa e interligada de vasos, espalhada por vários tecidos e órgãos. Este, não só ajuda a manter um equilíbrio de fluidos nos tecidos, como mantém um canal de comunicação entre esses e os vasos sanguíneos, permitindo um contacto entre células linfáticas, pertencentes ao sistema imune, e seres invasores que porventura estejam nos tecidos⁵. Deste modo, podemos considerar que o sistema linfático permite aumentar a probabilidade de contacto entre sistema imune e microrganismos, contribuindo para a atuação imune.

Ao viajarem pela rede linfática, as células do sistema imune atingem os nódulos linfáticos, que atuam como centrais de comunicação e filtração. Não só filtram o fluido linfático, como potenciam o contacto entre células do sistema imune, já presentes no nódulo, e potenciais agentes patogénicos, sob a forma de antígenos, pequenas moléculas características de cada microrganismo⁶.

Tal como descrito para os vasos linfáticos, isto permite redobrar a atuação do sistema imune, por, essencialmente, trazer amostras dos agentes patogénicos às células que os combatem, evitando o que necessitaria de uma elevada deslocação destas células, livrando o organismo de um esforço desnecessário⁶.

O baço tem como função, entre outras, armazenar alguns tipos de células do sistema imune, que podem atuar como um filtro de microrganismos presentes na circulação sanguínea. Estes, inevitavelmente, irão passar neste órgão, onde podem ser fagocitados por células especializadas. Além disso, também neste local são produzidos anticorpos, por linfócitos B, através da interação com células apresentadoras de antígenos⁷.

As amígdalas funcionam essencialmente como um reservatório de células do sistema imune, que, devido à sua localização, na garganta e palato, conseguem atuar preventivamente, impedindo o acesso de microrganismos que tentem entrar pela via respiratória e gastrointestinal⁸.

Para concluir, e apesar de todos serem importantes e úteis à sua maneira, todos estes órgãos referidos partilham uma função em comum: a de atuarem como palco para os verdadeiros atores do sistema imune, as células. Células estas que possuem diversas especializações, consoante o ramo onde procuram atuar.

Os ramos principais, que permitem subdividir, de forma geral, as células, são o sistema imune inato e o adaptativo. O primeiro prende-se com uma ação rápida e pouco específica, focada em neutralizar o atacante, no início da sua atuação⁹. Esta rapidez vem com o custo de não permitir especialização contra certos alvos, nem memorização, para um combate futuro, se surgir necessidade.

No geral, esta categoria do sistema imune consegue facilmente reconhecer perigos de ordem global, como vírus, bactérias, fungos ou células em crescimento descontrolado. No entanto, não consegue distinguir entre estirpes, de bactérias ou vírus, impedindo-o de agir contra ameaças específicas¹⁰. Alguns exemplos de células dentro desta classe incluem neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e monócitos.

No outro lado do espetro, o sistema imune adaptativo consegue ser extremamente eficaz e específico, além de ter a capacidade de guardar memória dos microrganismos combatidos, para referência futura¹⁰. No entanto, possui o revés de demorar algum tempo a atuar, sendo apenas ativado pelo sistema imune inato, quando este não é capaz de dominar a ameaça sozinho⁴. Esta categoria de sistema imune tem como exemplos de células os linfócitos B e T.

Os primeiros são conhecidos como as células produtoras de anticorpos, pois, quando interagem com antígenos para os quais têm afinidade, são capazes de produzir anticorpos em massa⁴, que atuam como uma rede de proteínas, que tanto neutralizam os alvos, como os rendem passíveis de ser eliminados pelas células do sistema imune¹¹.

Os anticorpos também são capazes de ativar o sistema do complemento, um conjunto de proteínas circulantes no sangue e no plasma, que, quando ativadas, desencadeiam uma

reação em cascata. Esta reação não só ativa mais proteínas do sistema do complemento, como danifica membranas celulares, e atrai células do sistema imune para o local, como macrófagos e neutrófilos, além de ativar mastócitos¹².

As outras células do sistema imune adaptativo são os linfócitos T, que atuam como comandantes no campo de batalha, ora orientando e ativando as outras células através do uso de citocinas, pequenas moléculas químicas, ora eliminando diretamente invasores, como células infectadas com vírus, ou tumorais⁴.

Depois desta curta introdução ao, infinitamente mais complexo, sistema imune, poderemos prosseguir para o tema em foco, os mecanismos mais usuais de evasão ao sistema imune, por parte das bactérias.

Apesar da introdução não ser específica, nem contemplar fatores igualmente importantes para o sistema imune, estes serão especificados e aprofundados, quando o tema principal assim o necessitar.

2. Evasão do Sistema Imune

Antes de aprofundar sobre o tema em questão, queria apenas deixar claro que a temática da evasão do sistema imune não é algo simples ou direto. Tal como o sistema imune em si é extremamente complexo, sendo impossível compreender na sua totalidade, também a sua evasão deve ser, necessariamente, complexa.

Aliada à sua complexidade, não é possível, no espaço deste trabalho, realizar um aprofundamento tão denso como o tema merecia. Deste modo, é possível que possa falhar a apresentá-lo corretamente, no âmbito da presente monografia.

Sendo assim, e para iniciar a temática principal, podemos perguntar-nos como é que algo tão intrincado e preparado para qualquer ocorrência, como seja o sistema imune, consegue ser ludibriado e evadido.

Para entender essa questão, devemos olhar para o que se entende por evasão do sistema imune.

Podemos indicar que a evasão ao sistema imune é qualquer ação efetuada por parte do agente invasor, seja uma bactéria, um vírus, um tumor, ou qualquer outro organismo, que lhe permita escapar ou subverter a capacidade imunitária do hospedeiro, ficando o invasor livre para se replicar, ou até para se transmitir a um novo organismo, causando posteriormente doença aguda ou grave¹³.

Estas táticas variam enormemente, em diversidade e complexidade, mas todas se aproveitam de alguma fraqueza ou incapacidade do organismo hospedeiro. Essa é a forma

como os diferentes organismos invasores são capazes de montar um ataque contra uma defesa que se julga, erradamente, infalível, pois até mesmo os processos mais complexos, como o sistema imune, possuem erros ou deficiências na sua construção.

Apesar disso, podemos, certamente, aprender com elas, de modo a reconhecer as falhas no nosso próprio sistema imune, sendo isso um passo decisivo para o fortalecer, prevenindo futuras recorrências.

Estes mecanismos para evitar ou subverter o sistema imune surgem, muitas vezes, como resultado da evolução natural, à qual estão sujeitos todos os seres vivos¹³. Apesar do organismo humano apresentar defesas sofisticadas contra invasores, alguns destes conseguiram efetivamente evoluir, apresentando manobras que derrubam e inibem o sistema imune inato ou adaptativo¹⁴.

Apesar disso, as consequências podem ser graves, se o organismo não conseguir responder adequadamente, ou superficiais, apenas atrasando ligeiramente a resposta do sistema imune.

Esta evolução dos seres invasores, nomeadamente por parte das bactérias, sendo o foco desta monografia, existe devido à sua longa convivência com o ser humano¹⁵. Após milhares de anos a partilhar o mesmo ambiente, não é difícil suspeitar que estes seres possam ter evoluído de forma a conseguirem sobreviver à nossa presença.

A título de exemplo, foi encontrada evidência da existência de *Mycobacterium tuberculosis* em restos mortais com 9000 anos¹⁵, e também de *Helicobacter pylori* numa múmia pré-histórica, com 5300 anos¹⁷, provando que estes seres nos acompanham à tempo suficiente para sofrerem mutações e evoluções que lhes permitam melhor adaptar-se ao nosso organismo.

Os mecanismos usados pelas bactérias para evadir o sistema imunitário são imensos e multifacetados, e cada bactéria é específica na sua abordagem, apesar de se sustentarem em bases comuns¹⁴ (Figura 1). Apesar disso, não há um mecanismo que funcione garantidamente, pois, além da bactéria ser uma variável importante, também o organismo humano, e a forma como ele apresenta a sua defesa, o é.

