



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Eliza Mathias Melo

**EFEITOS PROTETORES DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE INFECÇÃO PULMONAR.**

Belo Horizonte
2021

Eliza Mathias Melo

**EFEITOS PROTETORES DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE INFECÇÃO PULMONAR.**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins
Teixeira.

Belo Horizonte

2021

- 043 Melo, Eliza Mathias.
 Efeitos protetores da Angiotensina-(1-7) em modelos experimentais de
 infecção pulmonar [manuscrito] / Eliza Mathias Melo. – 2021.
 102 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
 Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Influenza Aviária. 3. Streptococcus
 pneumoniae. 4. Angiotensinas. 5. Inflamação. 6. Pneumonia. I. Teixeira, Mauro
 Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências
 Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ELIZA MATHIAS MELO. Aos vinte e oito dias do mês de outubro de 2021 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeitos protetores de Angiotensina-(1-7) em modelos experimentais de infecção pulmonar", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Mauro Martins Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Caio Tavares Fagundes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rafael Elias Marques Pereira Silva (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais), aprovada; Dra. Giselle Santos Magalhães (Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Mauro Martins Teixeira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ APROVADA
☐ REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de outubro de 2021.

Dr. Caio Tavares Fagundes (UFMG)

Dr. Rafael Elias Marques Pereira Silva (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais)

Dra. Giselle Santos Magalhães (Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais)

Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)

Dr. Mauro Martins Teixeira - Orientador (UFMG)

MAURO MARTINS TEIXEIRA:69525188604

Assinado de forma digital por MAURO MARTINS
 TEIXEIRA:69525188604
 Dados: 2021.10.28 16:01:01 -03'00'

AGRADECIMENTO

Este é o final de mais uma etapa que escolhi viver. Etapa concluída com mix de emoções e regada pela presença de amigos e da família e também pela ausência dolorosa e saudosa de quem amo. É aprendizado que vai da academia para a vida. Conviver com pessoas nos permite resistir, crescer e florescer.

Agradeço a todos que fizeram parte de mais esta etapa! À minha mamãe Angelina de muita garra e pai Nilo que sempre demonstrou sua torcida e orgulho enquanto pôde. Aos meus irmãos Jr e Bruno muito importantes para mim. Ao, Pequeno, meu companheiro de vida, de danças, cantos e churrasco à dois... como a gente se diverte! Ele que me inspira a conquistar diferentes sonhos e a agarrar o que realmente importa na vida. Pintinha e Alf que me trazem alegria e carinho a todo momento. Ô trem fofo.

Agradeço ao Maro, Mairo, Muaro... digo, Mauro por ter aceitado ser meu orientador e pelos momentos de convivência. É muito bom aprender com Mauro e todo o seu grupo de pesquisa do qual tive oportunidade de trabalhar. Agradeço a Ju Del Sarto, Flávia, JulyPri, Marina, Fernanda, Izabela, Daiane, Vívian, Amanda, Luciana, Fernando, Bruno, Ana Paula, Rebeca e Thiago que contribuíram para minha formação e senso crítico durante os cafés, os experimentos e reuniões Ao grupo Ciência pra Você por ter demonstrado a importância de me comunicar com a comunidade não acadêmica. Aos profs. Geovanni Cassali, Robson dos Santos e Alexandre Machado pela disponibilidade e contribuição. Agradeço a Ilma pelas confraternizações maravilhosas, pelo carinho e pelo importante papel de demonstrar que união, respeito e responsabilidade em um ambiente coletivo tornam o nosso trabalho mais próspero e leve.

Certa vez Mauro Teixeira e Alfredo Góes disseram: Nós levamos mais do que nossa própria essência quando nos aventuramos nas etapas da vida. Nós carregamos um pouquinho de cada um e de cada aprendizado. Essa experiência nos molda para a nossa próxima jornada. Então, eu digo: De alguma forma, levarei um pouquinho de todos vocês comigo!

Agradeço também as agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Bernardo de Chartres

RESUMO

A falha na resolução da inflamação exacerbada desencadeada pelo vírus Influenza A (IAV) impede o retorno da homeostase pulmonar e a sobrevivência, especialmente quando associada à infecção pneumocócica secundária. Estratégias terapêuticas baseadas em moléculas pró-resolução têm grande potencial contra doenças inflamatórias agudas. A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um mediador pró-resolutivo que atua em seu receptor Mas (MasR) para promover a resolução da inflamação. Investigamos os efeitos da Ang-(1-7) e o papel do MasR no contexto da infecção por IAV, infecção pneumocócica secundária à gripe e infecção pneumocócica moderada e grave, avaliando a inflamação pulmonar, cargas virais e bacterianas e dano pulmonar. O tratamento terapêutico com Ang-(1-7) diminuiu o recrutamento de neutrófilos, lesão pulmonar, carga viral e morbidade após uma infecção primária IAV. Ang-(1-7) induziu apoptose de neutrófilos e eferocitose dessas células por macrófagos alveolares, mas não teve efeito direto na replicação do IAV *in vitro*. Os camundongos deficientes em MasR (MasR^{-/-}) foram altamente suscetíveis à infecção IAV, exibindo inflamação descontrolada, aumento da carga viral e maior taxa de letalidade, em comparação com animais WT. Ang-(1-7) não foi protetor em camundongos MasR^{-/-}. Curiosamente, Ang-(1-7) administrado durante uma dose subletal de infecção IAV reduziu muito a morbidade associada a uma infecção subsequente por *S. pneumoniae*, conforme visto pela diminuição na magnitude do influxo de neutrófilos, número de bactérias no sangue levando a um menor letalidade. Esse tratamento também reduziu morbidade dos animais infectados com *S. pneumoniae* ao reduzir carga bacteriana no BALF e sangue, influxo de neutrófilo e maior sobrevivência quando associada à antibiótico ceftriaxona. Em conjunto, estes resultados mostram que Ang-(1-7) protege da infecção primária IAV, da infecção pneumocócica secundária à gripe, infecção pneumocócica moderada e quando associada a ceftriaxona promove sobrevivência. Efeitos vistos na infecção por IAV são dependentes de MasR. Mediadores de resolução da inflamação, como Ang-(1-7), devem ser considerados para o tratamento contra infecções virais e bacterianas pulmonares.

Palavras-chave: Influenza A; *Streptococcus pneumoniae*; Angiotensina-(1-7); inflamação; resolução; infecção pulmonar.

ABSTRACT

Failure to resolve exacerbated inflammation triggered by the Influenza A virus (IAV) prevents the return of pulmonary homeostasis and survival, especially when associated with secondary pneumococcal infection. Therapeutic strategies based on pro-resolution molecules have great potential against acute inflammatory diseases. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] is a pro-resolving mediator that acts on its Mas-receptor (MasR) to promote resolution of inflammation. We investigated the effects of Ang-(1-7) and the role of MasR in the context of IAV infection, post-influenza pneumococcal infection, and moderate and severe pneumococcal infection, assessing lung inflammation, viral and bacterial loads, and lung damage. Therapeutic treatment with Ang-(1-7) decreased neutrophil recruitment, lung injury, viral load and morbidity after a primary IAV infection. Ang-(1-7) induced neutrophil apoptosis and efferocytosis of these cells by alveolar macrophages, but had no direct effect on IAV replication in vitro. Mice deficient in MasR (MasR^{-/-}) were highly susceptible to IAV infection, exhibiting uncontrolled inflammation, increased viral load and higher fatality rate compared to WT animals. Ang-(1-7) was not protective in MasR^{-/-} mice. Interestingly, Ang-(1-7) given during a sublethal dose of IAV infection greatly reduced the morbidity associated with a subsequent *S. pneumoniae* infection, as seen by the decrease in the magnitude of neutrophil influx, number of bacteria in the blood leading to a lower lethality. This treatment also reduced morbidity of animals infected with *S. pneumoniae* by reducing bacterial load in the BALF and blood, neutrophil influx, and increased survival when associated with ceftriaxone antibiotic. These results show that Ang-(1-7) protects IAV single-infection, post-influenza pneumococcal infection, moderate pneumococcal infection, and when associated with ceftriaxone promotes survival. Effects seen in IAV infection are dependent on MasR. Mediators of inflammation resolution, such as Ang-(1-7), should be considered for the treatment of viral and bacterial pulmonary infections.

Keywords: Influenza A virus; *Streptococcus pneumoniae*; Angiotensin-(1-7); inflammation; resolution; lung infection.

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Dez principais causas de morte no mundo.	15
Figura 2: Estrutura esquemática do vírus Influenza A.....	18
Figura 3: Ciclo de replicação do vírus Influenza A.	20
Figura 4: Fatores de virulência de <i>S. pneumoniae</i>	29
Figura 5: Ciclo de infecção por <i>S. pneumoniae</i> e progressão da doença.	30
Figura 6: Resumo dos processos celulares e moleculares que regem a inflamação e sua resolução após contato com patógeno.	38
Figura 7: Cascata do sistema renina-angiotensina.	39
Figura 8: Parâmetros inflamatórios após a infecção por <i>S. pneumoniae</i> : leucócitos, edema, carga bacteriana e MPO.	74
Figura 9: Parâmetros inflamatórios após a infecção por <i>S. pneumoniae</i> : dosagem de citocinas e quimiocinas.	75
Figura 10: Score histopatológico pulmonar.....	77
Figura 11: Curva de proliferação bacteriana.	77
Figura 12: Curva de sobrevivência durante infecção pneumocócica grave. .	78

LISTA DE ABREVIATURA

^{-/-}: *knockout*

Ang(): angiotensina()

AT₁R: receptor tipo 1 de angiotensina

BALF: *bronchoalveolar lavage fluid* – fluido do lavado bronco alveolar

CCL-(): *chemokine (CC motif Ligand ()* – quimiocina ligante () com motivo CC)

CO₂: dióxido de carbono – gás carbônico

CXCL-(): *chemokine (CC motif Ligand ()* – quimiocina ligante () com motivo CC)

DAMP: padrões moleculares associados ao dano

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECA: enzima conversora de angiotensina

HA: hemaglutinina

HPβCD: hidroxipropil-β-ciclodextrina

IAV: *Influenza A virus* – vírus Influenza A

Ig(): imunoglobulina ()

IL-(): interleucina

ISG: genes induzidos por interferon

M(): proteínas de matriz

MAMP: padrões moleculares associados a microrganismos

MasR: receptor Mas

mg: miligramas

mg/kg: miligramas por quilograma

mL: mililitro

Mock: grupo não infectado

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NA: neuraminidase

NEP: proteína de exportação nuclear

NET: armadilhas extracelulares de neutrófilos

NK: *natural killer*

NLRP3: *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*

NP: nucleoproteínas

NS2: proteína não estrutural

O₂: oxigênio

OD: *optical Density* – densidade óptica

PAC: pneumonia Adquirida na Comunidade

PAMP: *pathogen-associated molecular pattern* – padrões moleculares associados a patógenos

PB(): RNA polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

PLY: pneumolisinas

PRR: receptor de reconhecimento padrão

Psp(): proteína () de superfície pneumocócica

RNA: ácido ribonucleico

TLR(): receptores do tipo Toll

TNF- α : *tumor necrosis factor alpha* – fator de necrose tumoral alfa

Veh: *vehicle* – grupo veículo (infectado sem tratamento)

vRNA: ácido ribonucleico viral

vRNP: ribonucleoproteínas virais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Aparelho respiratório e infecções no trato respiratório inferior	14
1.2 Agentes infecciosos no trato respiratório inferior	16
1.2.1 <i>Vírus Influenza A (IAV)</i>	16
1.3 Resposta inflamatória durante as infecções do trato respiratório inferior	37
1.4 Angiotensina-(1-7) e receptor Mas	38
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	41
2.1 Justificativa	41
2.2 Objetivo geral	42
3 TRABALHOS CIENTÍFICOS	43
3.1 Capítulo 1 – Artigo científico publicado	43
Relevance of Angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by Influenza virus and post-influenza pneumococcal infection	45
Introduction	46
Material and methods	46
Study design, ethical statement and mice	46
Influenza A virus and <i>S. Pneumoniae</i> infection	47
Angiotensin-(1–7) treatment	47
Western blot analysis	48
Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and total/differential cell count	48
Assessment of neutrophil apoptosis	48
Flow cytometry	49
Plaque assay	49
Lung MPO and NE	49
Histological analysis	49
Phagocytosis assay	50
Measurement of cytokines and chemokines	50
Results	50
Administration of Angiotensin-(1–7) prevents lethality and controls inflammation after IAV infection	50
Angiotensin-(1–7) induces apoptosis and increases binding and phagocytosis of apoptotic neutrophils	53
Absence of receptor Mas is associated with worsening of viral pneumonia	53

Treatment with Angiotensin-(1-7) in post-IAV pneumococcal infection is protective.....	54
Discussion.....	55
Authorship	62
Funding	62
Declaration of Competing Interest	63
Supplementary data	65
References.....	65
3.2 Capítulo 2 – Trabalho científico não publicado	67
3.2.1 Objetivo específico	67
3.2.1.2 Avaliar o papel do peptídeo pró-resolutivo Ang-(1-7) por administração oral, 48 horas após a infecção por <i>S. pneumoniae</i> em animais C57BL/6..	67
3.2.1.3 Avaliar efeito do peptídeo pró-resolutivo Ang-(1-7) por administração oral combinado com antibiótico ceftriaxona após sepse por <i>S. pneumoniae</i> em animais C57BL/6.....	67
3.2.1.4 Avaliar efeito direto de Ang-(1-7) sobre <i>S. pneumoniae</i>	67
3.2.2 Materiais e métodos	68
3.2.2.1 Animais.....	68
3.2.2.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	68
3.2.2.3 Infecção em camundongos	68
3.2.2.4 Angiotensina-(1-7) e esquema de tratamento	69
3.2.2.5 Eutanásia e coleta das amostras para análise de parâmetros inflamatórios	69
3.2.2.6 Contagem de <i>S. pneumoniae</i> no lavado bronco-alveolar.....	70
3.2.2.7 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	70
3.2.2.8 Dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO)	70
3.2.2.9 Dosagem de proteína no lavado bronco-alveolar (BALF) – edema	71
3.2.2.10 Dosagem de citocinas por ELISA.....	71
3.2.2.11 Análise histopatológica	72
3.2.2.12 Análise estatística	73
3.2.3 Resultados	73
3.2.3.1 Tratamento com Ang-(1-7) controla a inflamação durante infecção pneumocócica.....	73
3.2.3.2 Animais tratados com Ang-(1-7) apresentaram menores níveis de citocinas e quimiocinas.....	75
3.2.3.3 Animais tratados com Ang-(1-7) apresentaram redução do infiltrado inflamatório	76

3.2.3.4 <i>Ang-(1-7)</i> não inibe crescimento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> diretamente.....	77
3.2.3.5 <i>Ang-(1-7)</i> associado ao antibiótico ceftriaxona preveniu morte em infecção pneumocócica grave.....	78
3.2.4 <i>Discussão</i>	79
3.2.5 <i>Conclusão</i>	81
4 CONCLUSÃO GERAL.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aparelho respiratório e infecções no trato respiratório inferior

O aparelho respiratório é dividido em pulmões e árvore traqueobrônquica que comunica o parênquima pulmonar com o meio exterior. De acordo com a morfologia e função, o trato respiratório apresenta uma porção condutora que tem a função de aquecer, limpar e umedecer o ar inspirado para proteger a fina parede de células que compõem os alvéolos pulmonares, e uma porção respiratória onde ocorrem as trocas gasosas do dióxido de carbono (CO_2) do sangue proveniente do metabolismo celular e oxigênio (O_2) do ar inalado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

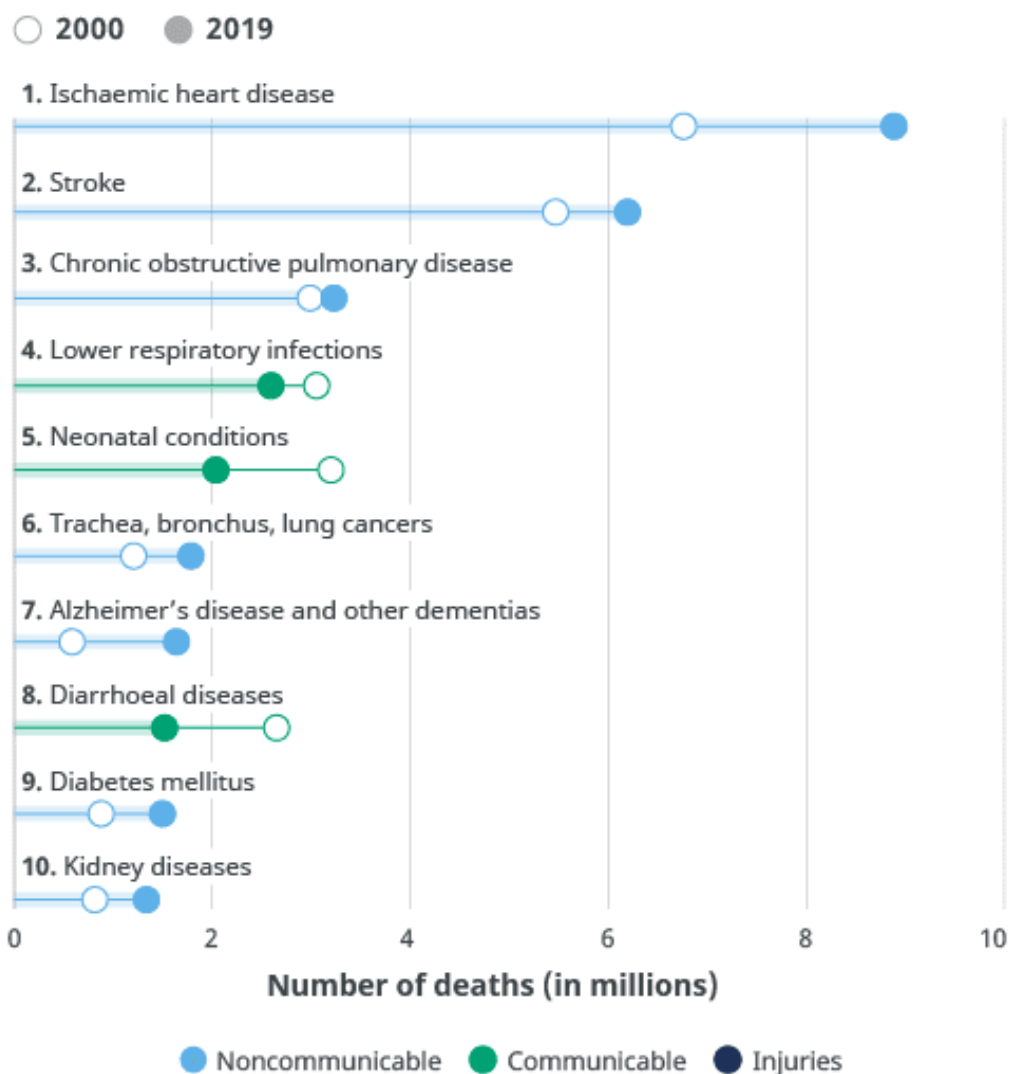
Outra classificação comum é trato respiratório superior e inferior. O trato respiratório superior, região extratorácica, inclui cavidade oral, cavidade nasal, faringe e laringe. O trato respiratório inferior, região intratorácica, começa na traqueia, árvore brônquica e os sacos alveolares que se localizam no interior dos pulmões (AHOOKHOSH *et al.*, 2020).