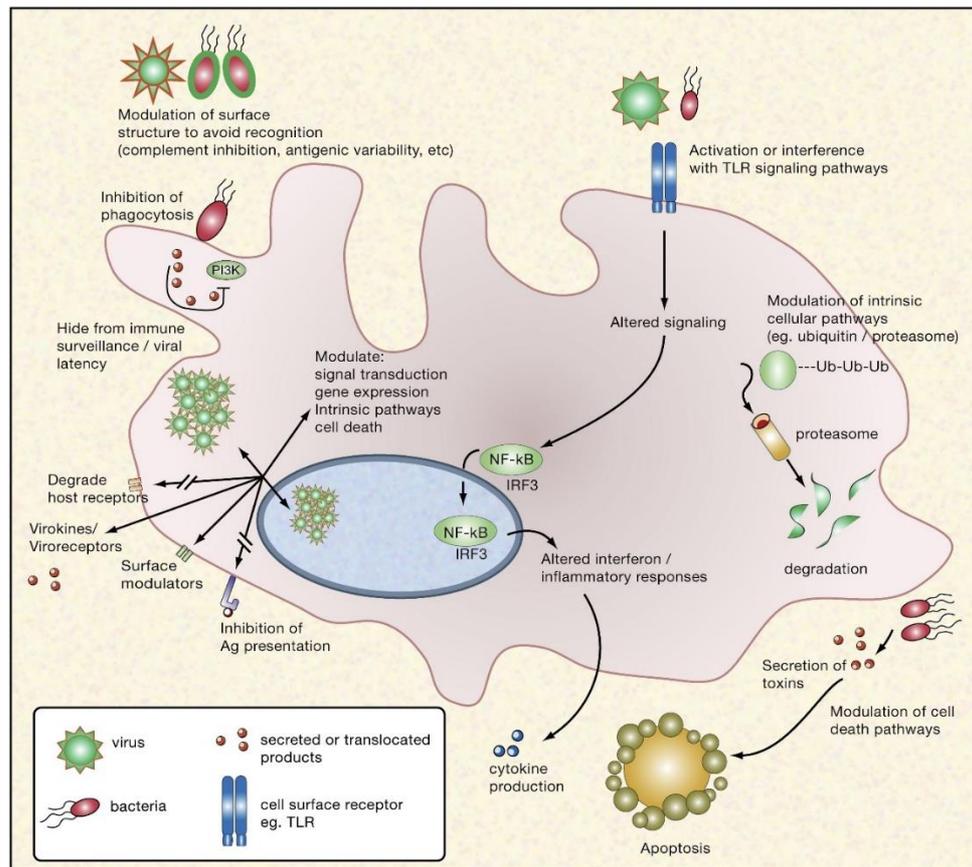


Figura 1 – Visão geral sobre diversos mecanismos bacterianos e virais de evasão imunitária. (Retirado)¹⁴

Nenhum mecanismo é capaz de penetrar, com certeza definitiva, a defesa humana, pois todas as defesas são diferentes, provenientes da genética, da constituição e do ambiente diferente que cada um possui¹⁶.

Quanto aos mecanismos em si, estes podem ser discretos, focando-se em evitar a detecção por parte do sistema imune, como através da mudança antigénica da sua parede/cápsula celular, ou confrontativos, preferindo atacar diretamente as defesas do organismo, como, por exemplo, através do uso de proteínas efetoras¹⁵. O mais usual, no entanto, é uma combinação de ambos, consoante a situação em que a bactéria se encontra.

2.1 Variação Antigénica

Para começar com os mecanismos mais usuais, poderemos inferir que a variação antigénica da parede celular é, certamente, dos mais comuns. Ocorrendo em múltiplos seres, desde vírus a bactérias, a variação antigénica permite camuflar o ser, escapando a detecção do sistema imune, e até permite inutilizar as armas que o organismo usa contra ele, pois estas seriam específicas para um determinado tipo de antígeno, que não é expresso pelo ser invasor¹³.

Para clarificar, um antigénio é algo capaz de estimular uma resposta imune, pertencendo ao próprio organismo ou a um corpo estranho, e podendo ser proteínas, ácidos nucleicos, polissacáridos ou lípidos¹⁸. Além disso, também funciona como um recetor, no qual, se um elemento do sistema imune se ligar, com a devida afinidade, pode potenciar uma resposta imune, como referido.

Com a mudança antigénica, esta resposta imune fica comprometida, pois o antigénio que anteriormente provocaria uma resposta pode já não o fazer, devido à perda de afinidade, com a mudança estrutural do antigénio¹³.

Assim, os mecanismos imunes tornam-se menos eficazes, pois há uma menor probabilidade de haver um contacto com sucesso, seja de células do sistema imune, como linfócitos, ou de proteínas, como anticorpos. Cada um destes possui recetores específicos na sua superfície que reconheceriam o antigénio e iniciariam a resposta imune, através do contacto entre antigénio e recetor, mas com a variação antigénica este passo é dificultado, requerendo a criação de novos recetores específicos para aquele antigénio¹³.

Como exemplo, temos o caso de *Streptococcus pneumoniae*, que possui vários serotipos diferentes, os quais se distinguem apenas por terem uma estrutura diferente, em relação à sua cápsula polissacárida¹⁹. Essencialmente, isto significa que os antigénios de superfície que os serotipos possuem são diversos entre si, pois a estrutura geral da cápsula é diferente. Isto leva a que uma infeção com um determinado serotipo de *S. pneumoniae*, sendo resolvida com sucesso, não impeça que possa haver reinfeção pela mesma espécie bacteriana no futuro (Figura 2). Apesar da imunidade adaptativa guardar linfócitos de memória que ajudarão a combater rapidamente uma infeção futura, esse combate apenas será eficaz contra o determinado serotipo presente na infeção anterior¹³.

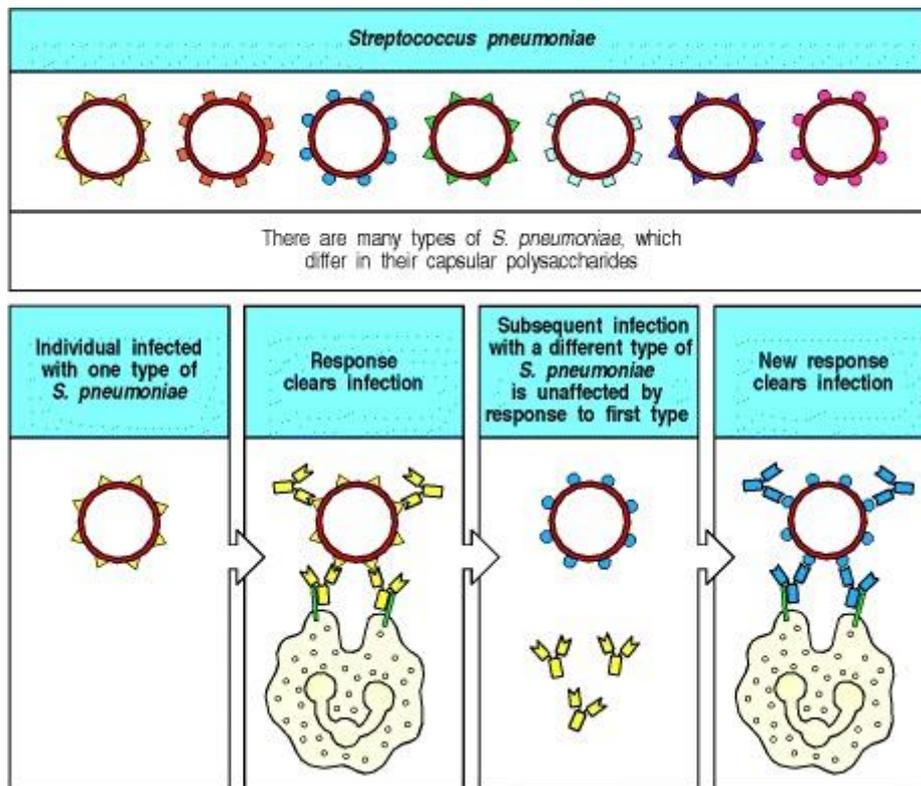


Figura 2 – Esquema representativo da variação antigénica de *Streptococcus pneumoniae*. (Retirado)¹³

Se, pelo contrário, surgir infeção por um novo serotipo, todas as defesas construídas previamente serão inúteis, sendo o organismo obrigado a combater a mesma bactéria como sendo um ser invasor distinto, explicando as múltiplas reinfeções que podem ocorrer pela mesma espécie¹³.

2.2 Alteração da Carga de Superfície

Outro exemplo de modificação da superfície bacteriana é o da alteração da carga da parede celular de negativa para positiva, em organismos de Gram-negativo²⁰. Alguns microrganismos, como *Escherichia coli* ou *Salmonella enterica*, são capazes de mudar a carga da sua membrana, de forma a conseguirem repelir anticorpos e péptidos antimicrobianos, designados por AMPs²¹, produzidos por células do sistema imune¹⁵.

Estas substâncias, produzidas para combater as ameaças microbianas, provocando uma disrupção da parede celular, são assim inutilizadas, pois devido a apresentarem carga positiva são repelidas electrostaticamente em contacto com membranas com a mesma carga²⁰.