Os alvéolos são compostos por pneumócitos do tipo I e tipo II do qual ocupam respectivamente 96% e 4% da superfície alveolar, ainda que o número aproximado entre eles sejam semelhantes (GUILLIAMS *et al.*, 2013). Os do tipo I são classificados como epitélio pavimentoso simples com extensões citoplasmáticas que permitem troca de gases com maior facilidade e impedem o extravasamento do líquido surfactante para o interstício (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Além disso, essas células apresentam baixa capacidade de auto renovação, o que contrasta com os pneumócitos do tipo II que participam ativamente no processo de reparo do dano tecidual ao se auto renovar e se diferenciar a para o tipo I (FEHRENBACH, 2001; GUILLOT *et al.*, 2013). Em adição, os do tipo II são epitélio cúbico simples que produzem e liberam surfactante pulmonar, reduzem a tensão superficial nos alvéolos diminuindo a força necessária para inspirar e facilitando a respiração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Dessa forma, o aparelho respiratório funciona como uma área de interação entre um indivíduo e o meio do qual ele convive, permitindo a respiração. Essa interação funciona também como barreira contra eventuais patógenos dos quais podem ser inalados no meio externo. Quando microrganismos patogênicos evadem cílios, muco, peptídeos antimicrobianos, surfactante pulmonar e células do sistema imune no pulmão, ocorre a infecção podendo levar a doenças e até a morte. As

infecções pulmonares de maior gravidade e mortalidade frequentemente estão associadas ao acometimento do trato respiratório inferior, sendo 4ª causa de morte no mundo em 2019. Essas doenças transmissíveis, além de serem as únicas de natureza infecciosas, representam 2,6 milhões de mortes no mundo. (Figura 1) (WHO GLOBAL HEALTH ESTIMATES, 2020).

Leading causes of death globally



Source: WHO Global Health Estimates.

Figura 1: Dez principais causas de morte no mundo.

As infecções no trato respiratório inferior ocupam a quarta posição das causas de morte e continuam a ser as doenças transmissíveis mais mortais do mundo. Adaptado de (WHO GLOBAL HEALTH ESTIMATES, 2020): *Comprehensive and comparable health-related data, including life expectancy, healthy life expectancy, mortality and morbidity, and disease burden at the global, regional and national levels, disaggregated by age, sex and cause from 2000 to 2019.*

Além do grande número de mortes por doenças infecciosas pulmonares, elas são de importante relevância devido a ocorrência de algumas das maiores pandemias em diferentes momentos ao longo dos anos. As pandemias virais, que acometeram a população mundial, foram por infecções por Influenza e agora por Coronavírus (SARS-CoV-2) que provoca a COVID-19. Atualmente, mais do que influenza sazonal, a COVID-19 ultrapassa 4 milhões de mortes no mundo contabilizados desde o seu início em 2019 até meados de setembro de 2021 (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Há também outros agentes etiológicos virais e bacterianos que provocam doenças infecciosas respiratórias frequentes, como os vírus Rinovírus (RV), Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Adenovírus e Parainfluenza, e as bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus* e que estão intimamente ligadas a infecções virais primárias (DASARAJU; LIU, 1996; PAPADOPOULOS; SKEVAKI, 2006).

1.2 Agentes infecciosos no trato respiratório inferior

A região nasofaringe é descrita como nicho onde se inicia as infecções do aparelho respiratório (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004). Muitos microrganismos que colonizam o trato respiratório superior favorecem o desenvolvimento de doença durante a infância, sendo um desses a bactéria *Streptococcus pneumoniae* (VAN DEN BERGH *et al.*, 2012). Em um ambiente equilibrado, os microrganismos residentes beneficiam a saúde do hospedeiro ao estimular e maturar o sistema imune e compor uma barreira que protege contra patógenos invasores (JACOBY *et al.*, 2007). Porém, por ser uma colonização dinâmica, adquirindo e eliminando microrganismos, além da possibilidade de infecção prévia por vírus (exemplo do vírus Influenza A) ou ação de fatores ambientais, *S. pneumoniae* pode invadir, disseminar e desencadear pneumonia pneumocócica. Essas infecções podem ser pelos patógenos isolados ou ainda subsequentes ou associados desencadeando pneumonias graves.

1.2.1 Vírus Influenza A (IAV)

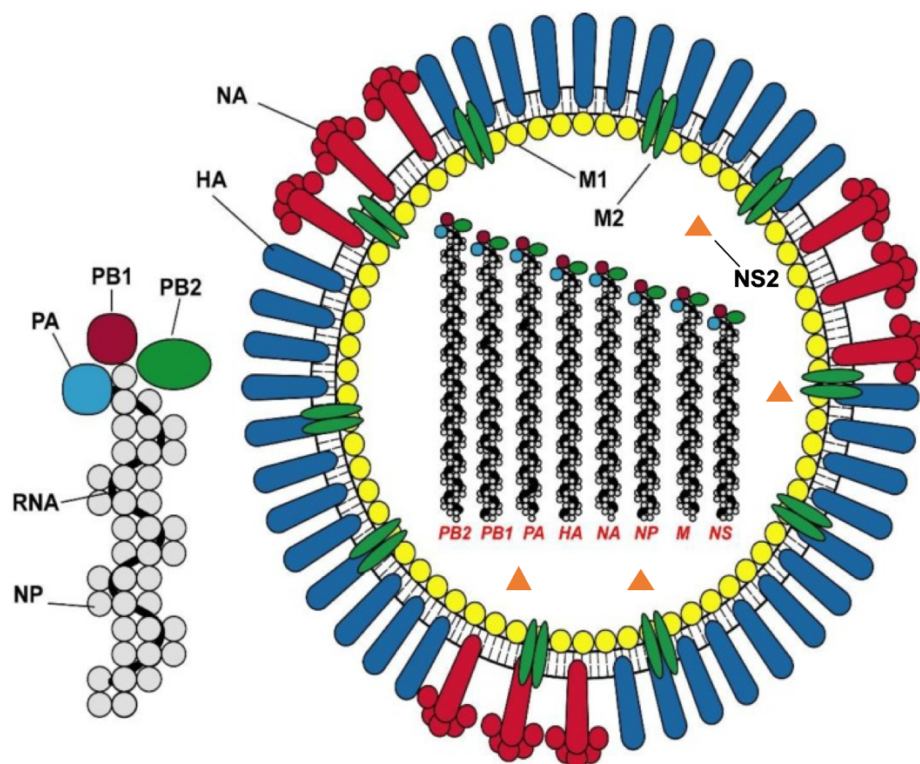
a) Propriedades virais

O vírus da Influenza A (IAV) é única espécie pertencente ao gênero *Alphainfluenzarivus*, além de ser a mais estudada da família *Orthomyxoviridae* com

extrema importância para a saúde pública devido ao seu potencial para causar pandemia de influenza (GHEDIN *et al.*, 2005; ICTV, [S.d.]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). O nome influenza é a forma italiana do latim *influentia*, “influência”, pois acreditava-se que as epidemias eram provocadas por influências astrológicas ou outras influências ocultas (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017).

IAVs são patógenos comuns em cavalos, suínos, humanos e aves domésticas em grande parte do mundo. Eles também são a causa de infecções e doenças esporádicas ou geograficamente limitadas em visons, focas, baleias e cães (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Dependendo do hospedeiro de origem, os IAVs podem ser classificados como, por exemplo, influenza aviária ou influenza suína. Os exemplos incluem os subtipos de IAVs H5N1 e H9N2 da gripe aviária ou os subtipos de IAVs H1N1 e H3N2 da gripe suína (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). É importante ressaltar que não somente o IAV, mas também os Influenza B e C são capazes de causar doenças em humanos (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). A distinção entre as espécies Influenza A, B e C se dá pelo número de segmentos de RNA (ácido ribonucleico) e por diferenças antigênicas de suas nucleoproteínas (NP) e proteínas de matriz (BOUVIER; PALESE, 2008).

O genoma viral possui aproximadamente 13.500 bases de comprimento distribuídos em 8 fitas simples de RNA senso negativo (ribonucleoproteínas virais – vRNPs) que codificam ao menos 17 proteínas virais (GHEDIN *et al.*, 2005). Os IAVs ainda podem ser subdivididos de acordo com a quantidade de suas glicoproteínas hemaglutinina (HA – 18 subtipos) e neuraminidase (NA – 11 subtipos) na superfície do envelope viral (BOUVIER; PALESE, 2008; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2019). HA e NA são as principais glicoproteínas de superfície e as proteínas de matriz 2 (M2) em menor proporção são incorporadas a bicamada lipídica do vírion. Já as proteínas de matriz 1 (M1) são chamadas de *core* do vírion que fica subjacente ao envelope viral interagindo com as proteínas de superfície e também com os RNA virais. Além disso, no vírion há também o heterotrímero do complexo de polimerase (PB2, PB1 e PA) e as proteínas de exportação nuclear (NEP, ou proteína não estrutural 2 – NS2) (TAUBENBERGER, J. K.; KASH, 2010). A representação diagramática da estrutura do IAV segue abaixo (Figura 2).



Proteína	Funções
(HA) Hemaglutinina (trímero)	Auxilia na ligação e fusão do IAV na célula hospedeira
(NA) Neuraminidase (tetraédrica)	Atividade sialidásica permitindo liberação de novos vírions
(M2) Canal iônico	Controle de pH viral
(NP) Nucleoproteína	Regulação da importação nuclear
(PB) RNA polimerase	Atividade proteásica
(PB1) RNA polimerase	Atividade endonucleásica, alongamento de RNA
(PB2) RNA polimerase	Reconhecimento de mRNA
(NS2) de exportação nuclear	Exportação nuclear de vRNPs
(M1 layer) de matriz	Regulação da exportação de vRNP, germinação viral

Figura 2: Estrutura esquemática do vírus Influenza A.

As 8 fitas de RNA (ribonucleoproteínas virais - vRNPs) e suas proteínas, codificadas por cada RNA. Descrição de função das proteínas do IAV durante o ciclo de replicação viral. Adaptado de (BOUVIER; PALESE, 2008; SRIDHAR; BROKSTAD; COX, 2015).

b) Ciclo de replicação viral

Inicialmente, o ciclo de replicação se dá pela ligação de HA viral ao ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) na membrana plasmática da célula hospedeira (BOUVIER; PALESE, 2008). As células hospedeiras têm glicanos de superfície com diferentes ligações de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) a um resíduo de galactose, e a HA viral reconhece essas diferentes ligações (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). As ligações com configurações α -2,3 mais comuns em aves e α -2,6 mais comuns em humanos são um importante elo na adaptação da infecção nas diferentes espécies, uma vez que animais podem apresentar ácidos siálicos dos dois tipos (α -2,3 e α -2,6), como por exemplo o porco (TAUBENBERGER, J. K.; KASH, 2010; XIONG; MCCAULEY; STEINHAUER, 2014).

Em humanos, as células epiteliais do aparelho respiratório são os principais alvos de infecção pelo IAV (SAMJI, 2009). Ainda nessa etapa, o vírion faz uma varredura adicional para que ocorra ligação de alta afinidade da HA no ácido siálico, levando a endocitose do vírion na célula alvo. Já a NA também presente no envelope viral auxilia na clivagem das ligações mais fracas entre HA e ácido siálico (SAKAI *et al.*, 2017).

Após a etapa inicial, já no endossomo, a HA passa por alterações conformacionais, devido ao pH ácido no local, permitindo a fusão do envelope viral a membrana do endossomo (SAMJI, 2009). Concomitantemente, a M2 também presente no envelope viral passa a bombear íons de hidrogênio para o core do vírion, o acidificando e permitindo a dissociação de M1 do complexo vRNP (RNA genômico viral, nucleoproteína e polimerases) (BUI; WHITTAKER; HELENIUS, 1996; MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Como resultado desses processos, há a liberação de vRNPs no citoplasma da célula, os quais são transportados do citoplasma para o núcleo da célula onde ocorrerá síntese de novas sequências de vRNPs com auxílio da maquinaria da célula hospedeira (EISFELD; NEUMANN; KAWAOKA, 2014).

Assim como todos os vírus com genomas de RNA de sentido negativo, o genoma do IAV tem duas funções: um como modelo para a síntese de RNAs mensageiros (mRNAs) e outro como modelo para a síntese de RNA intermediário replicativo de sentido positivo, que é o molde para a síntese de RNA genômico da progênie (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017).

Após essa transcrição, o mRNA sai do núcleo para o citoplasma onde é utilizado para sintetizar proteínas virais (tradução) (JORBA; COLOMA; ORTÍN, 2009;

REICH *et al.*, 2014). As proteínas recém traduzidas são importadas para o núcleo para interagir com o RNA e iniciar a replicação do genoma (HUET *et al.*, 2010). Em adição, polimerases do IAV no núcleo sintetizam RNA complementar senso positivo (cRNA) do qual é usado para aumentar o número de cópias de vRNAs senso negativo (YORK *et al.*, 2013). Então, as NPs se ligam aos vRNAs e cRNAs em combinação com a polimerase facilitando formação de novos vRNPs (MONDAL *et al.*, 2015).

Por último, as vRNPs são exportados do núcleo para o citoplasma para o início do empacotamento viral. As vRNPs são reunidas às demais proteínas virais, dentre as quais HA, NA e M2 são posicionadas na porção apical da membrana celular para que o brotamento do novo vírion ocorra (ROSSMAN; LAMB, 2011). Além disso, sinais de empacotamento específicos de RNA medeiam a incorporação seletiva de apenas uma cópia de cada fita de RNA em cada brotamento viral (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). O processo de brotamento viral ocorre com a ação da NA que cliva os resíduos de ácido siálico na superfície da célula do hospedeiro, liberando os novos vírions para o meio extracelular (COLMAN; VARGHESE; LAVER, 1983). A seguir há o simplificado esquema de replicação do IAV (Figura 3).

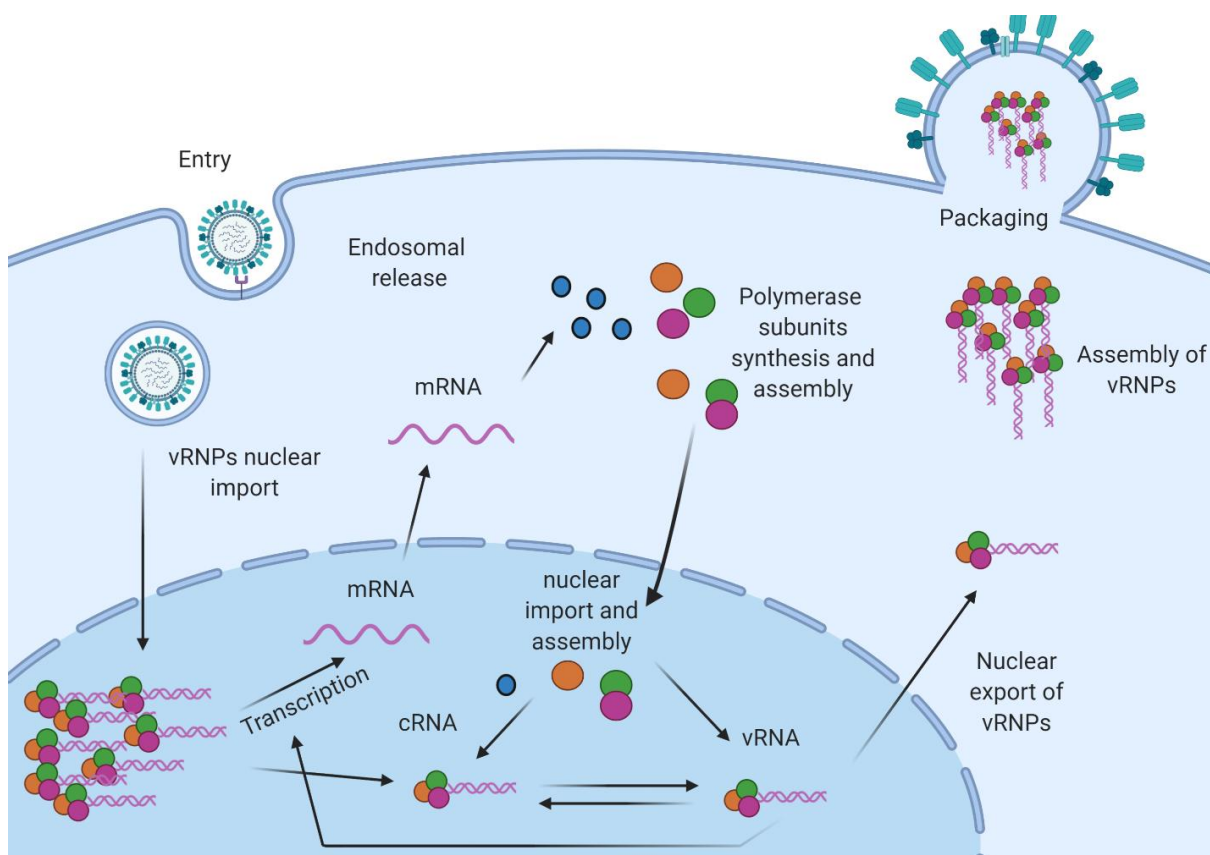


Figura 3: Ciclo de replicação do vírus Influenza A.

HA do IAV se liga ao ácido siálico da membrana da célula hospedeira. Ocorre a endocitose do vírion e também fusão do envelope viral com a membrana do endossomo permitindo a

liberação dos vRNPs no citoplasma. Os vRNPs são importados e transcritos no núcleo. O mRNA transcrito é exportado e traduzido em proteínas virais no citoplasma. As subunidades de polimerase recém-traduzidas são importadas para o núcleo. Os cRNAs originados dos vRNAs originais são utilizados como molde para produzir mais vRNAs. Após a formação e o acúmulo de vRNPs, eles são exportados para o citoplasma e se unem a outras proteínas virais na membrana plasmática. O brotamento viral é finalizado pela clivagem do ácido siálico pela NA. (Adaptado da tese de Juliana Del Sarto).

c) Transmissão e sintomas

A gripe humana foi descrita por Hipócrates há cerca de 2.400 anos. Pandemias ocorreram ao longo da história, e a pandemia de 1918 (durante a Primeira Guerra Mundial) causou um grande número de morte. O agente causador da doença foi reconhecido no final do século 19 como um vírus, mas não foi identificado como Influenza até 1955 (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Aves aquáticas, especialmente patos, aves limícolas e gaivotas, são apontadas como reservatórios essenciais da maioria dos subtipos de IAV (WEBSTER, 1997). Os IAVs se replicam no epitélio intestinal e respiratório superior dessas aves sem provocar doença e são eliminados em altas concentrações nas fezes e secreções orais (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017).

Dessa forma, os IAVs são transmitidos por aves aquáticas migratórias que carregam os vírus entre habitats de verão e inverno podendo alcançar diferentes continentes. As paradas para alimentação durante as migrações também são oportunidades para a disseminação dos vírus para populações de aves domésticas (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Infecções entre diferentes espécies ocorrem esporadicamente, como entre aves e mamíferos, incluindo porcos, cavalos, cães, visons, mamíferos marinhos e humanos. É importante ressaltar que os porcos são hospedeiros intermediários relevantes, devido as chances de transmissão para outros animais domésticos e principalmente humanos (HULSE-POST *et al.*, 2005; MORENS; TAUBENBERGER, 2010).