Estas bactérias de Gram-negativo conseguem, então, mudar a estrutura da sua parede celular através de modificações, com moléculas catiónicas, no lipopolissacárido, ou LPS, presente na membrana. Mais especificamente, eles alteram um constituinte do LPS, o lípido A,

adicionando-lhe grupos palmitoil, fosfoetanolaminas ou 4-amino-4-deoxy-L-arabinoses, para mascarar a carga negativa desse constituinte²⁰.

No entanto, não são apenas as bactérias de Gram-negativo que possuem esta capacidade. Algumas bactérias de Gram-positivo, como *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes*, são igualmente capazes de modificar a sua parede celular para reduzir a incidência de carga negativa, tornando-se assim mais capazes de repelir os AMPs emitidos pelas células do sistema imunitário²⁰. Estas conseguem-no fazer com uma alteração nos ácidos teicóicos, presentes na parede celular. Ao incorporarem ésteres de D-alanil na parede celular, ligando-os ao referido constituinte, ocorre uma exposição de um grupo amina com carga positiva. Esta ação reduz a carga negativa da parede, e diminui a atração electrostática que haveria entre os AMPs e a parede celular, permitindo à bactéria proliferar e sobreviver²⁰.

Além desta modificação antigénica, existem outras táticas relativas à membrana exterior das células que lhes permitem obter uma maior vantagem em relação ao organismo hospedeiro.

2.3 Camuflagem Estrutural

O uso de constituintes, na membrana exterior, estruturalmente semelhantes aos encontrados pelo organismo humano pode funcionar eficazmente como um mecanismo de camuflagem, rendendo o ser invasor invisível, até certo ponto, às defesas do organismo.

Um exemplo poderá ser o de *E. coli*, que possui algumas estirpes cuja constituição contempla uma cápsula contendo polissacáridos com uma estrutura semelhante à encontrada em polissacáridos localizados em células de mamíferos²². Esta simples semelhança é crucial para evitar que o sistema imune o identifique como um ser invasor, levando a que ganhe tempo suficiente para proliferar e causar danos.

Não só *E. coli*, mas também *Neisseria meningitidis* possui estirpes capazes de evadir o sistema imune pelo mesmo mecanismo²². No entanto, além de possuir a referida cápsula, é adicionalmente capaz de impedir geneticamente a síntese da mesma, aquando da entrada e infeção de uma célula hospedeira¹⁵. Esta opção permite facilitar a entrada na célula, sendo *N. meningitidis* capaz de, posteriormente, reativar a síntese capsular, na saída, de forma a obter proteção e camuflagem contra o sistema imune¹⁵.

2.4 Proteínas Efetoras

Como referido anteriormente, não são apenas os mecanismos mais discretos e indiretos que são usados pelas bactérias. Apesar de estes também serem importantes e

comumente usados, as ações realizadas pelas bactérias para sobreviverem não se limitam a ser apenas defensivas.

Além disso, é bastante evidente que apenas ao conjugar várias táticas, defensivas e ofensivas, é que estes seres conseguem garantir alguma chance de resistir seja ao nosso organismo ou a outras ameaças externas, ou internas, como bacteriófagos¹⁵.

Desse modo, um dos mecanismos utilizados é o uso de proteínas efetoras, que funcionam como moduladores de certas atividades celulares, sendo produzidas pelas bactérias para atuarem em células do organismo hospedeiro²³.

Estas ferramentas permitem-lhes não só interferir com o sistema imune, se o ataque for dirigido a células pertencentes a essa categoria, bem como a outras, se a afinidade for devidamente adequada.

É importante ressaltar que estas proteínas efetoras não atuam como toxinas. Apesar de ambas exercerem a sua ação em seres ou células vivas, os seus mecanismos de entrega são diferentes²³. Ou seja, o efeito tóxico das toxinas pode ser observado mesmo quando são adicionadas externamente a um organismo ou grupo de células. Pelo contrário, a entrega das proteínas efetoras já depende de um contacto direto entre o alvo e uma maquinaria multiproteica especializada²³.

Além disso, as toxinas geralmente possuem uma única atividade responsável pelo dano celular, muitas vezes destrutivo e em grande escala, em termos celulares. As proteínas efetoras, no entanto, contrastam com uma atividade especializada e direcionada, modulando atividades celulares, muitas vezes atuando simultaneamente com outras proteínas efetoras, dirigidas à mesma célula²³.

Estas proteínas provêm de maquinarias proteicas especializadas, designadas como sistemas de secreção proteica, sendo que pelo menos três tipos foram categorizados e descritos: tipo III e tipo IV, encarregados da transferência proteica para células eucariotas, e tipo VI, capaz de transferir proteínas para outras bactérias²⁴.

Como referido, estas armas celulares possuem a capacidade de modular atividades que colocariam em perigo a bactéria, através da ligação das proteínas a locais com a devida afinidade. Um exemplo pode encontrar-se numa bactéria relativamente comum, comensal ao Homem, como sendo *Staphylococcus aureus*²⁵.

Apesar de poder ser encontrada frequentemente no microbioma da pele e tecidos nasais, esta bactéria é, invariavelmente, capaz de provocar infeções, por vezes gerando recorrências, mesmo com antibioterapia adequada. Este facto deve-se, em parte, ao seu uso de proteínas efetoras para bloquear a ação do sistema imune²⁵.

Mais especificamente, esta bactéria tem a capacidade de resistir aos ataques dos linfócitos B, produtores de anticorpos. Isto devido à produção duma proteína efetora, de nome proteína estafilocócica A, ou SpA, capaz de se ligar aos domínios Fab, ou domínio de ligação ao antigénio, e domínio Fc, que se ligaria a recetores celulares e a algumas proteínas do sistema do complemento²⁵.

Deste modo, ao contactar com os anticorpos, bloqueia a sua ação sobre o próprio *S. aureus*, pela ligação com o domínio Fab, impedindo a ligação com os antigénios da bactéria, e evitando uma subsequente neutralização ou fagocitose²⁵.

No entanto, a sua ação não termina por aí, pois, além disso, é capaz de se ligar aos linfócitos B, atuando como um superantigénio²⁶. Este termo é usado para caracterizar antigénios capazes de provocar respostas imunes exageradas, danosas para o organismo, em, por exemplo, linfócitos T e B²⁷.

Mais especificamente em linfócitos B, esta proteína efetora consegue ligar-se, através de interações de elevada afinidade, aos locais Fab dos anticorpos presentes na superfície das células B²⁶. Isto, por sua vez, prende os anticorpos à superfície, inutilizando-os, mas não impedindo uma proliferação dos linfócitos, acabando por resultar numa apoptose geral dessas mesmas células^{25,27}.

Assim, qualquer defesa que seja montada, por parte dos linfócitos B, é facilmente derrubada por esta bactéria, se as referidas proteínas efetoras apresentarem a devida afinidade para se ligarem aos recetores dos anticorpos.

2.5 Sobrevivência Intracelular

Até agora foram referidos métodos de resistência ao sistema imune através de evasão indireta, ou através do ataque com proteínas efetoras. No entanto, há vários outros mecanismos que envolvem diversas estratégias, mesmo com a existência de uma atuação imune normal induzida pelas próprias bactérias. Estes auxiliam a bactéria em ambientes que seriam considerados inóspitos e letais, numa situação normal.

Um exemplo bastante conhecido deste tipo de evasão é o da bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, cujos atributos lhe permitem não evadir, mas sim sobreviver à resposta imune²⁸.

Esta é caracterizada pelas suas infeções prolongadas, mas muitas vezes latentes, de tuberculose, devido à sua capacidade adaptada de sobreviver dentro do seu alvo preferencial, os macrófagos, mais especificamente os alveolares¹⁵.

Estes, ao detetarem a bactéria como um corpo estranho ao organismo, vão iniciar a resposta imune inata, que se assinala pela fagocitose dos invasores. Esta é caracterizada pela

internalização das bactérias, de forma a contê-las e destruí-las, havendo uma recolha de antígenos para uma posterior apresentação a outras células do sistema imune²⁹. A destruição é, por sua vez, realizada através da formação de fagossomas, que são vesículas especializadas na degradação celular²⁹.

Estes fagossomas, ao fundirem com outros componentes celulares, como os lisossomas, maturam e acidificam-se, formando fagolisossomas, os quais degradam os seus constituintes através da internalização de hidrolases lisossomais, enzimas envolvidas na degradação e destruição dos organismos fagocitados²⁹.

Como referi, *M. tuberculosis* é, efetivamente, interiorizado pelos macrófagos, mas não sofre degradação como muitas outras células invasoras, que seriam prontamente fagocitadas e destruídas.

2.5.1 Inibição da Maturação Fagossómica

M. tuberculosis apresenta algumas táticas que lhe permitem inutilizar a ação dos macrófagos, mais especificamente, na sua degradação através dos fagolisossomas. Estas incluem a inibição da maturação e da acidificação destas vesículas²⁸.

Relativamente à maturação, esta espécie bacteriana consegue produzir proteínas que baixam o pH, através da prevenção da acumulação de enzimas ATP e GTP do vacúolo celular, debilitando a maturação do lisossoma²⁸. É também capaz de induzir a produção de outra proteína, a coronina I, pelo macrófago, envolvida na inibição da formação das vesículas fagocíticas³⁰.

Ao haver uma maior expressão desta proteína, a formação dos lisossomas é inibida, sendo afetada a sua posterior integração com os fagossomas. Além disso, foi verificado que uma maior quantidade de coronina I está relacionada diretamente com uma atividade superior de *M. tuberculosis* dentro destas células do sistema imune²⁸.

Um outro método que possui para impedir uma maturação eficaz é a inibição da fusão do lisossoma com o fagossoma²⁸. Como referi antes, apenas ocorre a formação do fagolisossoma nas condições corretas, nomeadamente com a fusão das vesículas do lisossoma e do fagossoma, só assim formando uma vesícula fagocítica eficaz.

Esta bactéria é capaz de produzir um lípido específico, de nome lipoarabinomanano (LAM), que parece interferir e suprimir o processo de fusão das duas vesículas²⁸. Este lípido é capaz de se deslocar pela célula infetada e ocupar espaços endomembranares, além de conseguir também ter influência na transdução de sinal e na regulação de mudanças de

membrana, como na biogénese de organelos³¹. Isto pode explicar a sua capacidade em impedir uma fusão eficaz entre o lisossoma e o fagossoma.

Esta inibição vesicular permite à bactéria permanecer num ambiente livre de conteúdo lisossomal, que a degradaria, com condições para que consiga sobreviver e proliferar.

No entanto, *M. tuberculosis* possui outras técnicas que lhe permitem sobreviver de forma ainda mais eficaz, criando um verdadeiro nicho livre de destruição celular e de deteção pelo sistema imune.

Como referido, esta bactéria consegue inibir a acidificação dos fagolisossomas²⁸. Apesar de habitar num pH considerado ácido, rondando valores pelos 6,2, a bactéria não é capaz de sobreviver num ambiente demasiado ácido, como seria se houvesse uma atuação normal do processo fagocítico²⁸. Deste modo, ela usa alguns métodos para controlar o pH do meio em que se encontra.

Em primeiro lugar, *M. tuberculosis* muda a estrutura e composição da sua parede celular, a qual atua como barreira contra a mudança de pH²⁸.

Em segundo, secreta uma proteína, a tirosina fosfatase, ou PtpA, que possui afinidade para se ligar à subunidade H da ATPase vacuolar do macrófago^{32, 15}. Esta, em condições normais, estaria a bombear prótons para a vesícula fagocítica, através de um complexo proteico com várias subunidades, recorrendo à hidrólise do ATP³².

Esta ligação entre a proteína e a subunidade H provoca uma inativação desta maquinaria celular, que seria responsável pela acidificação do ambiente no qual a bactéria se encontra. Aliado a isto, a escassez de acidez não só facilita a sobrevivência da bactéria a curto prazo como impede uma maturação do lisossoma em fagolisossoma, obstruindo a reação imune e deixando a bactéria livre para proliferar, a longo prazo³².

Tudo isto resulta num aumento de patogenicidade de *M. tuberculosis*, pois é capaz de mais facilmente provocar doença num hospedeiro, como seja um macrófago, suscetível.

Apesar de todos os métodos praticados por esta bactéria, referidos anteriormente, serem suficientes para garantir a sua proliferação, não são os únicos a ser utilizados por esta.

2.5.2 Inibição da Apoptose

De forma a assegurar a sua sobrevivência, que está intrinsecamente ligada à sobrevivência da célula hospedeira, *M. tuberculosis* é capaz de inibir a apoptose do macrófago²⁸.

Como exemplo, há estirpes classificadas como mais fracas, ou menos virulentas, que induzem apoptose no macrófago hospedeiro. Dessa forma, a sua sobrevivência é reduzida, pois a apoptose reduz a sua viabilidade²⁸. Em contraste, há estirpes consideradas mais

virulentas, que não induzem a apoptose em grande quantidade, mantendo-se mais viáveis e seguras, comparativamente às estirpes anteriores.

Além disso, uma das propriedades inerentes à sobrevivência da bactéria por inibição da apoptose celular é a latência, que pode fazer com que a bactéria volte a ressurgir, proliferando, num momento de imunossupressão ou escassez imunológica³³.

M. tuberculosis consegue impedir a apoptose pelos dois meios pela qual ela ocorre: pela via intrínseca e pela via extrínseca³⁴. Apesar de serem duas vias distintas, ambas convergem na ativação das Caspases – 3, 6 e 7, que se caracterizam por serem proteases envolvidas nos processos de morte celular³⁴.

A via intrínseca envolve a ativação da Caspase – 9, como resultado de stress intracelular detetado pela mitocôndria. A via extrínseca está relacionada com a ativação de recetores extracelulares como o recetor CD95 ou o Fator de Necrose Tumoral (TNF) - alfa I, que ativam posteriormente a Caspase – 8 e 10³⁴.

Este primeiro recetor, o CD95, pertencente ao subgrupo de recetores TNF, ou fatores de necrose tumoral, é expresso constitutivamente em muitos tecidos, sendo considerado um dos principais ligados à morte celular programada, pois esta ocorre quando um ligando interage com ele³⁵.

O segundo recetor, o TNF – alfa I, não é tão comum, mas tem a mesma função, apesar de possuir mecanismos diferentes. Este é ativado por citocinas inflamatórias produzidas pelos próprios macrófagos, denominadas por TNF – alfa, que podem culminar em apoptose ou necrose celular³⁶.

Como referido, esta bactéria parece ser capaz de inibir a apoptose das células hospedeiras, tanto pela via intrínseca como extrínseca.

Começando pela primeira via, esta é controlada através de uma regulação da produção de proteínas, envolvidas tanto na apoptose como na sua inibição, pela indução da tradução de determinados genes³⁴.

Isto é corroborado pela evidência de que estirpes não virulentas desta bactéria, que induzem apoptose celular em grande quantidade, não foram observadas como capazes de regular a transcrição de genes anti-apoptóticos³⁴. Pelo contrário, estirpes mais virulentas demonstraram efetivamente capacidade para promover a transcrição de genes que codificam proteínas anti-apoptóticas³⁴.

Além da via intracelular, também surge evidência de que *M. tuberculosis* é capaz de influenciar a ação apoptótica da célula a nível extracelular, através da modificação da expressão de recetores, como o CD95 ou o recetor TNF 2³⁴. Deste modo, o número destes recetores expressos encontra-se reduzido, num macrófago infetado com esta bactéria.

Aliado a esta modificação, também a parede celular da bactéria é capaz de estimular a produção de um fator de sobrevivência, o fator nuclear kB (NF-kB), que também auxilia na regulação anti-apoptótica da célula³⁴.

2.5.3 Uso de Projeções Citoesqueléticas

Outra espécie com uma semelhante estratégia de evasão imunitária é *Listeria monocytogenes*, o agente etiológico da listeriose, sendo um agente patogénico oportunista que pode provocar desde diarreias autolimitadas, até graves situações patológicas, como septicémias³⁷.

Tal como *M. tuberculosis*, esta bactéria também é fagocitada pelos macrófagos, mas desenvolveu uma maneira de escapar da atuação fagocítica, usando uma toxina específica, denominada listeriolisina O (LLO), capaz de formar poros no fagossoma³⁸. Após esta formação, há rutura da vesícula, sendo a bactéria, posteriormente, capaz de escapar facilmente para o citoplasma celular, onde possui maior liberdade para se multiplicar e disseminar.

Já no citosol, são capazes de infetar outras células sem sequer sair para o ambiente extracelular. Isto devido à sua capacidade de controlar uma proteína do citoesqueleto celular, a actina, forçando a sua polimerização, criando um esqueleto propulsor que impulsiona a bactéria do citoplasma para fora da célula, e diretamente para dentro de células vizinhas, através de projeções vacuolares³⁹ (Figura 3).

Esta ação é mediada por uma proteína da superfície bacteriana, a ActA, que é semelhante a proteínas eucarióticas com a função de formação de filamentos de actina³⁹. Devido a essa homologia, é capaz de confundir a célula hospedeira, provocando a formação desses mesmos filamentos propulsores, vantajosos para o microrganismo invasor.