Entre a população humana, a via de transmissão é por fômites, do qual o IAV pode permanecer viável por até 2 dias, e aerossol formado durante uma tosse, espiro ou fala (CDC, C. FOR D. C. AND P.; NCIRD, 2018; KILLINGLEY; NGUYEN-VAN-TAM, 2013). Os sintomas após a infecção por IAV podem variar de acordo com o hospedeiro sendo desde uma doença fulminante até assintomática. O período de incubação viral é de 1 a 2 dias e a transmissão viral pode ocorrer um dia antes do surgimento de sintomas e até 5 a 7 dias depois (BEIGEL; BRAY, 2008; CDC, C. FOR D. C. AND P.; NCIRD, 2018).

Os sintomas que o indivíduo pode apresentar são febre, dor de cabeça, tosse não produtiva, mialgia, calafrios, mal estar, secreção nasal, dor de garganta e falta de apetite (IP *et al.*, 2016). Há também relatos de conjuntivite, lacrimejamento, fotofobia e dor ao movimentar dos olhos (PAULES; SUBBARAO, 2017). Os sintomas podem ser agravados para pneumonia, hipoxemia e leucopenia (BARKER; MULLOOLY, 1982). Indivíduos de qualquer faixa etária podem ser afetados por Influenza, porém os mais acometidos pelo agravamento do quadro clínico e até a morte são crianças abaixo de 5 anos e idosos acima de 75 anos (COX; SUBBARAO, 1999).

d) Epidemiologia

As pandemias ocasionam um elevado número de hospitalizações e mortes no mundo, e o genoma segmentado do IAV é fonte de diversidade que permite surgimento de novos subtipos de Influenza, que causam grandes epidemias ou pandemias, ao infectar um hospedeiro. Essa diversidade também se deve a pequenas derivações nos genes (*antigenic drift*) do Influenza A levando a outros subtipos que são muito próximos filogeneticamente entre si (CDC, C. FOR D. C. AND P.; NCIRD, 2019). Essas mutações pontuais que resultam em propriedades antigênicas semelhantes, como uma alteração de aminoácido dos epítomos das proteínas HA e NA, são mais fáceis serem reconhecidas e respondidas pelo sistema imune (ZAMBON, 1999). Há também o rearranjo gênico que leva a uma mudança mais expressiva na estrutura do material genético – *antigenic shift* (CHEN; DENG, 2009). Essas mudanças são maiores e podem ocorrer quando duas estirpes virais e origens diferentes infectam a mesma célula hospedeira. Assim, durante o empacotamento o rearranjo leva o surgimento de um novo vírion contendo segmentos genéticos de estirpes diferentes de Influenza e novas combinações das NA e HA inteiras (ex.: H3N2; H7N9, H1N1, etc.).

Esse *shift* ocorreu em 1918, resultando na maior pandemia de Influenza (vírus Influenza A H1N1) conhecida com 40 milhões de óbitos no mundo, e voltou a ocorrer em 2009 [vírus Influenza A(H1N1)pdm09], porém menos trágica do que 100 anos atrás (TAUBENBERGER, J.; MORENS, 2006). Durante esse meio tempo, outras importantes pandemias de influenza foram registradas, como em 1957 (vírus Influenza A H2N2), 1968 (vírus Influenza A H3N2) e 1977 (H1N1) também resultando em grande número de morte e acentuado prejuízo socioeconômico (WEBBY; WEBSTER, 2003).

Atualmente, o Influenza A(H1N1)pdm09 da pandemia de 2009, não mais classificado como pandêmico, continua a circular no mundo como outros subtipos epidêmicos.

Estima-se que a gripe cause de 3 à 5 milhões de casos graves no mundo e que ocasione 290 à 650 mil mortes anuais relacionadas a Influenza sazonal (IULIANO *et al.*, 2018). Durante as epidemias e pandemias provocadas por Influenza A, 25-56% das mortes tem envolvimento de uma segunda infecção bacteriana após a gripe (MCCULLERS, 2013; MORENS; TAUBENBERGER; FAUCI, 2008). Não somente *Streptococcus pneumoniae* como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Haemophilus influenzae* são as principais bactérias responsáveis pela segunda infecção após a gripe (GRABOWSKA *et al.*, 2006). Esta pneumonia pneumocócica após a gripe é grave e resultante de modificações no hospedeiro provocado pelo vírus Influenza (VAN DER SLUIJS *et al.*, 2010).

e) Resposta imunológica frente ao vírus Influenza A

O aparelho respiratório possui diferentes mecanismos de defesa contra patógenos que ali invadem. Sendo um desses, a produção de moléculas solúveis pelo sistema imune inato capazes de inibir a infecção por patógenos, como o vírus Influenza. Os inibidores γ [como as mucinas, pentraxinas e proteína surfactante A (SP-A)], apresentam ácidos sálicos que competem pelo sítio de ligação da hemaglutinina e impede que o vírus se ligue à célula hospedeira (TRIPATHI; WHITE; HARTSHORN, 2015). Os β -inibidores [colectinas e proteína surfactante D (SP-D)] se ligam a porções glicosiladas dos vírus Influenza, impedindo a entrada do vírus na célula e consequentemente favorecendo o *clearance* viral (HILLAIRES *et al.*, 2013). Já os peptídeos antimicrobianos (defensinas e catelicidinas) agem na neutralização das partículas virais e modulação das células do sistema imune (TRIPATHI; WHITE; HARTSHORN, 2015). Assim, os diferentes mediadores solúveis do sistema inato representam uma das primeiras barreiras contra a infecção. Após a replicação viral no epitélio pulmonar, alguns subtipos de vírus podem infectar macrófagos alveolares. Nessas células, normalmente, não ocorre a formação de novos vírions, mas o fato é importante para o início da inflamação (TRAVANTY *et al.*, 2015; VAN RIEL *et al.*, 2011).

A infecção por Influenza é escrita pelo aumento da permeabilidade vascular pulmonar, acúmulo de fluido proteico nas vias aéreas (edema) e morte das células epiteliais alveolares, levando a perda ou redução da capacidade respiratória dos

indivíduos acometidos pela doença (RÖSLER; HEROLD, 2016). Durante esse período há também o reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) ou ao dano (DAMPs) por meio de PRRs do sistema imune, como receptores do tipo Toll (TLRs), do tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo gene induzido por ácido retinóico I (RIG-I) (PIZZOLLA *et al.*, 2017). Os TLR7 e TLR8 endossomais reconhecem as fitas simples do RNA, enquanto os TLR3 reconhecem intermediários de RNA de fita dupla, resultante das etapas de replicação viral (GUILLOT *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2008). Após a replicação do genoma viral, o RIG-I reconhece RNAs virais de fita simples contendo trifosfatos na região 5' (REHWINKEL *et al.*, 2010). Além dos receptores TLRs e RIG-I, os receptores do tipo NOD (NLRP3 – *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*) também são ativados durante a infecção pelos vírus Influenza e levam a produção das citocinas IL-1 β , IL-18 e IL-33. A ativação desse receptor pode levar a liberação de componentes do lisossomo no citoplasma gerando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou alterações no pH intracelular causadas pela proteína M2 do vírus (ALLEN *et al.*, 2009; ICHINOHE; PANG; IWASAKI, 2010).

Além disso, outras moléculas também são produzidas durante o processo inflamatório, como TNF- α , IL-6, IL-12, IFN do tipo I, II e III, CCL-2, CCL-5, CCL-3, CCL-4, CXCL-10 e CXCL-8 (JULKUNEN *et al.*, 2001) com consequente recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o tecido pulmonar. Os IFN do tipo I (IFN- α e IFN- β) e tipo III (IFN- λ) têm importante função antiviral inato. O IFN- λ é produzido principalmente por células epiteliais e células dendríticas plasmocitóides, mas induz uma sinalização semelhante a IFN- α/β (LOPUŠNÁ *et al.*, 2013). Já os IFN- α e IFN- β se ligam aos seus receptores e ativam a cascata de sinalização levando a transcrição dos ISGs e resultando na tradução de proteínas antivirais que interferem nas diferentes etapas da replicação viral (SCHNEIDER; CHEVILLOTTE; RICE, 2014; STAEHEL *et al.*, 1986). Os IFN do tipo I não só têm papel importante na produção de proteínas antivirais, mas agem estimulando a atividade de outras células como as células NK (*Natural killers*), importantes no combate ao vírus (HWANG *et al.*, 2012). Quando as células NK reconhecem o vírus, ocorre a lise de células infectadas e aumenta a produção de IFN- γ , que ajuda na ativação de macrófagos e desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa posterior (KOHLMEIER; WOODLAND, 2009).

Não somente as células NK, mas os neutrófilos são encontrados em grande número nos pulmões e nos alvéolos nos primeiros dias após a infecção pelo vírus Influenza (KOHLMEIER; WOODLAND, 2009). De fato, os neutrófilos são umas das primeiras células recrutadas durante a etapa inicial da infecção por influenza A e contribuem para a eliminação viral, sobretudo por meio da fagocitose de células apoptóticas infectadas (FUJISAWA, 2001; HASHIMOTO, Y. *et al.*, 2007). A ativação dessas células pelos vírus influenza A, leva à produção de ROS, citocinas e maior expressão de moléculas de adesão que estimula o influxo de mais leucócitos para as vias aéreas (DAIGNEAULT *et al.*, 1992; HARTSHORN, K. L. *et al.*, 1990; HARTSHORN, K.; WHITE, 1999).

Todo esse processo contribui para a ativação do tecido epitelial e direcionam o avanço da resposta imune adaptativa. Os neutrófilos são importantes nesse desenvolvimento e são capazes de direcionar o recrutamento de linfócito T CD8+ para os pulmões, por meio da produção de um gradiente de CXCL12 (LIM *et al.*, 2015). Além disso, os neutrófilos podem funcionar como células apresentadoras de antígeno durante a infecção por influenza e carreadores virais, uma vez que alguns subtipos, principalmente os altamente virulentos, são capazes de infectar essas células (HUFFORD, M. M. *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2008). Já macrófagos alveolares têm sido apontados como células importantes na defesa e modulação da resposta imune contra o vírus Influenza (SUBRAMANIAM *et al.*, 2015). Em contrapartida, macrófagos recrutados para os pulmões (predominantemente M1) são células comumente associadas a uma resposta inflamatória exacerbada e intenso dano tecidual durante a infecção (LIN *et al.*, 2008). Uma resposta adaptativa eficiente e protetora contra uma infecção viral requer a ativação de linfócitos T e B.

Durante a ativação, por células dendríticas, os linfócitos T CD8+, ou linfócitos T citotóxicos produzem altos níveis de citocinas e quimiocinas que contribuem para o desenvolvimento da resposta inflamatória e combate do vírus por meio da eliminação de células epiteliais infectadas. A eliminação dessas células ocorre por meio da ativação de receptores indutores de apoptose na célula alvo (por exemplo, a ligação entre FasL e o receptor Fas) por meio da liberação de grânulos citotóxicos (perforina e granzima) e (HUFFORD, M. *et al.*, 2011; TOPHAM, D. J.; TRIPP; DOHERTY, 1997). Os linfócitos T CD4+, ou linfócitos T auxiliares, estão muito presentes nos pulmões durante o processo de eliminação viral produzindo uma grande variedade de citocinas tais como IFN- γ , IL-2, TNF- α e IL-10. Além disso, os linfócitos T CD4+ podem adquirir

funções citotóxicas (HUA *et al.*, 2013). Apesar dessa possibilidade, a principal contribuição dos linfócitos T CD4+ para a eliminação do vírus é por meio da produção de citocinas e indução de ativação dos linfócitos B que produzem anticorpos (TOPHAM, D.; DOHERTY, 1998).

Dentre os anticorpos produzidos, a maior parte se liga aos antígenos das proteínas de superfície viral, especialmente HA e NA. Anticorpos que se ligam a HA impedem a ligação desta proteína viral nas células do hospedeiro, neutralizando o vírus (IgM) e garantindo proteção imediata contra a infecção viral secundária (IgA e IgG). Anticorpos IgM e IgG, produzidos durante a infecção e ligados à células infectadas, podem ainda ativar o sistema do complemento e levar à morte dessas células (LOFANO *et al.*, 2015). Já anticorpos contra NA nem sempre são neutralizantes, mas limitam a disseminação viral, ao afetarem a atividade enzimática de NA (VAN DE SANDT; KREIJTZ; RIMMELZWAAN, 2012). Anticorpos não neutralizantes contra diferentes proteínas virais, tais como M1, M2 e NP podem promover eliminação viral quando há interação da sua porção Fc com os receptores de FC presentes nos fagócitos e células NK (HASHIMOTO, G.; WRIGHT; KARZON, 1983; JEGASKANDA *et al.*, 2013).

Outros importantes integrantes da resposta imune contra os IAV são os linfócitos T regulatórios possuem papel central no controle das respostas de linfócitos T CD4+ e CD8+ durante a infecção pelo IAV, evitando dano tecidual excessivo (SURLS *et al.*, 2010).

f) Profilaxia e tratamento

A profilaxia da infecção por Influenza se dá por medidas vacinais e não vacinais. As estratégias não vacinais englobam ter cuidados comportamentais e higiênicos como lavar as mãos com frequência, cobrir o nariz e a boca ao espirrar e tossir, não compartilhar talheres, copos e outros itens de uso pessoal, manter ambientes arejados, evitar aglomeração em momentos de maior incidência da infecção (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE, 2021). Assim como políticas de conscientização da população e programas de vacinação contra a gripe associadas são relevantes para a prevenção e controle da doença. Já as medidas vacinais são utilizadas durante os últimos 70 anos e apresentam alta segurança e baixo efeito adverso (HALSEY *et al.*, 2015).

Os principais modelos vacinais contra Influenza são à base de vírus inativado e vivo atenuado. As Vacinas do vírus Influenza Inativados pode ser composta pelo vírus inteiro inativado, vírus fragmentado purificado (*split*), virossomal (envolopes reconstituídos do vírus da gripe que consistem em HA, NA e fosfolipídios virais) ou subunidade dos antígenos virais (HA e NA), todos diferindo tanto na organização estrutural quanto nos componentes virais. Porém as mais utilizadas são *split* e subunidades virais. Já as Vacinas do vírus Influenza Vivo Atenuado são administrados por via intranasal e imita a infecção pelo Influenza, resultando em uma resposta imunológica localizada na mucosa no local da infecção (SOEMA *et al.*, 2015). A vacina de vírus vivo atenuado está disponível e é geneticamente estável, não-transmissível, segura e imunogênica. Os efeitos colaterais após aplicação dessa vacina pode ser congestão nasal, rinorréia, febre e dores musculares (NICHOL; TREANOR, 2006). Em adição, as vacinas contra Influenza (tanto inativado quanto atenuado) foram produzidas para proteger contra três vírus da Influenza sazonal diferentes (vacinas trivalentes). As vacinas trivalentes atuais contêm vírus influenza A (H3N2), pandêmico A (H1N1) e um (vacina trivalente) ou dois vírus da linhagem B (vacina quadrivalente).

Apesar da eficácia das vacinas contra Influenza, elas apresentam proteção limitada contra cepas emergentes devido a frequência das mutações e há incertezas quanto ao acerto nas escolhas dos subtipos virais que irão compor as vacinas. Com isso, as vacinas devem ser desenvolvidas anualmente de acordo com as cepas circulantes na temporada em questão (BELSHE, 2010; KESHAVARZ *et al.*, 2019).

Outras estratégias de tratamento, como as drogas antivirais, são utilizadas para reduzir a infecção por Influenza. As drogas antivirais são divididas em 3 grupos: inibidores do canal iônico M2, inibidores da neuraminidase (NA) e inibidores da polimerase viral. A M2 foi um dos primeiros alvos antivirais estudados, o que levou ao desenvolvimento dos antivirais Amantadina e Ribamantadina. O mecanismo dos inibidores da M2 é o bloqueio da acidificação do core do vírion dificultando as etapas de replicação viral (PINTO; LAMB, 2006). A NA é outro alvo importante para a ação de drogas anti-Influenza, visto que é uma proteína é muito conservada dentre os subtipos de influenza A e B. Então, os inibidores da NA impedem a atuação de sialidase bloqueando a liberação de novos vírions da célula infectada. Esses antivirais são Zanamivir, Oseltamivir (Tamiflu®), Peramivir e Laninamivir e amplamente utilizados na clínica humana (LOREGIAN *et al.*, 2014). Os inibidores das polimerases virais são drogas que inibem a replicação e transcrição do material genético viral e

atuam nas proteínas PB2 e NP. Atualmente, os inibidores das polimerases virais como o nucleozin, naproxeno, RK424 (inibidores da NP) e VX-787 (inibidores da PB2) estão em fase de estudos pré-clínicos com resultados promissores (THORLUND *et al.*, 2011).

1.2.2 *Streptococcus pneumoniae*

1.2.2.1 Propriedades bacterianas

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) são bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas, capnófilas (que necessitam de atmosfera rica em CO₂), fastidiosas e extracelulares que colonizam o aparelho respiratório humano. Essa espécie é o principal agente etiológico das pneumonias adquiridas na comunidade (PACs), além de ser a causa mais frequente de pneumonia grave e mortes por pneumonia no mundo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; SONG; NAHM; MOSELEY, 2013).

S. pneumoniae são caracterizadas morfológicamente como cocos lanceolados medindo de 0,5 e 1,2 µm de diâmetro e com crescimento aos pares (diplococos) ou formando cadeias curtas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Quando cultivadas em ágar sangue, *S. pneumoniae* apresentam colônias com um halo esverdeado, devido a formação de bilirrubina e biliverdina, após realizar hemólise parcial do sangue (α hemólise). As colônias são arredondadas, podendo ser lisas ou mucóides e transparentes ou opacas (TUOMANEN, 1999).

As bactérias possuem polissacarídeos capsulares, principal fator de virulência, que funcionam como mecanismo de escape do sistema imune ao inibir fagocitose, impedir ligação de fragmentos do sistema do complemento e proteger contra armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (ABEYTA; HARDY; YOTHER, 2003; HYAMS *et al.*, 2010; WARTHA *et al.*, 2007). Em adição, a composição dos polissacarídeos capsulares define os 100 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae* (CDC, N. C. FOR I. AND R. D., 2020; CROUCHER *et al.*, 2015).

Além da cápsula bacteriana, *S. pneumoniae* possui outros fatores de virulência que permitem a sua eficiente adesão ao trato respiratório e que também contribuem para a evasão do sistema imune do hospedeiro, como as pneumolisinas (PLY) que inibem batimento ciliar das células epiteliais; neuroaminidases (NanA, NanB e NanC) que auxiliam no processo de adesão bacteriana; proteína de superfície pneumocócica A (PspA) que impede opsonização por C3; proteína de superfície pneumocócica C

(PspC) viabiliza translocação do pneumococo pelo epitélio; antígeno de superfície pneumocócica A (PsaA) que confere resistência pneumocócica ao estresse oxidativo; proteínas ligantes de colina (Cbbs) e pili (MITCHELL; MITCHELL, 2010) (Figura 4). Dessa forma, a resposta imune do hospedeiro pode não conseguir impedir a proliferação bacteriana, resultando em intenso dano tecidual e predisposição da invasão de *S. pneumoniae* à outros tecidos (FELDMAN; ANDERSON, 2009).