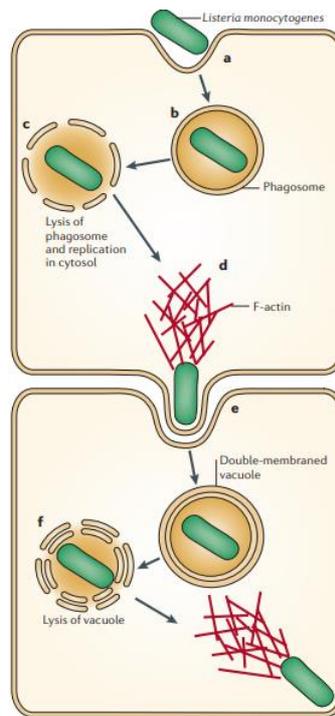


Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de vida de *Listeria monocytogenes*. (Retirado)³⁹

Esta tática traz benefícios óbvios para *L. monocytogenes*, pois evita que este agente seja exposto à ação imunitária existente no meio extracelular, esquivando-se de células que patrulham o organismo, bem como de outros perigos, como anticorpos¹³. No entanto, continua a ser suscetível a células T citotóxicas, possivelmente devido a não induzir uma morte celular rápida, aliado ao facto de produzir proteínas que são passíveis de ser apresentadas a células imunes, como células T citotóxicas⁴⁰.

2.6 Controlo sobre Citocinas

Além das bactérias apresentarem diversos meios pelos quais evadem e sobrevivem ao sistema imune, até agora referi predominantemente métodos de evasão celular, ou de sobrevivência dentro das células.

No entanto, existem outras táticas que conferem maior flexibilidade à atuação bacteriana perante o sistema imune. Uma delas é o controlo da produção de citocinas por parte das células imunitárias.

Citocinas são pequenas moléculas proteicas, que funcionam como sinalizadores e moduladores celulares, tanto autócrinos, como parácrinos e endócrinos, surgindo sob diversos nomes consoante a célula específica que as produzem⁴¹. Estão predominantemente envolvidas na imunomodulação e na regulação da inflamação, podendo ser tanto anti- como

pró-inflamatórias, pelo que, desse modo, estão intimamente ligadas à atuação do sistema imune⁴¹.

Com isto em mente, podemos inferir que uma desregulação na sua produção pode ter graves efeitos no controlo imunológico⁴². Uma concentração mais baixa que o desejável pode levar a que haja uma fraca sinalização celular para combater a infeção, e conseqüentemente um menor grau de inflamação que não permita combater eficazmente a bactéria em questão.

Por outro lado, uma concentração demasiado elevada pode causar inflamação crónica e danosa para o organismo, desregulando a ativação celular imunológica e forçando as células do corpo a combater a ameaça, mesmo quando esta já foi neutralizada⁴³. Isto por sua vez pode causar danos às células circundantes, às próprias células do sistema imune, ou a qualquer outras estruturas com as quais a inflamação entre em contacto.

Além disso, uma concentração demasiado elevada de citocinas pró-inflamatórias pode mesmo beneficiar o crescimento de certas bactérias⁴⁴. De acordo com um estudo⁴⁴, foram testadas várias condições para analisar o crescimento intracelular de algumas bactérias, em monócitos, sendo uma das variáveis a concentração de citocinas pró-inflamatórias no meio. Neste, quando as concentrações de citocinas eram inferiores, havia efetivamente um decréscimo na atividade intracelular bacteriana. No entanto, no meio onde a concentração era mais elevada, apresentava-se o contrário, ou seja, o crescimento intracelular das bactérias aumentava significativamente. Este facto solidifica a hipótese de que não é apenas uma menor concentração de citocinas no meio que aumenta a sobrevivência e patogenicidade bacterianas.

Como exemplo, existem estirpes específicas de *E. coli* que expressam recetores para um tipo de citocina, a interleucina-1 (IL-1), e que demonstraram um maior crescimento na presença dessa mesma citocina, devido a esta afinidade⁴⁵.

Na perspetiva contrária, há bactérias que preferem um ambiente com uma menor concentração de citocinas para poderem proliferar, sendo capazes de produzir moléculas nesse sentido. Um exemplo disso é a bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que é descrita como sendo capaz de impedir a libertação de algumas citocinas a partir de células T CD4⁴². Ao produzir uma proteína específica, obstrói a libertação de algumas citocinas responsáveis por sinalizar respostas imunes humorais e celulares, sendo assim eficaz como um método de defesa bacteriano.

De igual modo, esta inibição da produção de citocinas produzidas pelos linfócitos T também foi encontrada nalgumas estirpes de *E. coli*, permitindo-lhes criar um meio com maior probabilidade de sobrevivência⁴². Estas mostraram ser capazes de inibir a expressão de mRNA linfocitário que traduziria para estas citocinas.

Apesar da inativação da produção de citocinas já ser em si uma tática válida para as bactérias superarem o sistema imune, os diversos métodos de degradação das citocinas também podem ser considerados úteis.

Um desses métodos, evidenciado por *Pseudomonas aeruginosa*, é o uso de uma protease e de uma elastase para inibir a proliferação de linfócitos mediada pela citocina IL-2⁴⁶. Estas enzimas são capazes de quebrar a citocina, degradando-a, reduzindo assim o contacto com recetores com afinidade para IL-2, que ativariam defesas imunitárias, como os linfócitos.

Apesar de tudo, existem ainda outras possibilidades, aproveitadas pelas bactérias, para modificarem a concentração de citocinas no meio.

Uma delas é através da interferência com *Toll-Like Receptors* (TLRs), que são uma família de recetores capazes de reconhecer e ligar a padrões moleculares associados a microrganismos, além de moléculas endógenas libertadas pelas células do próprio organismo, em caso de morte celular⁴⁷.

Estes recetores estão presentes sob formas diferentes dependendo da célula que os apresente, encontrando-se principalmente nas células do sistema imune e nas do epitélio das vias respiratórias⁴⁷. Após ativação, depois de ocorrer ligação de substâncias com a devida afinidade, como péptidos microbianos, estes recetores estimulam uma resposta inflamatória adequada, através da ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B⁴⁷.

Esta resposta inflamatória envolve citocinas pró- e anti-inflamatórias, e interferir com os recetores referidos é uma maneira de controlar a sua libertação. Algumas espécies bacterianas a ter sucesso nesta manipulação pertencem ao género *Yersinia*, capazes de secretar um antigénio específico que se liga ao TLR-2 e ao recetor CD14¹⁴. Esta ligação despoleta uma produção de uma citocina, a IL-10, que atua com função anti-inflamatória e imunossupressora, bastante vantajosa para as bactérias.

De forma a comprovar que esta tática confere uma vantagem para a virulência de algumas bactérias deste género, foi observado que ratos com deficiência em recetores TLR-2 possuíam maior capacidade para resistir a infeções por *Yersinia enterocolitica*, precisamente por não ocorrer uma manipulação da citocina que controla a inflamação e imunossupressão⁴⁸.

Como descrito, a existência destes recetores pode ser vantajosa para algumas bactérias, como a referida anteriormente, mas para outras pode significar o contrário, simbolizando uma sinalização celular e inflamação indesejável que reduz a virulência da espécie invasora.

Daí existirem espécies bacterianas devidamente equipadas para evitar ou neutralizar este tipo de recetores. Apesar deste tipo de mecanismos bacterianos ser menos

compreendido, em comparação com os mecanismos virais, existem alguns exemplos já estudados que podem servir de referência⁴⁹.

Um deles é demonstrado através de algumas estirpes de *E. coli*, as quais são capazes de produzir proteínas que, quando internalizadas por macrófagos, desativam a sinalização dos TLRs, ao se ligarem a uma proteína transdutora do sinal, emitido pelos recetores⁴⁹.

Foi testada a remoção genética de uma das proteínas numa linha celular de macrófagos, e determinou-se que, sem esta arma proteica, há maior produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como uma menor probabilidade de sobrevivência intracelular, por parte da estirpe CFT073 de *E. coli*⁴⁹.

2.7 Proteção Oxidativa

Além do uso de citocinas, o nosso organismo também ativa outros mecanismos imunitários, de forma a controlar a propagação e virulência de agentes patogénicos, sendo um deles o uso das espécies reativas de oxigénio e óxido nítrico (NO)⁵⁰. Estas espécies reativas são produzidas pela redução parcial de oxigénio, e o NO é produzido pela óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), também por redução de oxigénio⁵⁰. As suas funções incluem tanto a eliminação de microrganismos, como a atuação como moléculas sinalizadoras.