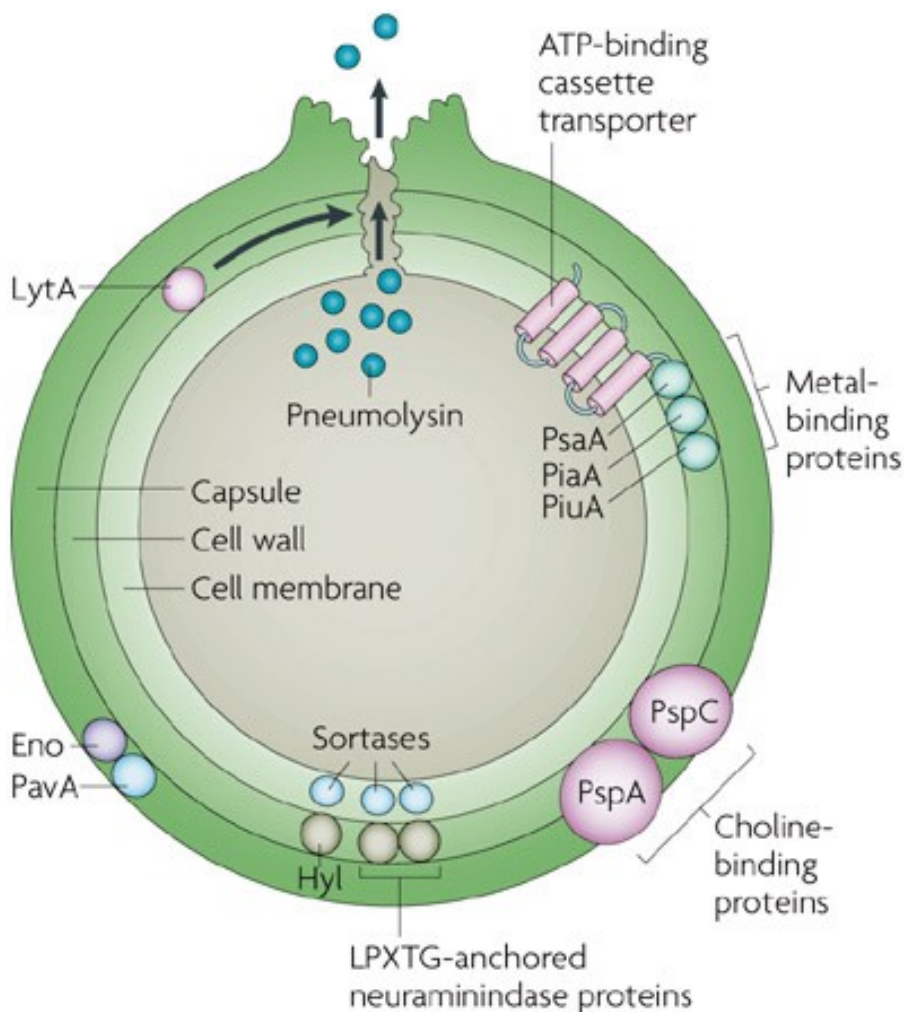


Figura 4: Fatores de virulência de *S. pneumoniae*.

A cápsula pneumocócica, proteínas de superfície A e C (PspA e PspC), neuroaminidase ancorada a LPXTG, hialuronato liase, adesão e virulência pneumocócica A (PavA), enolase (Eno), pneumolisina (PLY), autolisina (LytA) e proteínas pneumocócicas de ligação a metal – antígeno de superfície A (PsaA), aquisição de ferro A (PiaA) e captação de ferro A (PiuA) estão entre os principais fatores de virulência. Adaptado de (KADIOGLU *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Infecção, transmissão e sintomas

S. pneumoniae, patógeno oportunista comensal da microbiota do trato respiratório superior do aparelho respiratório humano, principalmente da nasofaringe, tem prevalência entre 5 e 90% das pessoas saudáveis (CDC, N. C. FOR I. AND R. D.,

2020; DONKOR, 2013). A transmissão pode acontecer por meio de partículas no ar ou contato com gotículas de saliva ou secreção das vias aéreas de pessoas que portam *S. pneumoniae* (DONKOR, 2013). Após a transmissão, *S. pneumoniae* coloniza a região nasofaríngea e pode levar a infecções no trato respiratório inferior, no ouvido médio ou meninges, decorrentes do desbalanço do sistema imune do hospedeiro ou quebra de barreiras epiteliais (WEISER; FERREIRA; PATON, 2018) (Figura 5).

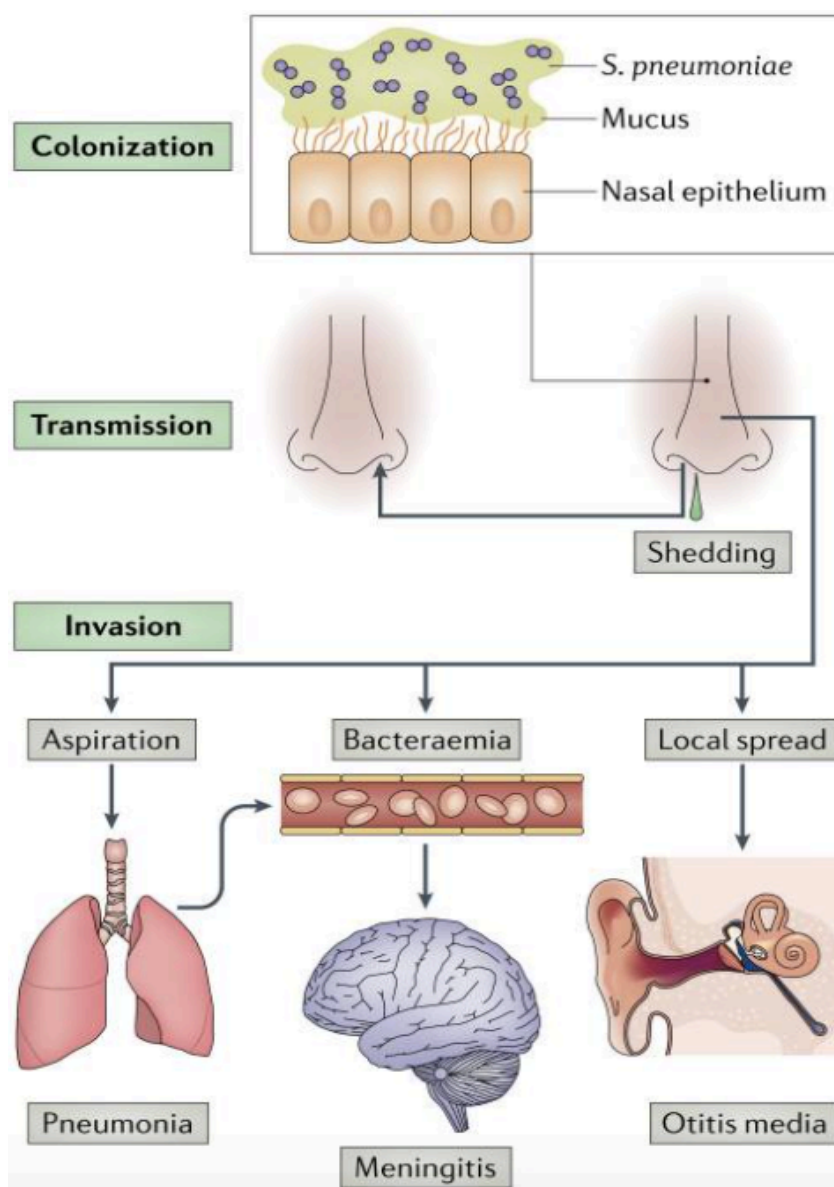


Figura 5: Ciclo de infecção por *S. pneumoniae* e progressão da doença.

Colonização da mucosa do trato respiratório superior, mais especificamente nasofaringe, do aparelho respiratório por *S. pneumoniae* com consequente transmissão por secreções nasais e invasão para outros órgãos por aspiração, bacteremia e disseminação local desencadeando doença pneumocócica. Adaptado de (WEISER; FERREIRA; PATON, 2018).

Mesmo *S. pneumoniae* sendo causadora de muitas doenças, ela é a principal bactéria que provoca pneumonia e é a doença mais frequente entre os infectados. No trato respiratório inferior do pulmão, PsaA pneumocócica se liga a carboidratos N-acetil-glicosamina da superfície das células epiteliais do hospedeiro. Porém, frequentemente esta colonização não é seguida de invasão, infecção e desenvolvimento de pneumonia. Para o desenvolvimento da doença é preciso ter produção local de mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-1 consequente da colonização da própria bactéria ou de outra infecção relacionada, como pelo vírus Influenza A (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004).

Há também outras ligações que contribuem para o desenvolvimento da doença, como as fosforilcolinas (ChoP) da parede celular pneumocócica que se ligam a receptores nas células epiteliais e no endotélio que são aumentados no local da inflamação. As proteínas ligantes de colina A (CbpA) que se ligam com afinidade aos ácidos siálicos das células do hospedeiro e contribuem para a maior adesão e invasividade do pneumococo. Em uma próxima etapa, *S. pneumoniae* pode ser internalizada pelas células do hospedeiro por via dependente de β -arrestina e após a internalização, há a migração pelo epitélio respiratório e endotélio vascular (RADIN *et al.*, 2005). Dessa forma *S. pneumoniae* desencadeia pneumonia e pode chegar na corrente sanguínea e ser disseminado para outros tecidos provocando doenças pneumocócicas invasivas.

O desenvolvimento das doenças pneumocócicas invasivas está relacionado as infecções pelos distintos sorotipos de pneumococos. Os sorotipos 3, 19A e 19F, por exemplo, são comumente associados ao maior risco de desenvolvimento de insuficiência respiratória (BURGOS *et al.*, 2014). O sorotipo 3 também relacionado à maior incidência de choque séptico e pneumonia pneumocócica necrotizante (AHL *et al.*, 2013; BENDER *et al.*, 2008).

O período de incubação da pneumonia pneumocócica é cerca de 1 a 3 dias e os sintomas incluem febre e calafrios não repetidos, dor no peito pleurítica, tosse produtiva e mucopurulenta, expectoração com cor enferrujada, falta de ar, respiração acelerada, taquicardia, hipóxia e mal-estar ou fraqueza (NCIRD; CDC, 2020).

1.2.2.3 Epidemiologia

A maioria dos sorotipos de *S. pneumoniae* pode causar doenças, mas apenas uma minoria destes sorotipos causam infecções pneumocócicas (CDC, N. C. FOR I.

AND R. D., 2020). As características sociais da população, região geográfica e faixa etária determinam a distribuição e frequência dos diferentes sorotipos e desenvolvimento da doença pneumocócica (SCOTT *et al.*, 1996).

Crianças de até 5 anos de idade possuem maior taxa de colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae* e decresce até alcançar taxas inferiores a 10% em adultos (DONKOR, 2013). A pneumonia pneumocócica é causada pela infecção que mais mata crianças no mundo, representando 15% das mortes em crianças menores de 5 anos. No ano de 2019, o número de morte causada por pneumonia em crianças estimado pela Organização Mundial da Saúde foi 808.694 (WHO, 2019).

Não somente a idade, mas também o índice de desenvolvimento de cada país ou região está relacionado a taxa de colonização. Em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como Gâmbia e Brasil, a taxa de colonização nasofaríngea atinge 60 a 80% das crianças (DONKOR, 2013; REIS *et al.*, 2008). Já países desenvolvidos, como a Inglaterra, a taxa de prevalência atinge 45 a 52% das crianças (HUSSAIN *et al.*, 2005). Em idosos a taxa de prevalência chega a ser quatro vezes maior que em jovens e adultos, além do maior risco de hospitalização e morte devido à infecção (STUPKA *et al.*, 2009). Apesar de diversos microrganismos como fungos, vírus e bactérias serem capazes de causar pneumonia, *S. pneumoniae* é o principal agente etiológico dessa patologia e é responsável por 36% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade por adultos (CDC, C. FOR D. C. AND P., 2021). Além disso, em 2015, das 3,2 milhões de mortes causadas por infecções no trato respiratório inferior, 55,4% foram associadas a pneumonia pneumocócica (TROEGER *et al.*, 2017). No Brasil, entre o período de 2000 e 2008, houve 7.129.291 internações por pneumonias que resultou em uma frequência média anual de 2100 internações por 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Isto possui uma relação direta com o grande custo econômico em saúde para o país.

1.2.2.4 Resposta imunológica frente a *Streptococcus pneumoniae*

Durante o processo da infecção por *S. pneumoniae*, a interação das bactérias com as células epiteliais da orofaringe é mediada por adesinas proteicas de superfície (PavA). Para que a infecção seja instalada, é essencial que a bactéria produza protease IgA (slgA) e PLY. A ação de slgA viabiliza a evasão da mucosa clivando a ligação entre as bactérias e as mucinas das células hospedeiras e PLY então facilita

a translocação bacteriana ao produzir poros na célula hospedeira (LAWRENCE *et al.*, 2015).

Após a evasão e ao atingir o trato respiratório inferior, as bactérias são reconhecidas por macrófagos alveolares e posteriormente por neutrófilos, os quais desencadeiam respostas imunológicas contra o patógeno. Os macrófagos alveolares são as primeiras células de combate à infecção e com a ajuda do sistema do complemento, eles são responsáveis por fagocitar e eliminar as bactérias. Mesmo o sistema do complemento apresentando variações na eficácia de sua atividade, ele é fundamental para a opsonização e consequente fagocitose bacteriana (HYAMS *et al.*, 2010). Estudos realizados em camundongos mostram que as três vias do sistema do complemento (clássica, alternativa e lectinas) são importantes no reconhecimento e opsonização do patógeno (BROWN; HAMMERSCHMIDT; ORIHUELA, 2015). Todas as vias do complemento resultam em liberação de fragmentos C5a e C3a que recrutam e ativam leucócitos, auxiliam na opsonização e aumentam a capacidade de reconhecimento bacteriano por fagócitos de eliminarem a bactéria por lise osmótica através da formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Concomitantemente a ação do sistema do complemento, *S. pneumoniae* é também reconhecido pelos PRRs da imunidade inata, presentes não somente nos leucócitos, mas também nas células epiteliais. Na resposta contra *S. pneumoniae*, os principais PRRs envolvidos são os receptores TLR2, TLR9, TLR4, NOD2 e NLRP3 (KOPPE; SUTTORP; OPITZ, 2012). O TLR2 reconhece ácido lipoteicoico e lipoproteínas, o TLR9 reconhece DNA bacteriano contendo CpG não metilado e o TLR4 reconhece a PLY (TOMLINSON *et al.*, 2014). Além disso, a ativação do TLR4 também reduz a carga bacteriana, por meio do reconhecimento de PLY com consequente produção de citocinas e quimiocinas (IL-6, IL-1 β e CXCL1) e recrutamento de neutrófilos (KOPPE; SUTTORP; OPITZ, 2012). TLR2 participa na eliminação bacteriana em estágios mais avançados da infecção e também ativa a produção de mediadores pró-inflamatórios, os quais podem danificar a integridade da barreira epitelial permitindo a translocação bacteriana. Tal receptor também está envolvido no recrutamento de neutrófilos e produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CXCL2 (TOMLINSON *et al.*, 2014). TLR9 é importante para habilidade dos macrófagos alveolares de fagocitarem e matarem as bactérias (ALBIGER *et al.*, 2007).

Os NLRs são outro grupo de receptores envolvidos no reconhecimento de *S. pneumoniae*, como NOD2 e NLRP3. O NOD2 reconhece fragmentos de peptidoglicano, os quais são apresentados após a fagocitose da bactéria por macrófagos. Após o reconhecimento dos fragmentos, ocorre a ativação de NF- κ B e a indução da produção de CCL-2, resultando no recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção. Além disso, o reconhecimento da PLY pelo inflamassoma e do peptidoglicano pelo NOD2 resultam na resposta inflamatória com produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por leucócitos contribuindo para a eliminação bacteriana (TOMLINSON *et al.*, 2014). O NLRP3 reconhece PLY e DNA bacteriano e induz a produção de IL-1 β /IL-18 por macrófagos e células dendríticas (KOPPE; SUTTORP; OPITZ, 2012).

Após o reconhecimento do DNA bacteriano há produção do IFN do tipo I que regula produção de CCL-5 de maneira autócrina, nos macrófagos infectados, e de maneira parácrina, nas células vizinhas, resultando no recrutamento de linfócitos T (KOPPE *et al.*, 2012). Além dos linfócitos T, neutrófilos e macrófagos também são recrutados por meio da produção e liberação de quimiocinas, como CXCL9 e CXCL10, porém estas são induzidas pela produção de IFN do tipo III e estão associadas ao dano agudo pulmonar causado pelo intenso recrutamento de leucócitos (SEYOUM; YANO; PIROFSKI, 2011).

Em adição, a ativação de PRRs e a produção de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para migração de leucócitos para os pulmões. Quando os macrófagos alveolares não são capazes para controlar a replicação bacteriana a ponto de impedir a infecção do tecido (CAMBERLEIN *et al.*, 2015). Os neutrófilos passam a ser recrutados por quimiocinas produzidas no local da infecção e se tornam as células responsáveis pelo controle da infecção por *S. pneumoniae*. Esse controle se dá por meio da produção de proteases, moléculas antimicrobianas, e NETs (CRAIG *et al.*, 2009). Apesar de NET contribuir para a morte de diversos patógenos, a sua presença prolongada pode danificar o tecido infectado (PECHOUS, 2017). Além disso, os neutrófilos quando em contato com *S. pneumoniae* produzem ROS, na tentativa de eliminar o patógeno, porém, devido à resistência do patógeno à este mecanismo de morte, ROS se torna mais importante no contexto de dano tecidual (MARRIOTT *et al.*, 2007; YESILKAYA *et al.*, 2013).

De forma mais tardia, linfócitos T migram para o pulmão na tentativa de controlar a proliferação de *S. pneumoniae* no tecido produzindo citocinas pró-inflamatórias com atividade antibacteriana, como IFN- γ (HIRST *et al.*, 2004). Durante

a resolução da infecção e eliminação bacteriana, linfócitos T regulatórios são recrutadas e produzem IL-10, tais citocinas contribuem na regulação da resposta imune exacerbada (KHAN *et al.*, 2002; NEILL *et al.*, 2012; VAN DER POLL *et al.*, 1996).

Portanto, a resposta inflamatória na pneumonia pneumocócica é, de maneira geral, aguda e composta principalmente por componentes do sistema imune inato. Sabendo da rapidez da resposta e a exacerbação da mesma quando há descontrole da proliferação bacteriana, a mesma então apresenta um papel dual. Sendo ela essencial para o controle da infecção e eliminação pneumocócica. Em contrapartida, se ocorrer a inflamação exacerbada, o acúmulo de leucócitos no pulmão prejudica o controle da infecção e aumenta dano tecidual, o que pode resultar em sepse e morte do indivíduo acometido

1.2.2.5 Profilaxia e tratamento

O desenvolvimento de vacinas contra *S. pneumoniae* se iniciou logo após o seu isolamento e identificação em 1911. Porém apenas em 1977 surgiu a primeira vacina anti-pneumocócica (AUSTRIAN, 1999). Atualmente existem quatro vacinas (PCV7, PCV10, PCV13 e Pneumovax23®) disponíveis para uso. Elas são compostas por polissacarídeos capsulares da bactéria associados ou não a adjuvantes (FDA, 2017).

A vacina polissacarídica conjugada heptavalente PCV (PCV7), autorizada desde o ano 2000, é capaz de provocar produção adequada de anticorpos específicos em crianças e adultos contra sete sorotipos distintos de *S. pneumoniae*, sendo os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugadas a proteína carreadora CRM197TM - mutante da toxina diftérica (MOFFITT; MALLEY, 2011; POEHLING *et al.*, 2006). Já a vacina conjugada deca valente (PCV10) é formulada com antígenos capsulares de 8 sorotipos conjugados à proteína D de *Haemophilus influenzae* e 2 sorotipos conjugados à carreadores de toxóide diftérico e de toxóide tetânico. A trideca valente (PCV13) possui antígenos capsulares de 13 sorotipos diferentes e utiliza a mesma estratégia da PCV7: conjugar antígenos capsulares à proteína da toxina diftérica mutada (FARKOUH *et al.*, 2014). A vacina com maior cobertura, atualmente, é a Pneumovax®23 que se baseia em polissacarídeos de 23 sorotipos diferentes (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F) (PITTET; POSFAY-BARBE, 2012).

O tratamento contra *S. pneumoniae* é empírico e associado a antibiótico, de maneira a reduzir a chance de óbito. Para um tratamento mais assertivo, deve ser analisado as condições epidemiológicas regionais a fim de determinar o antibiótico ideal para as regiões de grande prevalência de bactérias resistentes (BRANDILEONE *et al.*, 2006). Indivíduos acometidos por PAC moderada que não necessitam de internação, o tratamento indicado é amoxicilina oral. Quando a gravidade é elevada ocorre tratamento endovenoso com algum macrolídeo, como clindamicina (CORRÊA *et al.*, 2009). Além disso, em casos de cepas resistentes, o tratamento é uma combinação de macrolídeo (azitromicina) com cefalosporina de terceira geração (cefotaxina ou ceftriaxona) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). As diretrizes do Brasil preconizam que pacientes em estado grave e com choque séptico que não respondam ao tratamento devem receber reposição volêmica adequada e podem receber corticosteroide sistêmico (CORRÊA *et al.*, 2009). As classes, doses e duração do antibiótico deve ser escolhida com cuidado dependendo da possibilidade de resistência de *S. pneumoniae* e de acordo com cada caso clínico.

No Brasil, a primeira cepa resistente à penicilina foi isolada e documentada em 1988 (DE SOUSA MARQUES *et al.*, 1988). Atualmente, cepas resistentes à penicilina, macrolídeos e fluoroquinolonas têm sido documentadas com uma maior frequência podendo representar até 15% dos pneumococos isolados (FULLER; MCGEER; LOW, 2005). Tratamento com antibiótico durante a infecção por *S. pneumoniae*, principalmente quando são infecções secundárias a gripe, nem sempre é eficaz (DOMÍNGUEZ-CHERIT *et al.*, 2009). Então com essa crescente resistência, a utilização de antibiótico pode desencadear um agravamento na resposta imune. Uma vez que antibióticos bacteriolíticos, como amoxicilina e ceftriaxona, lisam a parede bacteriana, aumentando a liberação PAMPs que são reconhecimentos por PRRs das células do hospedeiro resultam em maior acúmulo de neutrófilos e provocam maior dano pulmonar (KARLSTRÖM *et al.*, 2011). Por outro lado, antibióticos bacteriostáticos, como macrolídeos, podem reduzir a carga bacteriana sem alterar a migração de neutrófilos (GHONEIM; MCCULLERS, 2014). Mesmo após o tratamento e a eliminação no patógeno durante pneumonia grave e inflamação exacerbada, os indivíduos acometidos podem vir a óbito da mesma maneira que os indivíduos gravemente acometidos e não tratados com antibiótico (CALBO; GARAU, 2010).

Neste contexto, moléculas pró-resolutivos têm chamado atenção para sua utilização como imunomoduladores. Uma vez que estes mediadores são produzidos

de maneira endógena, os efeitos colaterais associados à sua administração tendem a ser menores. Além disso, os mediadores pró-resolutivos controlam a inflamação, promovem o reparo tecidual e a eliminação de patógenos (BASIL; LEVY, 2016).

1.3 Resposta inflamatória durante as infecções do trato respiratório inferior

A inflamação é uma resposta vital do sistema imune após um dano tecidual de origem infecciosa ou estéril e tem a função fisiológica de restaurar a homeostase do tecido (SUGIMOTO *et al.*, 2016). Em adição, a inflamação, iniciada após a detecção do patógeno, é marcada por eventos micro e macroscópicos como alterações angiogênicas, liberação de mediadores pró-inflamatórios, recrutamento e acúmulo de leucócitos no local da lesão (GILROY; DE MAEYER, 2015). Esses eventos levam a manifestação dos sinais cardinais da inflamação tecidual – calor (calor, associado ao aumento do aporte sanguíneo local), rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), tumor (inchaço ou edema, causado pelo aumento da permeabilidade da microvasculatura e extravasamento proteico para o espaço intersticial), dolor (dor, devido a produção de mediadores pró-inflamatórios e compressão de fibras nervosas) e *functio laesa* (perda da função, do órgão ou tecido envolvido) (BASIL; LEVY, 2016).

No pulmão, é comum a resposta inflamatória provocada pelas infecções ser autolimitada controlando o patógeno, reduzindo recrutamento de neutrófilos, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a apoptose, produzindo mediadores pró-resolutivos para o retorno à homeostase com menor dano tecidual (LEVY; SERHAN, 2014). Porém a exacerbação da inflamação no pulmão após a infecção está associada a gravidade da lesão tecidual e dos sintomas que contribuem para um pior prognóstico do indivíduo acometido (DRIVER, 2012). Da mesma maneira acontece com as infecções provocadas por IAV, *S. pneumoniae* ou até mesmo infecção pneumocócica após a gripe.

Resposta inflamatória aguda provocada por esses microrganismos pode prejudicar fortemente a principal função do aparelho respiratório, troca gasosa por meio dos alvéolos, o que consequentemente comprometerá o bom funcionamento do organismo (LEVY; SERHAN, 2014). Essa perda de função pulmonar acompanhada do rompimento da parede epitelial, ocorre devido ao acúmulo de exsudado fibrinoso, intenso influxo de neutrófilos e tempestade de citocinas pró-inflamatórias nos alvéolos (DRIVER, 2012). Então a resposta inflamatória deve ser autolimitada e focada na

eliminação dos microrganismos para que possibilite a resolução da inflamação e consequentemente retorno à homeostase pulmonar.

A resolução da inflamação é um processo com biossíntese de mediadores ativos que atuam em alvos de receptores específicos para parar o recrutamento de neutrófilos, promover a apoptose, e ativar a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos (eferocitose), levando a reprogramação de macrófagos de função pró-inflamatória para pró-resolutiva, a eliminação viral, bacteriano e de debris celulares e por fim, restauração da função fisiológica do pulmão (Figura 6) (LEVY; SERHAN, 2014; SUGIMOTO *et al.*, 2016).

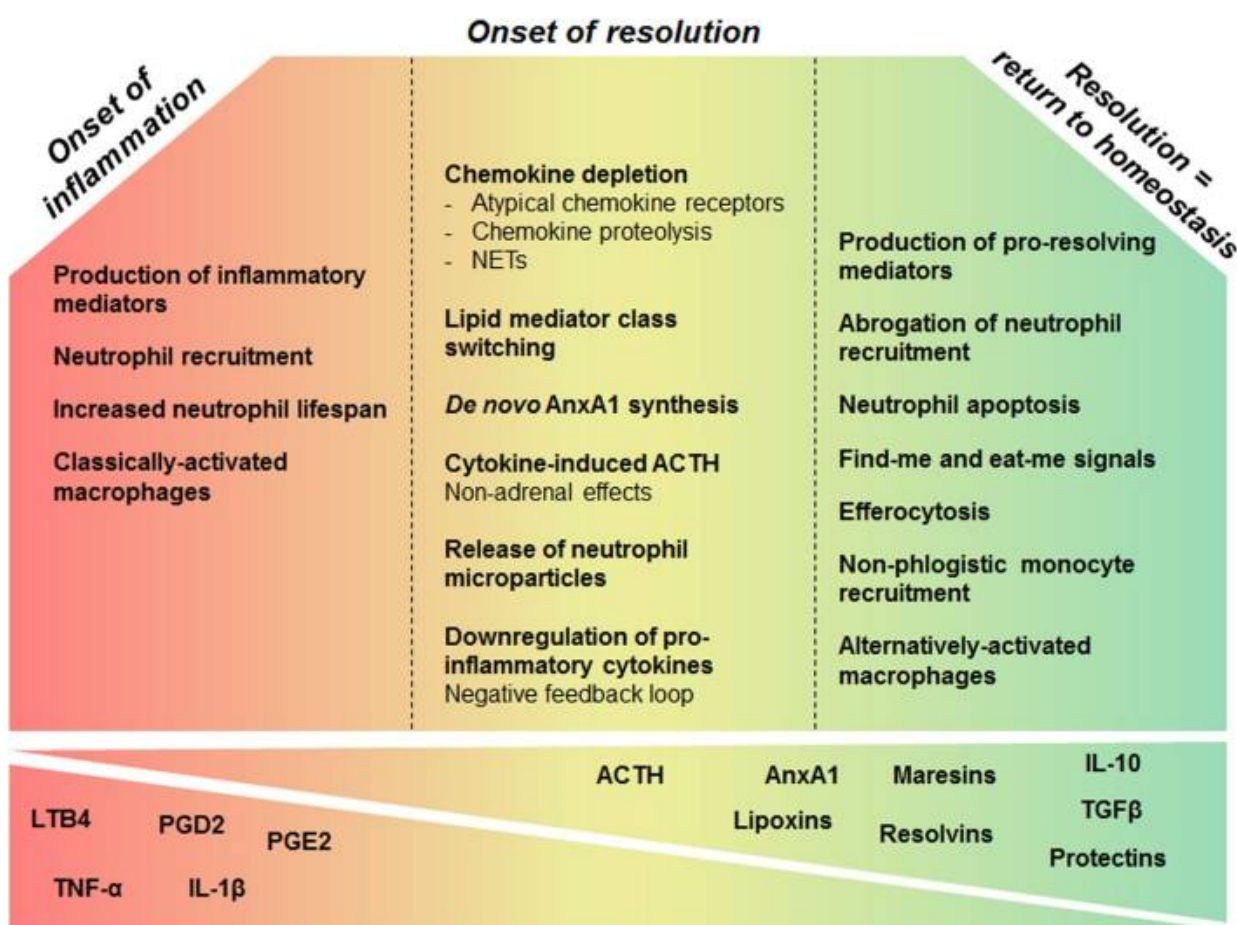


Figura 6: Resumo dos processos celulares e moleculares que regem a inflamação e sua resolução após contato com patógeno.

Adaptado de (SUGIMOTO *et al.*, 2016).

1.4 Angiotensina-(1-7) e receptor Mas

O sistema renina-angiotensina (SRA) é composto por proteínas e hormônios peptídicos que desempenham um importante papel biológico central no equilíbrio hidroeletrólítico e da pressão arterial (TAN *et al.*, 2018). Além disso, a ativação do SRA está diretamente ligada à fisiopatologias no pulmão como a fibrose pulmonar e

asma (MAGALHAES *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2018). Entre seus peptídeos biologicamente ativos, destacam-se a Angiotensina II (Ang II) e a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] por exercerem funções muitas vezes antagônicas (MACHADO, R. D. P.; SANTOS; ANDRADE, 1999).

Ang-(1-7) produto de hidrólise proteolítica sequencial por diferentes vias como, a partir da clivagem feita pela enzima renina no Angiotensinogênio levando a formação da Angiotensina I (Ang I) sequencialmente clivada por endopeptidases; clivagem de Ang I à Ang II pelas enzimas conversora de angiotensina (ECA) e ECA2 respectivamente; e clivagem de Ang I à Ang-(1-9) pelas enzimas ECA2 e ECA/endopeptidases respectivamente (BELOVA, 2000; SANTOS, RA *et al.*, 2005) (Figura 7).

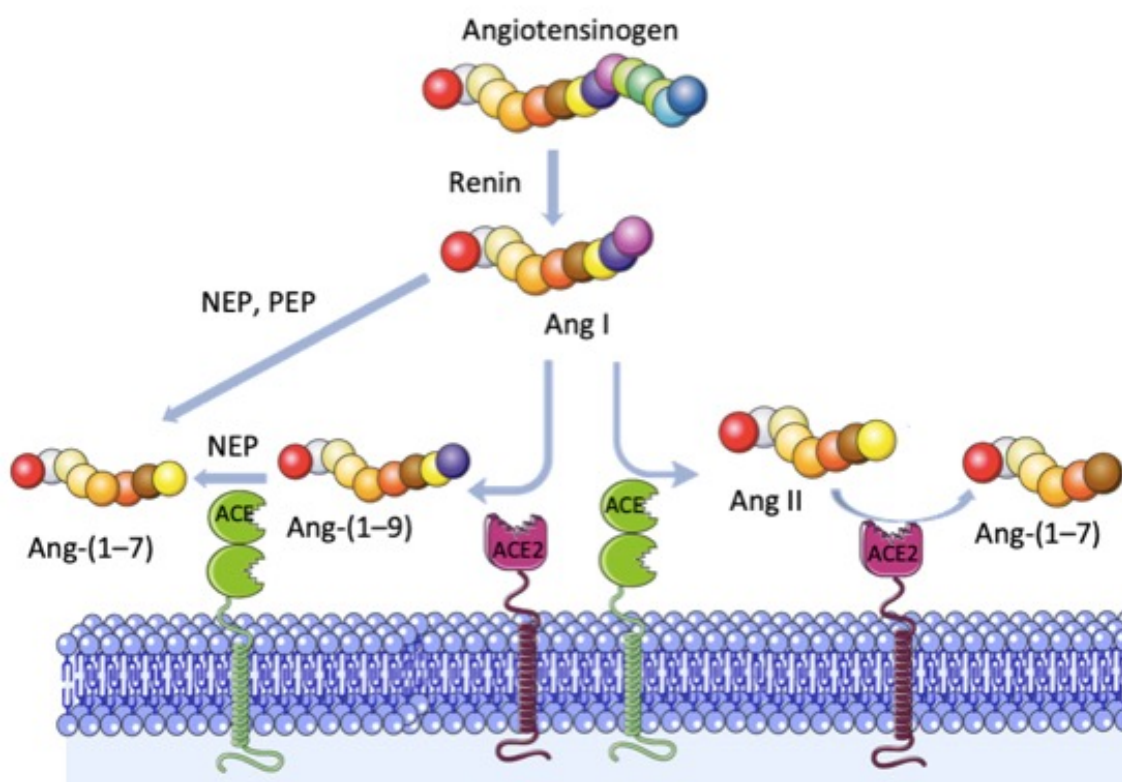


Figura 7: Cascata do sistema renina-angiotensina.

Hidrólise proteolítica do Angiotensinogênio pela enzima renina; de Angiotensina I (Ang I) por endopeptidases neutra (NEP) e prolil endopeptidase (PEP); de Ang I pela enzima conversora de angiotensina (ECA) e ECA2; de Angiotensina II pela ECA2; de Ang-(1-9) por ECA e endopeptidase neutra (NEP). Adaptado de (PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015).

O SRA já é visto como um sistema de dupla função: o aumento da relação da atividade ECA/ECA2 levará a um aumento de Ang II e aumento do catabolismo da Ang-(1-7), favorecendo os efeitos pró-hipertensivos, pró-inflamatórios e pró-fibrótico.

Quando é uma ação oposta, reduzirá a Ang II e aumentará os níveis de Ang-(1-7), levando aos efeitos anti-hipertensivos, anti-inflamatórios e anti-fibróticos atenuando o remodelamento inadequado em diferentes fisiopatologias (SAMPAIO *et al.*, 2007; SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2018).

Ang II exerce suas ações principalmente via receptor AT₁R e além do papel na regulação arterial, ela está relacionada a disfunção endotelial, aterosclerose e doenças pulmonares (GEISTERFER; PEACH; OWENS, 1988; KIM *et al.*, 2000; MILLAR *et al.*, 1994). Em contrapartida na via de Ang-(1-7) exercendo suas funções pelo receptor Mas (MasR) acoplado a proteína G leva a efeitos cardiovasculares, hepáticos, renais e pulmonares benéficos relevantes (SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2018). No pulmão, Ang-(1-7) atua diminuindo hiperresponsividade nas vias aéreas, melhora oxigenação e diminui infiltrado inflamatório na síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), atenua remodelamento pulmonar na asma e diminui fibrose pulmonar (KUBA; IMAI; PENNINGER, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2015). Em adição, Ang-(1-7), além do efeito anti-inflamatório, tem sido descrita por ser uma molécula pró-resolutiva da resposta inflamatória (BARROSO *et al.*, 2017; MAGALHAES *et al.*, 2018), e agora primeiramente demonstrado no contexto de infecção viral demonstrado neste trabalho de tese (MELO *et al.*, 2021). Atualmente tem sido demonstrado que ativação de receptores acoplados a proteína G resulta em resolução por meio de apoptose, fagocitose e eferocitose de leucócitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) e macrófagos (PARK; LANGMEAD; RIDDY, 2020). Estes dados tornam ainda mais importantes estudos da ativação específica de Ang-(1-7) ao MasR.

Já é descrito que o bloqueio do eixo (ECA/Ang II/AT₁R) pode ser devido ao aumento da concentração circulante e/ou tecidual de Ang-(1-7) (SANTOS, RAS *et al.*, 2019). A hipótese de bloqueio do eixo pró-inflamatório do sistema (ECA/Ang II/AT₁R), e de estímulo do eixo [ECA2/Ang-(1-7)/MasR] ou ativar e explorar sinalização do receptor acoplado a proteína G, MasR, podem ser uma alternativa importante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

2.1 Justificativa

O vírus Influenza se replica rapidamente e ocasiona uma doença respiratória aguda provocando milhões de internações no mundo. As epidemias e pandemias da gripe provocam improdutividade, perda de dias de trabalho, gastos com medicamentos e leitos hospitalares, ou seja levam a prejuízos econômicos e sociais. Além disso, o pior prognóstico da doença e a morte estão associados as infecções bacterianas secundárias à gripe, principalmente por *Streptococcus pneumoniae* que é a mais constantemente isolada (GRABOWSKA *et al.*, 2006; JULKUNEN *et al.*, 2001).

Na pneumonia pneumocócica, na qual *S. pneumoniae* é o principal causador da mortalidade infantil e hospitalização de adultos, sobretudo em países em desenvolvimento (ZAR *et al.*, 2013). A vacina e o tratamento com antibiótico não são completamente eficazes e o uso frequente e prolongado de antibióticos pode favorecer a seleção de cepas resistentes, agravar a inflamação e dano pulmonar provocados pela infecção por *S. pneumoniae*. Já na gripe, o tratamento é regularmente baseado no bloqueio dos sintomas, mesmo com a disponibilidade de antivirais. Este fato é devido aos antivirais terem relativamente alto custo e baixa eficácia quando há atraso do início do tratamento (HUSSELL *et al.*, 2004; REGOES; BONHOEFFER, 2006). Ademais, os vírus Influenza são altamente capacitados a passarem por mutações gênicas pontuais ou rearranjos gênicos mais significativos, possibilitando surgimento de novas linhagens patogênicas (CDC, C. FOR D. C. AND P.; NCIRD, 2019). Dessa forma, é necessário que vacinas sejam reformuladas anualmente de acordo com os subtipos de vírus circulantes naquele período (BOUVIER; PALESE, 2008).