Esta última função, a de sinalização celular, é capaz de influenciar diversos processos moleculares intra- e extracelulares, como transdução de sinais, processos inflamatórios, vasoconstrição e até senescência de células específicas⁵⁰⁻⁵¹.

Isto ocorre devido à existência de maquinaria celular adaptada para lidar com estas espécies, atuando como antioxidantes, evitando que surjam danos consequentes da produção das referidas espécies, e efetivamente tornando estes processos reversíveis⁵¹.

No entanto, esta contenção do poder oxidante apenas consegue atuar com eficácia quando a concentração das espécies reativas é baixa, pois quando ocorre algum descontrolo, como por exemplo no caso de uma inflamação crónica, a sua concentração torna-se demasiado elevada para ser controlada⁵⁰.

Nesse caso, formando-se espécies reativas secundárias, aquando do contacto dos iões de oxigénio com eles próprios ou com iões metálicos, sendo que o dano tem potencial para atingir virtualmente qualquer biomolécula, seja DNA, proteínas ou lípidos⁵¹. O resultado final é muitas vezes irreversível, caracterizando-se por disfunção ou até morte celular.

Apesar da descrição ter sido incidida para as próprias células do organismo, estas espécies reativas de oxigénio também atuam contra os invasores, como referido antes, devido à sua capacidade disruptora de sistemas celulares.

Naturalmente, os seres invasores ao organismo, nomeadamente algumas bactérias, evoluíram táticas para evitar ou contornar este mecanismo imunitário.

Em primeiro lugar, estas possuem o que as nossas próprias células possuem: sistemas enzimáticos, denominados por superóxido dismutases, com capacidade de converter espécies reativas de oxigénio em peróxido de hidrogénio, e catalases e peroxidases para remover este último⁵². Estes mecanismos servem para neutralizar as ditas concentrações baixas das espécies reativas, mais comuns e até endógenas à célula, de forma a evitar danos celulares.

Relativamente às concentrações mais elevadas de espécies reativas, nomeadamente o peróxido de hidrogénio, estas são minimizadas com recurso a táticas diferentes de acordo com o tipo de espécie bacteriana analisada⁵².

Por exemplo, o OxyR, um fator de transcrição induzido pelo peróxido de hidrogénio, está presente em muitas espécies de bactérias de Gram-negativo⁵³. Na maioria dos casos, quando ocorre a sua ativação, há um recrutamento de RNA polimerase, de forma a serem transcritos genes que atuam sobre o *stress oxidativo*⁵³. Além disso, esse fator de transcrição também está documentado como capaz de inibir a transcrição desses mesmos genes, em casos em que não haja necessidade celular.

Por outro lado, presente em muitas bactérias de Gram-positivo, encontra-se o fator de transcrição PerR, que apresenta semelhantes funções às descritas para o fator anterior, sendo que regula igualmente a expressão de vários genes com atividade ligada ao *stress oxidativo*⁵³.

Assim, ambos os fatores descritos induzem processos enzimáticos que visam captar e destruir o peróxido de hidrogénio, evitando maiores danos futuros⁵⁴. Estes processos conseguem ser de tal modo eficazes que permitem que uma bactéria, como é o caso de *E. coli*, sobreviva em ambientes onde a concentração extracelular de peróxido de hidrogénio é 10^6 vezes maior do que a concentração intracelular⁵².

Além destes fatores de transcrição, existe outro considerado importante e encontrado em muitos tipos de bactérias, o SoxRS⁵⁴. Este serve como um mecanismo de defesa, não contra o peróxido de hidrogénio, como os anteriores, mas sim contra iões reativos de oxigénio e outros compostos provenientes das atividades de oxidação-redução que caracterizam estas táticas de destoxificação do *stress oxidativo*⁵⁴.

Este sistema é composto por duas proteínas, SoxR e SoxS, na qual, dependendo do estado de oxidação consequente do contacto com espécies reativas, a primeira proteína ativa a segunda, que, por sua vez, ativa uma cascata de transcrição, transcrevendo genes com funções de defesa oxidante, reparo de dano celular e manutenção metabólica⁵⁴.

Após ocorrer uma gestão do *stress* oxidativo, SoxR é inativado ou reduzido por sistemas enzimáticos redutores, enquanto SoxS é degradada por proteólise, evitando assim uma resposta antioxidante exagerada⁵³.

Apesar deste sistema proteico de gestão do *stress* oxidativo estar presente numa elevada percentagem de bactérias, em bactérias não-entéricas, como é o caso de *P. aeruginosa*, a proteína SoxS não é encontrada, pelo que a SoxR ativa diretamente conjuntos de genes responsáveis pela atividade antioxidante⁵³.

Ainda sobre este tema, é importante referir algumas espécies bacterianas que desenvolveram estratégias menos gerais, e mais específicas para o seu modo de atuação, dentro do organismo humano.

O género de bactérias *Salmonella*, especificamente as intracelulares, habitam dentro de um vacúolo especial em macrófagos, tendo desenvolvido um mecanismo para contrariar o influxo de NO emitido por estes, que resultaria em espécies reativas de oxigénio letais para as bactérias⁵⁵.

Este género contém um sistema de secreção proteico, denominado Spi2, que atua contra os intermediários reativos do NO⁵⁵. Para comprovar que este mecanismo atua contra o NO, foram testadas bactérias com Spi2 funcional, e comparadas com bactérias mutantes, em que o Spi2 se encontra alterado.

O estudo demonstrou uma reduzida proliferação intracelular nas bactérias mutantes, o que sugere que este sistema proteico estará envolvido nas mortes bacterianas, por deficiência no combate às espécies reativas de oxigénio provenientes do NO⁵⁵.

Apesar de não se saber exatamente a função do Spi2, sugere-se que, entre outras hipóteses, pode estar relacionado com uma inibição das vesículas contendo iNOS, produtor de NO, impedindo-as de contactar com o vacúolo onde habita a bactéria⁵⁵.

2.8 Evasão Comensal

Até aqui, foram referidos e analisados mecanismos de evasão ao sistema imune, por parte de bactérias invasoras ou oportunistas. No entanto, estes mecanismos de evasão também se aplicam a bactérias comensais, como por exemplo as bactérias gastrointestinais, pois também necessitam de evitar serem confundidas com seres patogénicos, de modo a sobreviverem.

Focando-nos nas referidas bactérias gastrointestinais, estas formam uma comunidade complexa e abundante no organismo humano, devido à sua quantidade enorme e

multiplicidade de espécies, sendo referida desse modo como a microbiota gastrointestinal humana⁵⁶.

Esta evoluiu juntamente com o organismo desde o momento em que se instalou no hospedeiro, criando uma relação de comensalismo com o mesmo, em que a espécie bacteriana é beneficiada, mas fornecendo ao organismo humano nutrientes, uma digestão facilitada, destoxificação e proteção contra agentes patogénicos, entre outros benefícios úteis⁵⁶.

Desse modo, e aliado ao facto do sistema imune humano se encontrar espalhado por todo o organismo, incluindo no trato gastrointestinal, esta microbiota gastrointestinal necessita de possuir métodos para não o ativar. Se tal acontecer, podemos estar perante o início de uma disbiose gastrointestinal, ou seja, uma alteração negativa da composição da microbiota, que pode causar inflamação excessiva, *stress* oxidativo e aumento da resistência à insulina, por exemplo, com a sua cronicidade e progressão inflamatória do trato gastrointestinal para o resto do organismo⁵⁷.

Além disso, uma alteração à composição da microbiota pode muitas vezes levar à proliferação de bactérias potencialmente patogénicas, causando uma disrupção no bom funcionamento intestinal, bem como no número de bactérias comensais⁵⁷.

Sendo assim, de modo a evitar alertar o sistema imune, uma descoberta recente mostrou que estas bactérias comensais possuem um tipo diferente de flagelina, uma proteína que compõe o flagelo, um organelo usado pelas bactérias para se movimentarem⁵⁸.

Este organelo, existente em bactérias tanto patogénicas como comensais, suscita uma resposta inflamatória em contacto com células do sistema imune, através da ligação com recetores TLR-5 presentes nas mesmas. No entanto, enquanto outras bactérias podem desenvolver meios de evitar o contacto com este tipo de recetores, de forma a evitar ativação do sistema imune, a microbiota gastrointestinal parece produzir flagelina capaz de se ligar ao TLR-5, mas sem causar uma resposta imunológica ou inflamatória⁵⁸.

Estas flagelinas presentes nas bactérias comensais foram denominadas de flagelinas “silenciosas”, pois apesar de se ligarem eficazmente aos recetores referidos, a ligação não produz qualquer ação imunológica, sendo considerado um método eficaz para evadir uma deteção patológica pelo sistema imune⁵⁸.