Então, é de grande relevância buscar por novas estratégias de tratamento contra a doença provocada pelo vírus Influenza A e por *S. pneumoniae* mas com foco na resposta imune do indivíduo acometido e não sobre os patógenos em si. Mesmo sabendo que a inflamação, quando não controlada, está associada ao pior prognóstico da doença, e quando é por Influenza A, com ocorrência de uma segunda infecção bacteriana, é importante ressaltar que a inflamação mediada pelo sistema imune controlam os patógenos, gravidade da doença e diminui as chances de infecção

pneumocócica secundária à gripe (GARCIA *et al.*, 2010; TAVARES, L. P.; TEIXEIRA; GARCIA, 2017).

Então a hipótese é que o tratamento com Angiotensina-(1-7) module o sistema imune com suas funções resolutivas da inflamação no contexto de infecção por IAV, por *S. pneumoniae* e previna desenvolvimento da pneumonia pneumocócica secundária à gripe. Embora Ang-(1-7) tenha demonstrado função anti-inflamatória, anti-fibrótica e recentemente pró-resolutiva (BARROSO *et al.*, 2017; MAGALHAES *et al.*, 2018; RAGO *et al.*, 2019), esta é a primeira vez abordada em contexto de infecção.

2.2 Objetivo geral

Os objetivos gerais deste trabalho foram I) estudar a resposta inflamatória, avaliar o papel do receptor Mas e do seu ligante Ang-(1-7) durante na infecção pelo vírus Influenza A e quais as consequências de Ang-(1-7) na pneumonia pneumocócica secundária à gripe; II) estudar a resposta inflamatória pulmonar, bem como avaliar o efeito de Ang-(1-7) na pneumonia pneumocócica e também sua função ao associá-la a antibiótico durante sepse pneumocócica. Os objetivos específicos estão expostos nos tópicos 3.1 e 3.2 do capítulo de Trabalhos Científicos a seguir.

3 TRABALHOS CIENTÍFICOS

3.1 Capítulo 1 – Artigo científico publicado

A primeira parte do trabalho desenvolvida no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos resultou no artigo científico publicado que segue anexado nesta tese de doutorado, intitulado:

Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus and post-influenza pneumococcal.

Eliza M Melo, Juliana Del Sarto, Juliana P Vago, Luciana P Tavares, Flávia Rago, Ana Paula F Gonçalves, Marina G Machado, Irene Aranda-Pardos, Bruno V S Valiate, Geovanni D Cassali, Vanessa Pinho, Lirlândia P Sousa, Noelia A-Gonzalez, Maria José Campagnole-Santos, Michael Bader, Robson A S Santos, Alexandre V Machado, Stephan Ludwig, Mauro M Teixeira. Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus and post-influenza pneumococcal infection. Pharmacological Research. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105292.

3.1.1 Objetivos específicos

1- Efeito da administração de Ang-(1-7) oral durante a infecção por Influenza A/WSN/33 H1N1 utilizando animais selvagens (WT)

- Letalidade induzida pela infecção,
- Influxo de leucócitos para as vias aéreas e pulmões em diferentes tempos após a infecção,
- Presença de edema após a infecção,
- Produção de citocinas e quimiocinas no lavado bronco-alveolar (BALF),
- Título viral no pulmão em diferentes tempos após a infecção,
- Resposta pró-resolutiva nas vias aéreas,
- Dano pulmonar induzido pela infecção.

2- Papel do receptor Mas durante a infecção por Influenza A/WSN/33 H1N1

- Letalidade induzida pela infecção em animais nocautes para o receptor Mas (MasR^{-/-}) comparado a animais WT,
- Influxo de leucócitos para as vias aéreas e pulmões em diferentes tempos após a infecção,

- Produção de citocinas e quimiocinas no BALF
- Título viral no pulmão de animais MasR^{-/-} comparado a animais WT após a infecção.

3- Atuação de Ang-(1-7) administrada oralmente sobre o receptor Mas de animais WT após a infecção por Influenza A/WSN/33 H1N1

- Letalidade induzida em animais MasR^{-/-} tratados ou não tratados após a infecção

4- Prevenção da infecção por *Streptococcus pneumoniae* secundária à gripe ao administrar Ang-(1-7) durante a infecção por Influenza A/WSN/33 H1N1

- Letalidade induzida pela infecção,
- Recuperação de bactéria no sangue e no BALF,
- Influxo de leucócitos para as vias aéreas e pulmões.

5- Atuação direta de Ang-(1-7) sobre a replicação viral e na ativação da fagocitose de neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos alveolares.



Relevance of Angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by Influenza virus and post-influenza pneumococcal infection

Eliza M. Melo ^a, Juliana Del Sarto ^{a,b}, Juliana P. Vago ^a, Luciana P. Tavares ^{a,c}, Flavia Rago ^a, Ana Paula F. Gonçalves ^{a,d}, Marina G. Machado ^{a,e}, Irene Aranda-Pardos ^f, Bruno V.S. Valiate ^a, Geovanni D. Cassali ^g, Vanessa Pinho ^a, Lirlândia P. Sousa ^h, Noelia A-Gonzalez ^f, Maria José Campagnole-Santos ⁱ, Michael Bader ^j, Robson A.S. Santos ⁱ, Alexandre V. Machado ^d, Stephan Ludwig ^b, Mauro M. Teixeira ^{a,*}

^a Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Institute of Virology Muenster (IVM), Westfälische Wilhelms-University Muenster, Von-Esmarch-Str. 56, D-48149 Muenster, Germany

^c Pulmonary and Critical Care Medicine Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

^d Imunologia de Doenças Virais, Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^e Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, University of Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

^f Institute of Immunology, Westfälische Wilhelms-University Muenster, Röntgenstraße 21, D-48149 Muenster, Germany

^g Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^h Laboratório de sinalização da inflamação, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ⁱ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^j Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Influenza virus
Streptococcus pneumoniae
Angiotensin-(1-7)
Inflammation
Resolution

Infection

ABSTRACT

Resolution failure of exacerbated inflammation triggered by Influenza A virus (IAV) prevents return of pulmonary homeostasis and survival, especially when associated with secondary pneumococcal infection. Therapeutic strategies based on pro-resolving molecules have great potential against acute inflammatory diseases. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] is a pro-resolving mediator that acts on its Mas receptor (MasR) to promote resolution of inflammation. We investigated the effects of Ang-(1-7) and the role of MasR in the context of primary IAV infection and secondary pneumococcal infection and evaluated pulmonary inflammation, virus titers and bacteria counts, and pulmonary damage. Therapeutic treatment with Ang-(1-7) decreased neutrophil recruitment, lung injury, viral load and morbidity after a primary IAV infection. Ang-(1-7) induced apoptosis of neutrophils and efferocytosis of these cells by alveolar macrophages, but had no direct effect on IAV replication *in vitro*. MasR-deficient (MasR^{-/-}) mice were highly susceptible to IAV infection, displaying uncontrolled inflammation, increased viral load and greater lethality rate, as compared to WT animals. Ang-(1-7) was not protective in MasR^{-/-} mice. Interestingly, Ang-(1-7) given during a sublethal dose of IAV infection greatly reduced morbidity associated with a subsequent *S. pneumoniae* infection, as seen by decrease in the magnitude of neutrophil influx, number of bacteria in the blood leading to a lower lethality. Altogether, these results show that Ang-(1-7) is highly protective against severe primary IAV infection and protects against secondary bacterial infection of the lung. These effects are MasR-dependent. Mediators of resolution of inflammation, such as Ang-(1-7), should be considered for the treatment of pulmonary viral infections.

* Corresponding author at: Lab. of Immunopharmacology, Dept. of Biochemistry and Immunology, Inst. of Biological Sciences, Univ. Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. * E-mail address: mmtex@icb.ufmg.br (M.M. Teixeira). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105292>

Received 3 August 2020; Received in revised form 22 October 2020; Accepted 22 October 2020
Available online 7 November 2020

1043-6618/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Influenza A virus (IAV) infections are important public health threat leading to substantial numbers of hospitalizations. Seasonal or pandemic influenza can be associated with bacterial coinfections that contribute significantly to the increase of morbidity and death [1]. Indeed, approximately 25 % of deaths associated with influenza are due to second bacterial infection. *S. pneumoniae* is the main cause of community-acquired pneumonia [2] and one of the most common infecting bacteria following Influenza virus infection [3,4].

Inflammation triggered by IAV or pneumococcal infections is necessary for viral and bacterial clearance but must be tightly regulated to prevent lung injury, viral replication and bacterial dissemination [5, 6]. Indeed, infection caused by either Influenza virus or *S. pneumoniae* may result in compromise of alveolar structure, local and systemic production of cytokines and vigorous recruitment of neutrophils into the airways [7,8]. Combined infections result in even more serious pulmonary injury when compared with single infection by either of these pathogens [9]. It is believed that modulation of inflammation during infection with these pathogens may decrease pulmonary inflammatory response and injury, hence being useful in the adjunctive treatment of severe pneumonia [5,6].

The production of pro-resolving molecules during the inflammatory process is necessary to resolve inflammation adequately and facilitate the return to homeostasis [10]. In addition, it has been suggested that these molecules may be useful in the context of lung infection by decreasing lung inflammation and injury and by facilitating immune responses against certain infections [10]. Angiotensin-(1–7) [Ang-(1–7)] is a biologically active heptapeptide of the Renin-Angiotensin System (RAS) known for its anti-inflammatory and anti-fibrotic effect in different acute and chronic models of inflammatory disease, including asthma [11], dyslipidemia [12], renal injury [13,14], arthritis [15] and lung fibrosis [16]. Ang-(1–7) plays a pro-resolving role by inducing monocyte recruitment, promoting apoptosis and efferocytosis of neutrophils and leading to tissue repair [17,18]. The major pathway for Ang-(1–7) formation is *via* ACE2 [19,20] and most of its actions are mediated through binding to its Mas receptor (MasR) [21]. Here, we studied the relevance of Ang-(1–7) and its receptor in the context of IAV infection.

Material and methods

Study design, ethical statement and mice

This study was randomized, blinded and controlled by vehicle during the experimental and analysis stages. All experimental procedures described here were conducted according to Brazilian guidelines on animal work

and approved by the local Animal Ethics Committee from Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA - UFMG - protocol number 381/2015). Wild type (WT) and MasR knockout (MasR^{-/-}) mice (male C57BL/6; 8–11 weeks old) were maintained in a controlled environment with free access to filtered water and standard laboratory chow *ad libitum*.

Influenza A virus and *S. Pneumoniae* infection

Influenza A virus (IAV) strain A/WSN/33 H1N1 (WSN/33) was produced in chicken eggs and then cultured in MDCK cells as described previously [22]. WT and MasR^{-/-} mice were anesthetized with 10 mg/kg of xylazine plus 70 mg/kg of ketamine and received 10⁴ PFU for the moderate infection (lethal dose, 50 %) or 5 × 10² PFU for the mild infection (sublethal dose) of IAV WSN/33, as previously described [23]. For pneumococcal infections, WT mice were anesthetized by inhaling isoflurane [3–5 % inhalation and 1–2 % maintenance (dose mg / kg)]; and immediately received 10³ CFU of *Streptococcus pneumoniae* to mild infection (sublethal dose). At day 16, mice were euthanized to access inflammation and bacterial loads. The inoculum was prepared in sterile phosphate buffered saline (PBS) or just PBS for Mock group, 30 or 40 µL intranasally. Mice survival was monitored for 21 days after infection.

Angiotensin-(1–7) treatment

Ang-(1–7) oral formulation was produced as previously described [24]. The oligosaccharide (hydroxypropyl-β-cyclodextrin – HPβCD) protects Ang-(1–7) from inactivation by digestive tract enzymes [25]. The duration of the administration the Ang-(1–7) / HPβCD formulation varied according to experiment, but always starting 3 days after infection and given twice a day, every 12 h. In lethality experiments, mice were treated from day 3 to day 10 or till death was noticed. For experiments evaluating cytokines and inflammation, the formulation was given from day 3 till day 5 or 7, as shown in each experiment. In experiments to evaluate the effects of the formulation on secondary pneumococcal infection, mice were infected with a low inoculum of IAV (5 × 10² PFU), treated from days 3–10 (8 days of treatment) and infected with *S. pneumoniae* on day 14. The start of treatment on day 3 was based on the window of treatment opportunity for oseltamivir [26, 27] and also on the period of inflammatory response and viral load already observed in studies by our and other research groups [22,28]. For oral administration, the infected groups received vehicle (92 µg/Kg of HPβCD in filtered water, 100 µL, by gavage) and Ang-(1–7) group received Ang-(1–7) / HPβCD [60 µg/Kg of Ang-(1–7) and 92 µg/Kg of HPβCD in distilled water, 100 µL, by gavage]. Mock group received 100 µL of filtered water. The dose used was based on previous studies using murine models of

asthma [18], arthritis [17], emphysema [29] and pulmonary fibrosis [16].

Western blot analysis

For *in vitro* infection, human pulmonary adenocarcinoma Cell line (A549) and Madin Darby Canine Kidney Cell line (MDCK) were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco) 3 × 10⁵ cells / well were seeded and incubated for 24 h. To analyze viral proteins by Western blot, A549 cells were infected with IAV WSN/33 (MOI 5) and treated with medium or Ang-(1–7) 1 µM/well. The time points were collected 2, 4, 6, and 8 h post infection. To analyze viral titrations, A549 cells were infected with IAV WSN/33 (MOI 0.1), adsorbed for 30 min and then treated with medium or Angiotensin-(1–7) 30, 100 or 300 nM/ well. Time points were collected 8, 24 and 48 h after infection and samples were analyzed by plaque assay in MDCK cells.

To evaluate the expression of MasR, we collected, weighed and homogenized 30 mg of lung tissue in 1 mL of lysis solution. The protein content of the lysate was determined by Bradford assay (Bio-Rad). Extracts (70 µg) were separated by electrophoresis on 10 % SDS-PAGE and electro transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked overnight at 4 °C with PBS containing 5% (w/v) nonfat dry milk and 0.1 % Tween-20, washed with PBS containing 0.1 % Tween-20, and then incubated with anti-rabbit to Mas1L (1:500 –

Abcam), anti-mouse β-actin (1:3000) and secondary anti-mouse or anti-rabbit peroxidase conjugate antibody (1:3000).

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and total/differential cell count

BALF was performed and tissues taken for further analysis. For the BALF, two aliquots of 1 mL of PBS were flushed three times into the lungs to collect leukocytes of the airways of mice. Then, BALF samples (2 mL each) were centrifuged at 600 x g for 10 min at 4 °C. Total number of leukocytes was determined by counting leukocytes in a modified Neubauer chamber. Differential counts were obtained from cytopspin (Shandon III) preparations to evaluate the percentage of each leukocyte on a slide stained with May–Grunwald–Giemsa, based on morphological criteria. Each slide was counted three times and the percentage was used to calculate the absolute number of each leukocyte type.

Assessment of neutrophil apoptosis

Apoptosis was assessed morphologically, as previously described [30,31]. Briefly, cells in BALF were collected from mice on day 5 and 7 post moderate IAV infection. Leukocytes were cytocentrifuged, fixed and stained with May-Grünwald-Giemsa and counted using oil immersion microscopy (x100 objective) to determine the proportion of neutrophils with distinctive apoptotic morphology (cell retraction, chromatin condensation, nuclear fragmentation and

formation of apoptotic bodies out or inside macrophages). At least 500 cells were counted per slide and results are expressed as the median of percentage of cells with apoptotic morphology.

Assessment of apoptosis was also performed by flow cytometry using FITC-labeled annexin-V and 7AAD as an index of loss of nuclear membrane integrity (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen™, US).

Flow cytometry

Cells present in the BALF were staining with fluorescent antibodies against F4/80 (25–4801-82, PEcy7, eBioscience, USA), and Ly6 G (562737, BV421, BD Biosciences). After being stained for surface markers, cells were stained with annexin-V and 7AAD according to manufacturer's instructions (556547, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen™, US). Stained cells were acquired in BD FACSCanto II cell analyzer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Plaque assay

To determine viral load in lungs, we collected, weighted and homogenized 100 mg of lung tissue in 1 mL of sterile PBS. Plaque assay was performed as previously described [22]. For a viral adsorption, samples were diluted and incubated for 1 h on the MDCK cell monolayer. Then, 1% of agarose in DMEM was added to the cells followed by an incubation of 72 h. Cells were fixed and stained with violet crystal for plaque counts. The virus titer was

expressed as number of plaque-forming units (PFU) per gram of lung tissue (PFU/100 mg of lung).

Lung MPO and NE

After performing BALF, lungs were perfused with 5 mL of PBS to remove circulating blood and frozen. The right lung of mice was collected for indirect quantification of neutrophils recruitment into the tissue (MPO – myeloperoxidase assay). As previously described [32], 50 mg of lung tissue were homogenized in a buffered solution containing antiproteases. MPO levels were performed using 25 µl of the supernatant of the homogenized and 25 µL of a solution of 1.6 mM of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB; Sigma—dissolved in dimethyl sulfoxide) and 0.01 mM of H₂O₂, diluted in phosphate buffer (pH 5.4) containing HTAB. The homogenate supernatant (50 µl) was also used to measure neutrophilic elastase activity. To this end, the supernatant was incubated with 50 µl substrate MeO-Suc-AA-Pro-Val-pNA (M4765 - Sigma) in a 96-well microplate at 37 °C for 1 h, as previously described [33].

Histological analysis

The left lungs of mice were formalin-fixed, dehydrated gradually in ethanol and processed as described [22]. 4 µm sections of the tissue were stained with Hematoxylin & Eosin and analyzed by a pathologist blinded to the experiment. The scoring method used here has been described in detail elsewhere [22].

Briefly, a score of 18 points evaluated airway inflammation (up to 4 points), vascular inflammation (up to 4 points), parenchymal inflammation (up to 5 points) and general neutrophil infiltration in the lungs (up to 5 points).

Phagocytosis assay

Neutrophils were differentiated from cell line progenitors by culturing them with differentiation medium (Optimem 1% Penicillin/Streptomycin, 10 % FCS, 30 μ M β -Mercaptoethanol, 500 μ L SN SCF) for 4 days. For inducing apoptosis, neutrophils were incubated with 25 μ M Roscovitin for 12 h and then stained with 5 μ M CellTracker™ Red CMTPX (C34552, Thermo-Fisher). Alveolar macrophages were harvested by bronchoalveolar lavage (BALF) from mice and incubated in proliferation medium (RPMI, 10 % FBS, 1% Glutamine, 1%Penicillin/Streptomycin, 1% Pyruvate, 5 ng/mL of mouse GM-CSF) for 7 days. Alveolar macrophages were treated with 300 nM of Ang-(1–7) (A9202, Sigma-Aldrich) during 24 h to then perform the phagocytosis assay by adding apoptotic red-stained neutrophils and incubating in co-culture for 15 and 30 min. Alveolar macrophages were stained with FITC anti- mouse CD11c (553801, BD Pharmingen™, US) diluted 1:200 and slides were mounted with mounting medium containing DAPI. Several random images were taken from each experiment and time point. With ImageJ, quantification was performed by

counting the apoptotic neutrophils that were adhered and phagocytosed by macrophages.

Measurement of cytokines and chemokines

BALF supernatants were used to assess concentrations of cytokines and chemokines (IL-10, IFN- γ , CXCL1, and CCL5) measurements by ELISA DuoSet kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, USA).