O facto de este tipo de flagelina ter sido detetado de forma comum nas bactérias comensais do trato gastrointestinal prova que pode ser um dos meios usados por estas para realizar esta evasão.

2.9 Evasão Bacteriana Incomum

Para finalizar o tema dos mecanismos de evasão bacteriana ao sistema imune, gostava de abordar um mecanismo diferente dos referenciados até agora.

Anteriormente, abordei contactos entre bactérias e células do sistema imune que resultam em reações imunitárias, os quais abrangem a grande maioria das bactérias invasoras do organismo. Referi também contactos entre bactérias e células do sistema imune que não resultam em deteção imunitária, como sendo o exemplo das flagelinas da microbiota gastrointestinal abordada anteriormente.

No entanto, um tipo especial de contacto ficou por referir, no qual a ligação entre bactérias e células imunitárias não suscita qualquer tipo de reação, não por estar estruturalmente evoluída para isso, mas sim porque a ligação nunca ocorreu antes.

Ou seja, este contacto e subsequente reconhecimento por parte das células imunitárias só ocorre quando as bactérias que sofrem contacto têm uma estrutura celular que lhes permita serem reconhecidas. Se a sua estrutura celular for diferente o suficiente para desafiar os padrões de reconhecimento celular, as células do sistema imune não terão capacidade para reconhecer sequer a existência de uma bactéria patogénica, e foi precisamente isso que aconteceu ao expor bactérias dos fundos oceânicos a células imunitárias humanas⁵⁹.

Recentemente, foi realizado um estudo no qual se cultivaram bactérias dos fundos oceânicos, as quais nunca entraram em contacto com o organismo humano, junto com células do sistema imune, de forma a observar que tipo de reação ocorreria⁵⁹.

Na grande maioria das estirpes cultivadas, as bactérias simplesmente não foram reconhecidas pelo sistema imune, sendo que o seu LPS membranar não foi reconhecido pelos recetores de identificação do LPS das células imunitárias⁵⁹.

Este facto prova que, mesmo com defesas robustas e adaptáveis como o sistema imunitário, podem existir invasores que, por nunca terem entrado em contacto com o organismo humano, sejam capazes de o evadir sem esforço.

No entanto, já se torna mais difícil imaginar esse tipo de bactérias a prosperar no organismo humano, pois devido a serem oriundas de ambientes completamente diferentes do nosso, com condições de temperatura, humidade e pressão díspares, a sua capacidade para sobreviver no corpo humano decai drasticamente.

Além disso, apesar do sistema imune não as conseguir detetar pelo método de reconhecimento do LPS, este possui muitas outras ferramentas à sua disposição para lidar com a ameaça, se algum dia ela surgir.

CONCLUSÃO

As táticas usadas pelas bactérias para evadir o sistema imune são vastas e complexas, não sendo possível serem representadas totalmente numa única revisão desta dimensão.

Desde variação antigénica, até inibição da fagocitose ou camuflagem estrutural, são inúmeros os meios que apresentam para evadir ou ludibriar o sistema imune.

Dessa forma, foram apresentados ao longo desta monografia apenas os mecanismos mais usuais, mas mesmo alguns destes não são completamente conhecidos, o que atesta à necessidade de melhor os compreender, de estudar e de os catalogar.

Não obstante a capacidade adaptativa do organismo humano, os seres bacterianos também possuem semelhantes qualidades, para assegurarem a sua sobrevivência, e nunca devemos descurar a sua aptidão para provocar doença, pois, como visto, até os seres comensais ao Homem, como *S. aureus* ou *E. coli*, a poderão provocar.

Apesar das bactérias analisadas ao longo do estudo possuírem diversas táticas de evasão, muitas são específicas para determinadas células, como no caso de *M. tuberculosis* e macrófagos. Outras são mais gerais, e menos focadas em células específicas, como o controlo sobre a concentração de citocinas por parte de *P. aeruginosa*.

Desta forma, ao observarmos como realizam a sua evasão, podemos prever o seu comportamento no futuro, face às mesmas defesas imunitárias ou a outras, e construir barreiras que nos permitam melhor adaptação contra qualquer ameaça, seja com vacinas, fármacos, ou qualquer outra forma de terapia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ INSTITUTE FOR QUALITY AND EFFICIENCY IN HEALTH CARE (IQWIG). (2006). - **What are the organs of the immune system?**. Cologne, Germany. [Updated 2020 Jul 30]. [Consultation date january 23rd 2023]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279395/?report=classic>
- ² JANEWAY C.A. Jr., TRAVERS P., WALPORT M., WALPORT M. & SCLOMCHIK M. J. (2001). - **The mucosal immune system**. In: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27169/>
- ³ NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. (2013). - **Overview of the Immune System**. [Consultation date january 20th 2023]. Available from: <https://www.niaid.nih.gov/research/immune-system-overview>
- ⁴ TOMAR, N., & DE, R. K. (2014). - **A brief outline of the immune system**. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1184, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_1
- ⁵ THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA (2006). - **Lymphatic system**. [Updated 2023]. [Consultation date 23th january 2023]. Available from: <https://www.britannica.com/science/lymphatic-system>
- ⁶ BUJOREANU I. & GUPTA V. (2022). - **Anatomy, Lymph Nodes**. [Updated 2022 Jul 25]. [Consultation date january 30th 2023]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557717/>
- ⁷ KAPILA V., WEHRLE C.J. & TUMA F. (2023). - **Physiology, Spleen**. [Updated 2023 May 1]. [Consultation date january 26th 2023] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537307/>
- ⁸ THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. (2008). - **Tonsil**. [Updated 2023]. [Consultation date january 28th 2023]. Available from: <https://www.britannica.com/science/tonsil>
- ⁹ TOMAR, N., & DE, R. K. (2014). - **A brief outline of the immune system**. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1184, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_1
- ¹⁰ NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. (2014) - **Features of an Immune Response**. [Consultation date january 25th 2023]. Available from: <https://www.niaid.nih.gov/research/immune-response-features>

- ¹¹ NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. (2014) - **Immune Cells**. [Consultation date january 26th 2023]. Available from: <https://www.niaid.nih.gov/research/immune-cells>
- ¹² GANI Z. (n.d.). – **Complement System**. [Consultation date february 3rd 2023]. Available from: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-processes/complement-system>
- ¹³ JANEWAY C.A. JR., TRAVERS P. & WALPORT M. (2001). - **Pathogens have evolved various means of evading or subverting normal host defenses**. In: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27176/>
- ¹⁴ FINLAY B. B., & MCFADDEN G. (2006). - **Anti-immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens**. In *Cell* (Vol. 124, Issue 4, pp. 767–782). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.034>
- ¹⁵ BIZZELL E. (2018). – **Microbial Ninja Warriors: Bacterial Immune Evasion**. [Consultation date february 5th 2023]. Available from: <https://asm.org/Articles/2018/December/Microbial-Ninja-Warriors-Bacterial-Immune-Evasion>
- ¹⁶ BRODIN P., & DAVIS M. M. (2017). - **Human immune system variation**. *Nature reviews. Immunology*, 17(1), 21–29. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.125>
- ¹⁷ JAGATIA A. (2016). – **Microbes in an ancient mummy**. [Consultation date february 10th 2023]. Available from: <https://microbiologysociety.org/blog/microbes-in-an-ancient-mummy.html>
- ¹⁸ THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. (2023). - **Antigen**. [Updated 2023]. [Consultation date february 13th 2023]. Available from: <https://www.britannica.com/science/antigen>
- ¹⁹ GEORGIEVA M., KAGEDAN L., LU Y., THOMPSON C. M., & LIPSITCH M. (2018). - **Antigenic Variation in *Streptococcus pneumoniae* PspC Promotes Immune Escape in the Presence of Variant-Specific Immunity**. *mBio*, 9(2), e00264-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00264-18>
- ²⁰ COLE J. N., & NIZET V. (2016). **Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses**. *Microbiology spectrum*, 4(1), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0006-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0006-2015>