Results

Administration of Angiotensin-(1–7) prevents lethality and controls inflammation after IAV infection

Initial experiments evaluated the effects of Angiotensin-(1–7) treatment, an agonist of the receptor Mas, in IAV-induced pneumonia. To this end, wild type (WT) mice were infected with an inoculum of IAV that corresponds to 1 LD₅₀ (LD₅₀ = 50 % of lethality – 10⁴ PFU) intranasally on day 0 and then treated with Ang-(1–7) from the third to tenth day after IAV infection and then followed for 21 days (Fig. 1A). Ang-(1–7) treatment of IAV-infected mice decreased lethality from 82 % to 53 % in vehicle-treated mice (Fig. 1B) and both surviving groups recovered weight loss (Fig. 1C). Moreover, to better understand the therapeutic effects of Ang-(1–7), animals given Ang-(1–7) or vehicle were culled and tissues examined at 3, 5 and 7 days after infection. Treatment with Ang- (1–7) decreased the total number of leukocytes (Fig. 1D) and neutrophils

(Fig. 1F) in the airways. There was no difference in the number of mononuclear cells recruited when compared to Ang-(1–7) and vehicle groups (Fig. 1E), even when we differentiate the lymphocyte and macrophage count (data not shown). On the fifth day post infection, Ang-(1–7) treatment was associated with decreased levels of CXCL1 and IFN- γ in BALF (Fig. 1G,H). No difference in levels of CCL5 and IL-10 was detected in the time points evaluated. Consistent with the lower neutrophil infiltrate and CXCL1 levels into the airways, mice treated

with Ang-(1–7) showed less myeloperoxidase (MPO) activity in the lungs (Fig. 1I). There was an increase in neutrophil elastase activity, a surrogate marker of NET formation [34,35], after infection, but this was not altered by treatment with Ang-(1–7) (Supplementary Fig. 1A). Interestingly, although inflammatory responses tended to decrease in treated mice, the viral titer in the lungs was decreased during viral pneumonia (Fig. 1J). Ang-(1–7) treatment had no direct antiviral effect, since it was not able to decrease virus replication in A549 cells

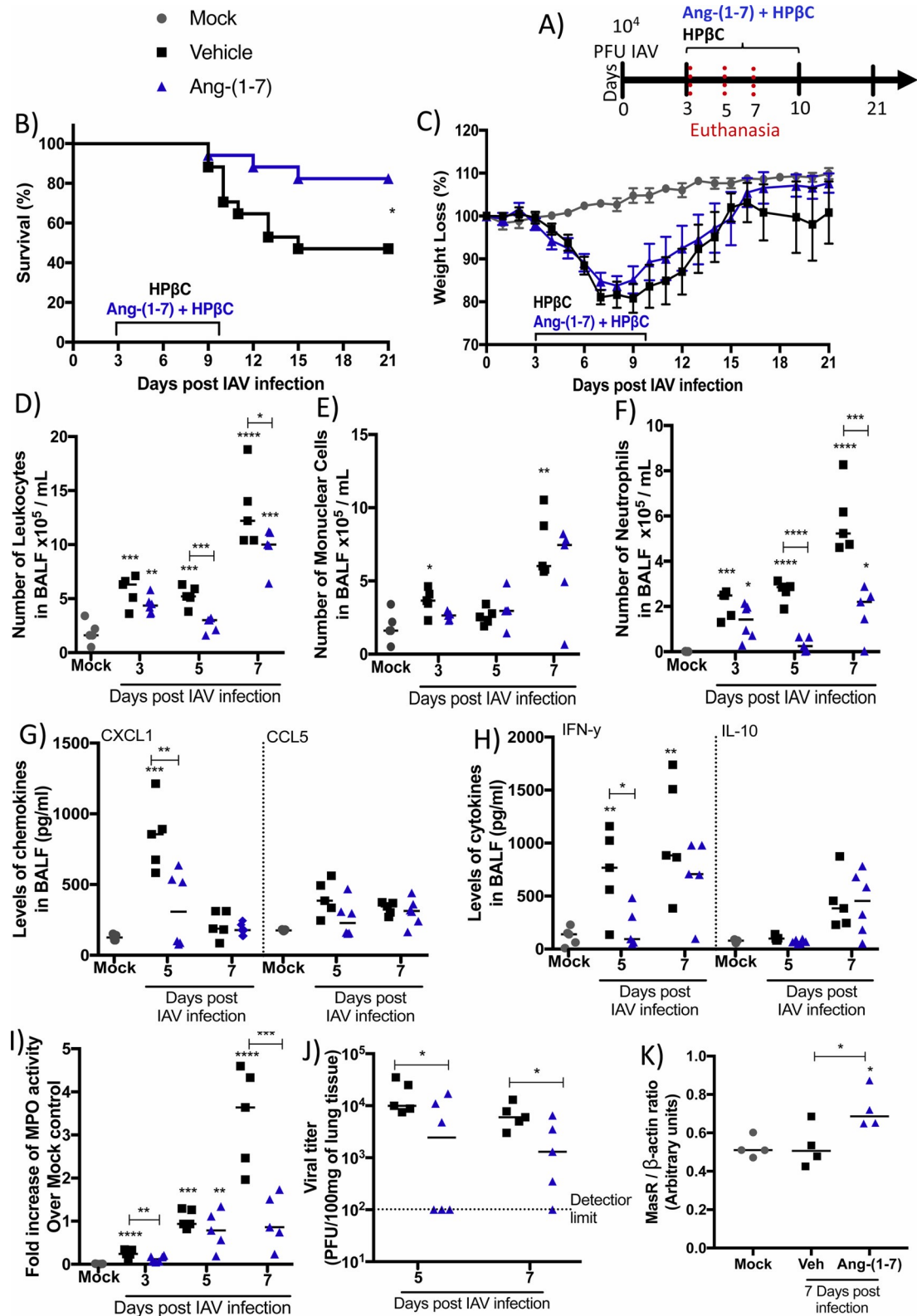


Fig. 1. Angiotensin-(1-7) protects from lethality and controls inflammation during IAV pneumonia. (A) WT mice were infected intranasally with 10^4 PFU and treated twice a day, from day three to seven post-infection, with Vehicle (92 $\mu\text{g/Kg}$ of HP β CD) or Angiotensin-(1-7) [60 $\mu\text{g/Kg}$ of Ang-(1-7) plus 92 $\mu\text{g/Kg}$ of HP β CD], twice a day by gavage. (B–C) Survival and weight loss were monitored daily (* for $p < 0.05$ by Log Rank test, $n = 16$ mice). On days 3, 5 and 7 post-IAV, BALF from infected mice was evaluated for (D) total leukocyte, (E) mononuclear cell and (F) neutrophil numbers. (G–H) Levels of CXCL1, CCL5, IFN- γ and IL-10 were also evaluated in BALF. Lungs from infected mice were used for (I) MPO analysis showed by fold increase, (J) viral loads and (K) MasR expression by western blot. PBS instilled mice (Mock) was used as controls. Data are presented as Median, $n = 5$ –6 of three independent-experiments. *, ** and *** for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, when compared to Mock or indicated groups by one-way ANOVA.

(Supplementary Fig. S2A) and there was no change in the production of viral proteins after infection (Supplementary Fig. S2B). In addition, there was an increase in the expression of MasR in the lung tissue after IAV infection (Fig. 1K). These results suggest that Ang-(1–7) improves viral pneumonia and prevents mortality.

Angiotensin-(1–7) induces apoptosis and increases binding and phagocytosis of apoptotic neutrophils

Ang-(1–7) has been associated with resolution of inflammation by inducing neutrophil apoptosis and efferocytosis (phagocytosis of apoptotic neutrophils) and macrophage reprogramming [17,18,36]. Ang-(1–7) treatment of infected mice increased the frequency of apoptotic neutrophils into the airways, as seen by apoptotic morphology counting 5 and 7 days post IAV infection (Fig. 2A) and flow cytometric analyzes 7 days post IAV infection (Fig. 2B).

In addition, in an *ex vivo* experiment, Ang-(1–7) directly increased the interaction of apoptotic neutrophils with alveolar macrophages. There was increased binding and efferocytosis of apoptotic neutrophils (Fig. 2C). In agreement with the decrease in the inflammatory infiltrate observed in mice treated with Ang-(1–7), histological analyzes showed less vascular, airways and parenchyma

inflammation of the lung (Fig. 3A,B). These results suggested that Ang-(1–7) treatment was able to control the viral-induced inflammatory response by increasing apoptosis and subsequent binding and efferocytosis of neutrophils.

Absence of receptor Mas is associated with worsening of viral pneumonia

As shown in our previous results, administration of Ang-(1–7) prevented death, controlled inflammation and promoted resolution of neutrophilic inflammation. Our next step was to assess whether MasR would have a role during IAV infection. To this end, MasR^{-/-} mice were infected with IAV (10⁴ PFU) intranasally. Our results showed that MasR^{-/-} mice succumbed on the ninth day after infection (Fig. 4A) while 53 % of WT group survived. However, no difference in weight loss of WT and MasR^{-/-} group was observed (Fig. 4B). The immune response triggered by IAV was also evaluated to better understand the role of MasR during infection. 7 days after IAV infection, there was an intense recruitment of leukocytes into the airways (Fig. 4C), mainly mononuclear cells (Fig. 4D) and a trend to increased neutrophil recruitment in MasR^{-/-} mice, as compared to WT mice (Fig. 4E). IAV infection induced and increase in the concentration of CXCL1, CCL5 (Fig. 4F), IL-10 (Fig. 4G) and IFN- γ (Fig. 4H) in

BALF of infected mice. Levels of CCL5 were higher in MasR^{-/-} than WT mice (Fig. 4F), but there was no significant increase of other cytokines in comparison to infected WT mice. In addition, viral titers were greater in the lungs of MasR^{-/-} than WT mice after IAV infection (Fig. 4I). Therefore, we can suggest that absence of MasR worsens lung injury and outcome following infection.

Next, we investigated whether the actions of exogenous Ang-(1-7) were dependent on the MasR. For this purpose, MasR-deficient mice were subjected to IAV infection and treated with Ang-(1-7) from the third to the tenth day post infection and followed for 21 days. As seen in Fig. 5, administration of Ang-(1-7) had no effect on weight loss (Fig. 5A) and lethality rates (Fig. 5B) after IAV infection in MasR^{-/-} mice. These results reinforce that the actions of Ang-(1-7) in IAV infection is directly dependent on its effects on the MasR.

Treatment with Angiotensin-(1-7) in post-IAV pneumococcal infection is protective

A relevant factor that leads to high mortality of IAV infected patients is the occurrence of secondary bacterial pneumoniae, commonly due to *Streptococcus pneumoniae* [3]. Because of the protective effects of Ang-(1-7) in the model of viral pneumonia, we wondered if Ang-(1-7) given during the course of viral

infection could benefit mice subsequently exposed to secondary bacterial infection. Mice were challenged with a sublethal dose of virus (500 PFU) and then infected with a sublethal dose of *S. pneumoniae* (10³ CFU) at day fourteen after IAV infection. No virus was detected in the lungs of co-infected mice at day 14 post IAV infection and inflammatory parameters had virtually returned to background (data not shown). Ang-(1-7) treatment was given from the third to tenth day after IAV infection (Fig. 6A). As clearly seen in Fig. 6, a previous IAV infection significantly worsened the outcome of *S. pneumoniae* infection. Indeed, a mild infection, which did not result in lethality, resulted in 100 % death in the presence of a previous IAV infection (Fig. 6B). Treatment with Ang-(1-7) during the course of IAV infection resulted in decrease of lethality rates from 100 % to 46 % (Fig. 6B). In addition, Ang-(1-7) treatment decreased several parameters of inflammatory response, including the total leukocytes and mononuclear cells recruitment (Fig. 6C,D), neutrophilic infiltrate and MPO levels in the lungs seen after the sub sequential infections (Figs. 6E-F). Very importantly, whereas there was bacteremia in control mice, only 50 % of mice treated with Ang-(1-7) had detectable bacteria translocation to blood (Fig. 6G). There was not a significant change in number of bacteria in BALF (Fig. 6H). These data reveal

that exogenous Ang-(1–7) treatment during influenza is beneficial for improving post influenza pneumococcal infection.

Discussion

Seasonal outbreaks of the influenza affect up to 5 million people worldwide annually, with approximately 500,000 deaths from pneumonia each year [37]. The severity of the disease is related to the inflammation intensity caused by Influenza virus [6] and secondary infections [38]. The intensity of inflammation must be balanced to guarantee viral clearance and avoid secondary infection while preventing lung injury and death. Therefore, it has been argued that certain strategies may improve inflammation resolution without disturbing the response of the host to infection [10]. The effects and relevance of Ang-(1–7) and its receptor Mas have not been explored in the context of IAV infection and post-IAV pneumococcal infection. In our study, we found that (i) the administration of Ang-(1–7) to WT mice caused major improvement of viral pneumonia. Indeed, the course of disease was less severe, as seen by decrease of infiltration of leukocytes in the lung (mainly neutrophil infiltrate in the alveoli), decreased tissue damage and lethality rates. There were lower viral titers in the lungs and expression of MasR was increased after administration of Ang-(1–7). (ii) On the other hand, the absence of MasR

caused worsening of pneumonia during IAV infection, as characterized by increased viral load and death of all mice. (iii) The effects of Ang-(1–7) are dependent on its receptor, as Ang-(1–7) had no protective in MasR-deficient mice. (iv) Mechanistically, the beneficial effects of Ang-(1–7) were associated with decreased inflammation, increased neutrophil apoptosis and increased capacity of alveolar macrophages to interact and phagocytize apoptotic neutrophils. Finally, (v) exogenous administration of Ang-(1–7) during IAV prevented inflammation and death caused by a secondary pneumococcal infection.

Several pro-resolving molecules have been shown to decrease substantially inflammation and injury in different models of pulmonary disease, including fibrosis and asthma [16,18,39,40]. In addition, there is substantial evidence that pro-resolving molecules may have beneficial effects in the context of infection [10]. For example, a previous study showed that the treatment with Protectin D1 (PD1) attenuated IAV replication *via* RNA export machinery, decreasing lung injury and improving mice survival of severe influenza [41]. Another pro-resolving molecule, Annexin A1, limited IAV replication and attenuated lung damage and death induced by IAV [42]. The pro-resolving actions of Ang-(1–7) have only recently been described and further

studies are necessary to dissect intracellular mechanisms of action of Ang-(1–7) [17, 18,36]. The finding that Ang-(1–7) decreased lung injury and death induced by IAV is consistent with the anti-inflammatory and

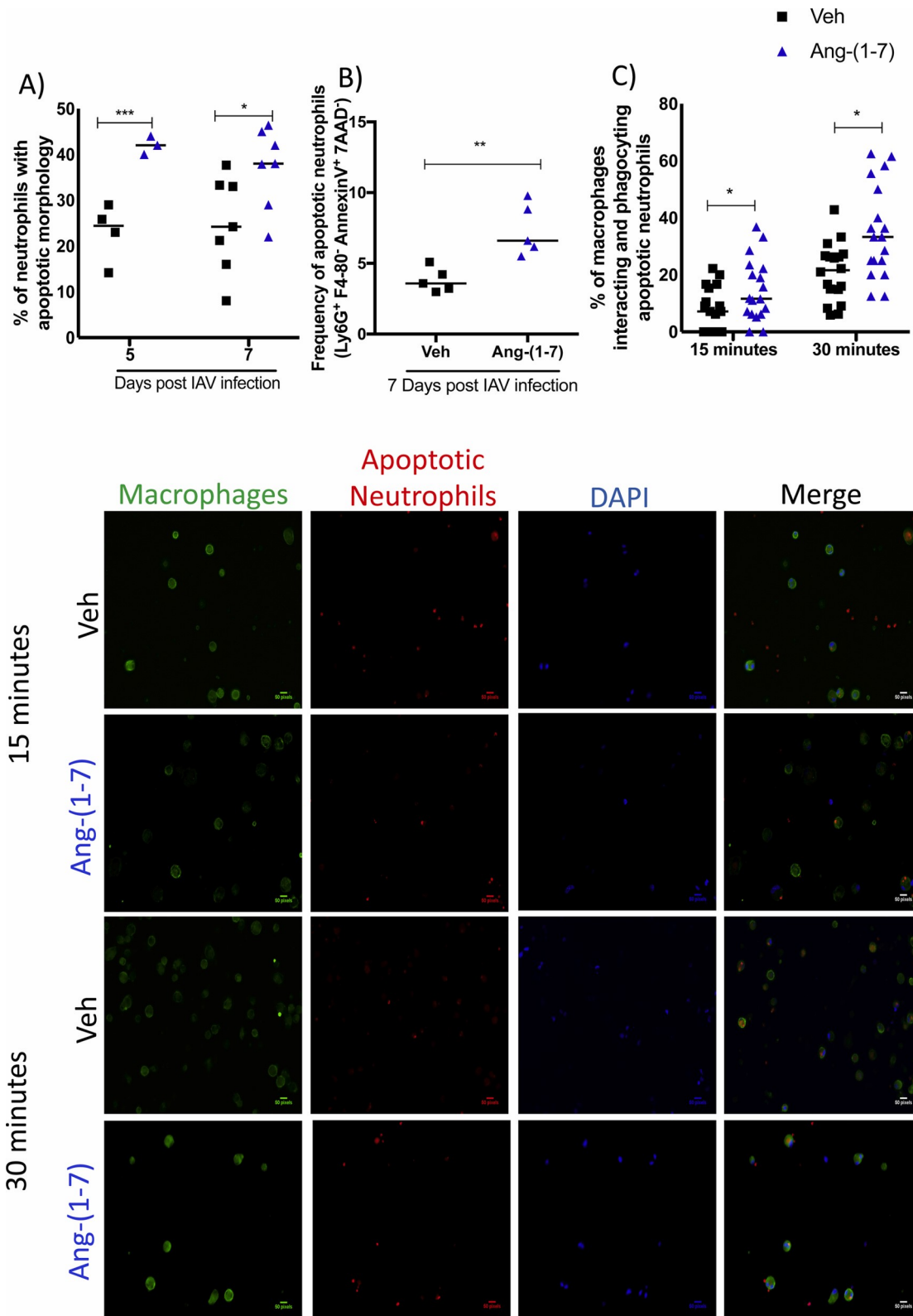
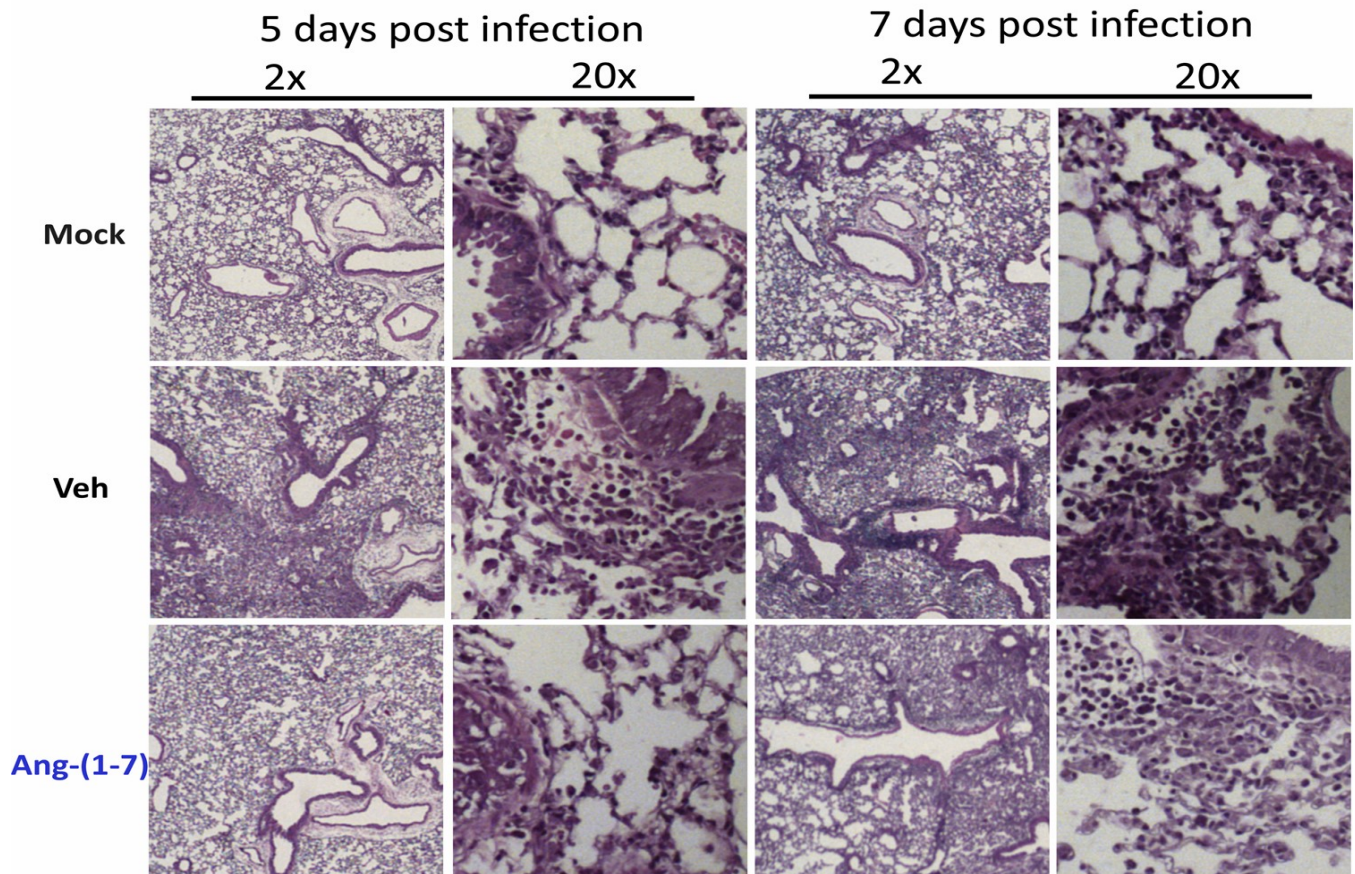