- ²¹ HUAN Y., KONG Q., MOU H., & YI H. (2020). - **Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields**. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- ²² CRESS B. F., ENGLAENDER J. A., HE W., KASPER D., LINHARDT R. J., & KOFFAS M. A. (2014). - **Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules**. *FEMS microbiology reviews*, 38(4), 660–697. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12056>
- ²³ GALÁN J. E. (2009). - **Common themes in the design and function of bacterial effectors**. *Cell host & microbe*, 5(6), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.008>
- ²⁴ GALÁN J. E., & WAKSMAN G. (2018). **Protein-Injection Machines in Bacteria**. In *Cell* (Vol. 172, Issue 6, pp. 1306–1318). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.034>
- ²⁵ THAMMAVONGSA V., KIM H. K., MISSIAKAS D., & SCHNEEWIND O. (2015). - **Staphylococcal manipulation of host immune responses**. *Nature reviews. Microbiology*, 13(9), 529–543. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3521>
- ²⁶ GOODYEAR C. S., & SILVERMAN G. J. (2003). - **Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a Staphylococcal Toxin**. *The Journal of experimental medicine*, 197(9), 1125–1139. <https://doi.org/10.1084/jem.20020552>
- ²⁷ DEACY A. M., GAN S. K. E., & DERRICK J. P. (2021). - **Superantigen Recognition and Interactions: Functions, Mechanisms and Applications**. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.731845>
- ²⁸ ZHAI W., WU F., ZHANG Y., FU Y., & LIU Z. (2019). - **The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis**. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 340. <https://doi.org/10.3390/ijms20020340>
- ²⁹ HARRIS J. (n.d.). **Phagocytosis**. [Consultation date march 4th 2023]. Available from: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-processes/phagocytosis>
- ³⁰ SETO S., TSUJIMURA K., & KOIDE Y. (2012). - **Coronin-1a inhibits autophagosome formation around Mycobacterium tuberculosis-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages**. *Cellular microbiology*, 14(5), 710–727. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01754.x>

- ³¹ VERGNE I., FRATTI R. A., HILL P. J., CHUA J., BELISLE J., & DERETIC V. (2004). - ***Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion.** *Molecular biology of the cell*, 15(2), 751–760. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-05-0307>
- ³² WONG D., BACH H., SUN J., HMAMA Z., & AV-GAY Y. (2011). - ***Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), 19371–19376. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109201108>
- ³³ KIAZYK S., & BALL T. B. (2017). - **Latent tuberculosis infection: An overview.** *Canada communicable disease report = Relevé des maladies transmissibles au Canada*, 43(3-4), 62–66. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v43i34a01>
- ³⁴ BRIKEN V., & MILLER J. L. (2008). - **Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*.** *Future microbiology*, 3(4), 415–422. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.4.415>
- ³⁵ PETER M. E., BUDD R. C., DESBARATS J., HEDRICK S. M., HUEBER A. O., NEWELL M. K., OWEN L. B., POPE R. M., TSCHOPP J., WAJANT H., WALLACH D., WILTROUT R. H., ZÖRNIG M., & LYNCH D. H. (2007). - **The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited.** In *Cell* (Vol. 129, Issue 3, pp. 447–450). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.031>
- ³⁶ IDRIS, H. T., & NAISMITH, J. H. (2000). - **TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s).** *Microscopy research and technique*, 50(3), 184–195. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H)
- ³⁷ LESEIGNEUR C., LÊ-BURY P., PIZARRO-CERDÁ J., & DUSSURGET O. (2020). - **Emerging Evasion Mechanisms of Macrophage Defenses by Pathogenic Bacteria.** In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.577559>
- ³⁸ DRAMSI, S., & COSSART, P. (2002). - **Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite.** *The Journal of cell biology*, 156(6), 943–946. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202121>

- ³⁹ HAMON, M., BIERNE, H., & COSSART, P. (2006). - **Listeria monocytogenes: A multifaceted model**. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 4, Issue 6, pp. 423–434). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1413>
- ⁴⁰ CHÁVEZ-ARROYO A., & PORTNOY D. A. (2020). - **Why is Listeria monocytogenes such a potent inducer of CD8+ T-cells?**. *Cellular microbiology*, 22(4), e13175. <https://doi.org/10.1111/cmi.13175>
- ⁴¹ ZHANG J. M., & AN J. (2007). - **Cytokines, inflammation, and pain**. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- ⁴² WILSON M., SEYMOUR R., & HENDERSON B. (1998). - **Bacterial perturbation of cytokine networks**. *Infection and immunity*, 66(6), 2401–2409. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.6.2401-2409.1998>
- ⁴³ FLEIT H. B. (2014). - **Chronic Inflammation**. In *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms* (pp. 300–314). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01808-6>
- ⁴⁴ KANANGAT S., MEDURI G. U., TOLLEY E. A., PATTERSON D. R., MEDURI C. U., PAK C., GRIFFIN J. P., BRONZE M. S., & SCHABERG D. R. (1999). - **Effects of cytokines and endotoxin on the intracellular growth of bacteria**. *Infection and immunity*, 67(6), 2834–2840. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.6.2834-2840.1999>
- ⁴⁵ PORAT R., CLARK B. D., WOLFF S. M., & DINARELLO C. A. (1991). - **Enhancement of growth of virulent strains of Escherichia coli by interleukin-1**. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5030), 430–432. <https://doi.org/10.1126/science.1833820>
- ⁴⁶ THEANDER T. G., KHARAZMI A., PEDERSEN B. K., CHRISTENSEN L. D., TVEDE N., POULSEN L. K., ODUM N., SVENSON M., & BENDTZEN K. (1988). - **Inhibition of human lymphocyte proliferation and cleavage of interleukin-2 by Pseudomonas aeruginosa proteases**. *Infection and immunity*, 56(7), 1673–1677. <https://doi.org/10.1128/iai.56.7.1673-1677.1988>
- ⁴⁷ MUES N., & CHU H. W. (2020). - **Out-Smarting the Host: Bacteria Maneuvering the Immune Response to Favor Their Survival**. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00819>
- ⁴⁸ SING A., ROST D., TVARDOVSKAIA N., ROGGENKAMP A., WIEDEMANN A., KIRSCHNING C. J., AEPFELBACHER M., & HEESEMANN J. (2002). - **Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated**

- immunosuppression.** *The Journal of experimental medicine*, 196(8), 1017–1024.
<https://doi.org/10.1084/jem.20020908>
- ⁴⁹ O'NEILL L. (2008). - **Bacteria fight back against Toll-like receptors.** *Nat Med* 14, 370–372. <https://doi.org/10.1038/nm0408-370>
- ⁵⁰ BASSOY E. Y., WALCH M., & MARTINVALET D. (2021). - **Reactive Oxygen Species: Do They Play a Role in Adaptive Immunity?** In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.755856>
- ⁵¹ HE L., HE T., FARRAR S., JI L., LIU T., & MA, X. (2017). - **Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species.** *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 44(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- ⁵² FASNACHT M., & POLACEK N. (2021). - **Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology.** In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671037>
- ⁵³ SEIXAS A. F., QUENDERA A. P., SOUSA J. P., SILVA A. F. Q., ARRAIANO C. M., & ANDRADE J. M. (2022). - **Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation.** In *Frontiers in Genetics* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.821535>
- ⁵⁴ ANES J., DEVER K., ESHWAR A., NGUYEN S., CAO Y., SIVASANKARAN S. K., SAKALAIUSKAITĖ S., LEHNER A., DEVINEAU S., DAUGELAVIČIUS R., FANNING S., & SRIKUMAR S. (n.d.). - **Analysis of the oxidative stress regulon identifies soxS as a genetic target for resistance reversal in multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*.** <https://doi.org/10.1101/2020.08.21.262022>
- ⁵⁵ CHAKRAVORTTY D., HANSEN-WESTER I., & HENSEL M. (2002). - **Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates.** *The Journal of experimental medicine*, 195(9), 1155–1166. <https://doi.org/10.1084/jem.20011547>
- ⁵⁶ WU H. J., & WU E. (2012). - **The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity.** *Gut microbes*, 3(1), 4–14. <https://doi.org/10.4161/gmic.19320>
- ⁵⁷ YOO J. Y., GROER M., DUTRA S. V. O., SARKAR A., & MCSKIMMING D. I. (2020). - **Gut Microbiota and Immune System Interactions.** *Microorganisms*, 8(10), 1587. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101587>

- ⁵⁸ BAER M. H., SANDILYA S., STEINER S. T. (2023). - **Evading the Toll booth: How “silent” flagellins may bind yet fail to activate TLR5.***Sci. Immunol.***8**,eadf0244 (2023).DOI:10.1126/sciimmunol.adf0244
- ⁵⁹ GAUTHIER E. A., CHANDLER E. C., POLI V., GARDNER M. F., TEKIAU A., SMITH R., BONHAM S. K., CORDES E. E., SHANK M. T., ZANONI I., GOODLETT R. D., BILLER J. S., ERNST K. R., ROTJAN D. R., & KAGAN C. J. (2021). - **Deep-sea microbes as tools to refine the rules of innate immune pattern recognition.***Sci. Immunol.***6**,eabe0531 (2021).DOI:10.1126/sciimmunol.abe0531