Fig. 2. Angiotensin-(1-7) promotes neutrophil apoptosis, binding and efferocytosis. WT mice were infected intranasally with 10^4 PFU and treated twice a day, from day three to seven post-infection, Vehicle (92 μ g/Kg of HP β CD) or Angiotensin-(1-7) [60 μ g/Kg of Ang-(1-7) and 92 μ g/Kg of HP β CD], twice a day by gavage. On days 5 and 7 post-IAV, mice were euthanized, and the frequency of apoptotic neutrophils was assessed by (A) microscopy (morphological criteria) and (B) flow cytometry (Annexin V + cells). Interaction (binding and efferocytosis) was analyzed *ex vivo* by incubating alveolar macrophages, treated with media (vehicle) or 300 nM of Ang-(1-7), with apoptotic neutrophils for 15 and 30 min. Immunofluorescence staining (C) was performed using antibodies for specific markers of macrophages (CD11c -FITC), neutrophils (Red Cell Tracker) and the nuclear staining was done with DAPI (blue). Magnification of 40 $\times$. Graph shows the quantification of the interaction (binding and efferocytosis assay) between alveolar macrophages and apoptotic neutrophils. Data are presented as Median, $n = 5-7$ of three independent experiments. *, ** and *** for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, when indicated groups by Test-t.

A)



B)

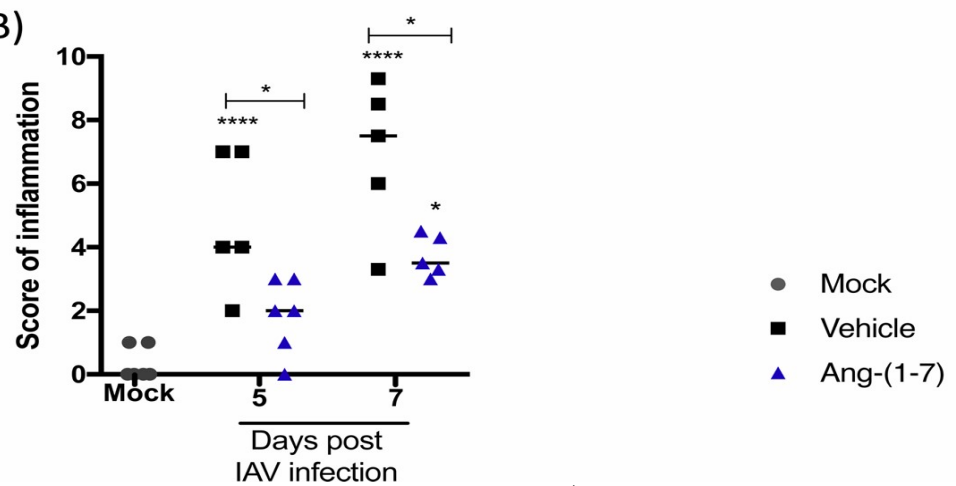


Fig. 3. Angiotensin-(1-7) reduces the IAV- mediated lung injury. (A) Representative lung slides of IAV infected-mice (10⁴ PFU, i.n.) treated with Vehicle (92 µg/Kg of HPβCD) or Angiotensin-(1-7) [60 µg/Kg of Ang-(1-7) and 92 µg/Kg of HPβCD] (twice a day by gavage, from days 3-7) and uninfected controls (Mock). Images, from day 5 and 7 post IAV, were taken under 2x and 20x magnification. (B) Histopathological score (maximal of 18) evaluated airway, vascular, parenchymal inflammation, neutrophilic infiltration. The results are presented as Median, n = 5-6 mice per group, of three independent experiments. * and *** for p < 0.05 and p < 0.001, respectively, compared to Mock or indicated groups by one- way ANOVA.

pro-resolving actions of Ang-(1–7) in several systems [13–18,33,43,44] and agrees with the protective actions of other pro-resolving molecules in models of inflammation [10,38,39]. There was also partial reduction of viral load in Ang-(1–7)-treated animals. As the compound had no direct effect on viral replication, it is likely that the decrease in viral load is secondary to its immunomodulatory effects.

Previous studies have shown that ACE2 expression is decreased after IAV infection [45], which would lead to a drop in Ang-(1–7) levels. On the other hand, IAV infection promoted an increase in the expression of MasR. It is known that the MasR mediates the effects of Ang-(1–7) in various biological systems [21]. Experiments in MasR-deficient mice showed that these animals had worse disease after IAV infection. This is similar to findings in an arthritis model where absence of receptor was associated with a worse disease whereas administration of Ang-(1–7) was anti-inflammatory in mice [15]. In addition, the absence of the MasR increased macrophage recruitment, worsened the autoimmune encephalomyelitis model and

induced atherosclerosis by affecting macrophage migration and infiltration [46]. Moreover, our results show that Ang-(1–7) was not protective in MasR-deficient mice, keeping with the relevance of this receptor for the effects of Ang-(1–7) in various biological systems.

Neutrophils appear to play a crucial role in the context of IAV infection. Indeed, the course of IAV infection is significantly worse in mice in which neutrophils had been depleted [28]. On the other hand, partial blockade of neutrophil accumulation and activation is known to prevent the pulmonary injury associated with IAV infection [22,23,47]. We have previously shown that modulation of the inflammatory response by blocking CXCR1/2 improves disease outcome during respiratory Influenza virus and pneumococcal infections, without compromising the ability of the murine host to deal with infection [23]. Administration of Ang-(1–7) significantly decreased neutrophil influx and this was associated with a decrease in the pulmonary levels of CXCL1, a chemokine that binds to CXCR2. Ang-(1–7) has been found to decrease CXCL1 and other neutrophil active chemokines in models of

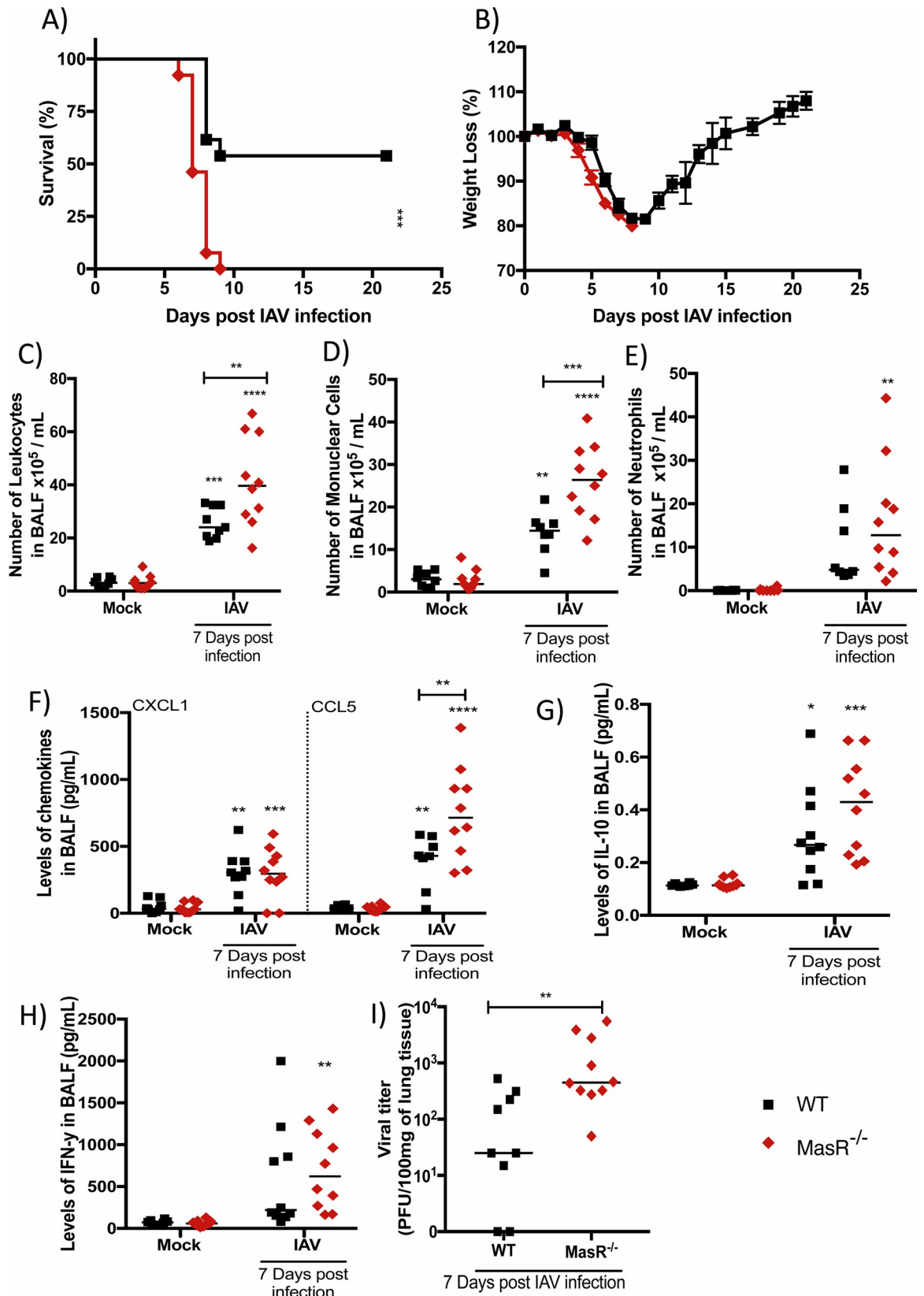


Fig. 4. Receptor Mas is protective during influenza pneumonia. Wild type (WT) and MasR knockout (MasR^{-/-}) mice were infected with IAV (10⁴ PFU, i.n.) and evaluated daily for (A) lethality and (B) weight loss (*** for p < 0.001 by Log Rank Test – n = 13). On day 7 post-IAV, mice were euthanized for (C) total leukocytes, (D) mononuclear cells and (E) neutrophil counts in BALF. Uninfected mice (Mock) were used as controls. (F) Levels of CXCL1 and CCL5, (G) IL-10 and (H) IFN-γ were also evaluated in BALF by ELISA assay. (I) Viral loads were evaluated in the lungs from IAV-infected mice. Data are presented as Median, n = 5 mice per group of three independent experiments. ** and *** for p < 0.01 and p < 0.001, respectively, when compared to Mock or indicated groups by two-way ANOVA.

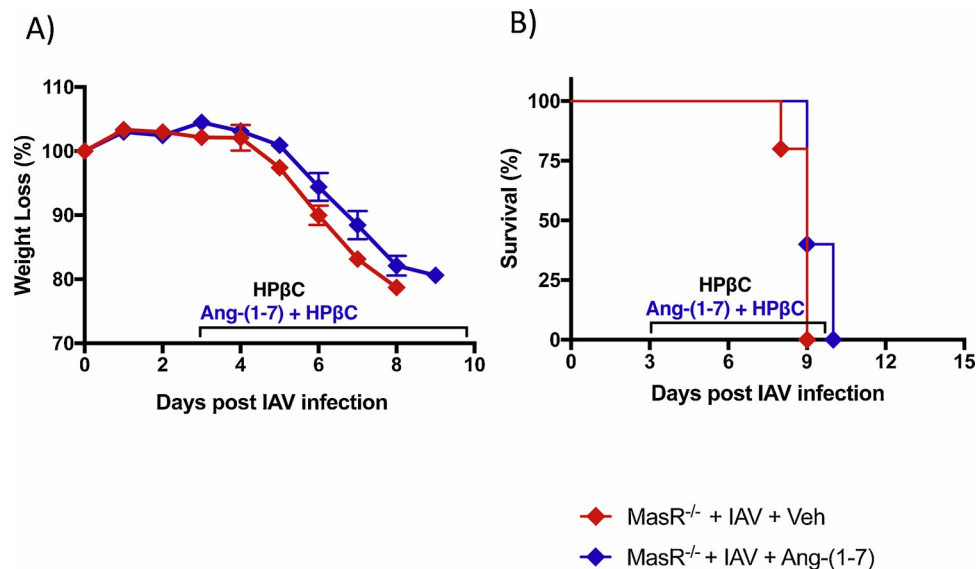


Fig. 5. Angiotensin-(1-7) protective effects are MasR-dependent. MasR-deficient mice (MasR^{-/-}) were infected with IAV (10⁴ PFU, i.n.) and treated twice a day, from day three to seven post-infection, with Vehicle (92 µg/Kg of HPβCD) or Angiotensin-(1-7) [60 µg/Kg of Ang-(1-7) and 92 µg/Kg of HPβCD], twice a day by gavage. (A) Weight loss and (B) lethality were evaluated daily.

arthritis [15] and renal reperfusion injury [13].

Therefore, the ability of Ang-(1-7) to decrease CXCL1 and consequent CXCL1 driven neutrophil influx may account for some of the beneficial effects observed. On the other hand, Ang-(1-7) did not alter neutrophilic elastase activity after infection, suggesting that it does not act in the formation of NETs, a finding that deserves further investigation. We have previously shown that in addition to inhibiting chemokine production [13,15] and directly inhibiting neutrophil influx [15], Ang-(1-7) is also capable of increasing neutrophil apoptosis *in vitro* and *in vivo* [17] and increasing binding and phagocytosis of apoptotic neutrophil by alveolar macrophages *ex vivo* as shown here. Similarly, treatment of mice with Ang-(1-7) enhanced apoptosis of neutrophils and their binding and efferocytosis by macrophages. These pro-resolution effects of Ang-(1-7) may clearly favor

decrease of pulmonary injury with a delay in the production of IFN-γ and better clinical outcome after IAV infection. It is interesting to note that the decrease of neutrophilic inflammation and pulmonary injury were not associated with an increase in viral load in Ang-(1-7)-treated mice.

A secondary bacterial infection, especially by *S. pneumoniae*, is frequent after IAV infection and may account for significant amount of morbidity associated with the infection [48,49]. There are multiple mechanisms associated with enhanced severity of pneumococcal infection after IAV, including decreased beating of ciliary tracheal epithelial cells, epithelial cell death, decreased macrophage number and functionality and changes in microbiota [5,50,51]. In our model, treatment with Ang-(1-7) only during the course of viral pneumonia decreased by 50 % the death

caused by post-IAV pneumococcal infection. The latter protective effects were associated with reduction of bacteria-induced neutrophil influx and lung injury. Although neutrophil numbers were reduced, there was better local control of infection and major decrease of spread of bacteria to the bloodstream. Of note, at the time of the second pneumococcal infection and based on the pharmacokinetics of Ang-(1–7) [25], it is highly unlikely that there is any relevant concentration of this peptide in mice. Therefore, the lower translocation of bacteria to blood appears to be due to the lesser overall inflammatory status of Ang-(1–7)-treated and infected mice and decreased breakdown of epithelial barrier integrity during IAV infection. Our results are in agreement with other findings that treatment with two other pro-resolution mediators, acetate and aspirin-triggered RvD1, in models of pneumococcal pneumonia after IAV infection [52,53]. Additionally, in another finding Ang-(1–7) rescued the phagocytic capacity by mice neutrophils in experimental Type 2 Diabetes Mellitus and these neutrophils phagocytized *Staphylococcus aureus*, a bacterium that also causes lung infection [54].

The inflammatory response plays a dual role during infection [6]. Whereas inflammatory responses are necessary to control proliferation and spread of the pathogen, misplaced or intense inflammatory responses may cause

tissue injury and consequent aggravation of disease. Our results clearly show that treatment with the pro-resolving molecule Ang-(1–7) after the onset of pneumonia caused by IAV decreased pulmonary injury and death. Ang-(1–7) treatment also decreased the severity of pneumococcal pneumonia. Mechanisms associated with protection included decreased neutrophil accumulation and decreased neutrophil-associated injury. We suggest Ang-(1–7) may be a good candidate molecule to be developed as adjunct treatment of viral pneumonia.

Authorship

E. M. Melo, J. P. Vago and M. M. Teixeira wrote the paper. E. M. Melo, J. L. Del Sarto and M. M. Teixeira designed the research. E. M. Melo, J. L. Del Sarto, J. P. Vago, A. P. F. Gonçalves, L. P. Tavares, F. Rago, M. G. Machado, I. Aranda-Pardos, B. V. S. Valiate, G. D. Cassali performed experiments and analyzes the data. V. Pinho and L. P. Sousa provided expertise. N. A-Gonzalez, M. J. Campagnole-Santos, M. Bader, R. A. S. Santos, A. V. Machado, S. Ludwig M. M. Teixeira provided essential tools and expertise.

Funding

This investigation received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq, Brazil) under Grant Agreement No. 476071/2011-9 and no. 309810/2017-5,

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) under Grant Agreement No. PPM-00508-18, The National Institute of Science and Technology in dengue and host-microbial

interactions (INCT Dengue CNPq 465425/2014-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - Brasil (CAPES) - finance code 001.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

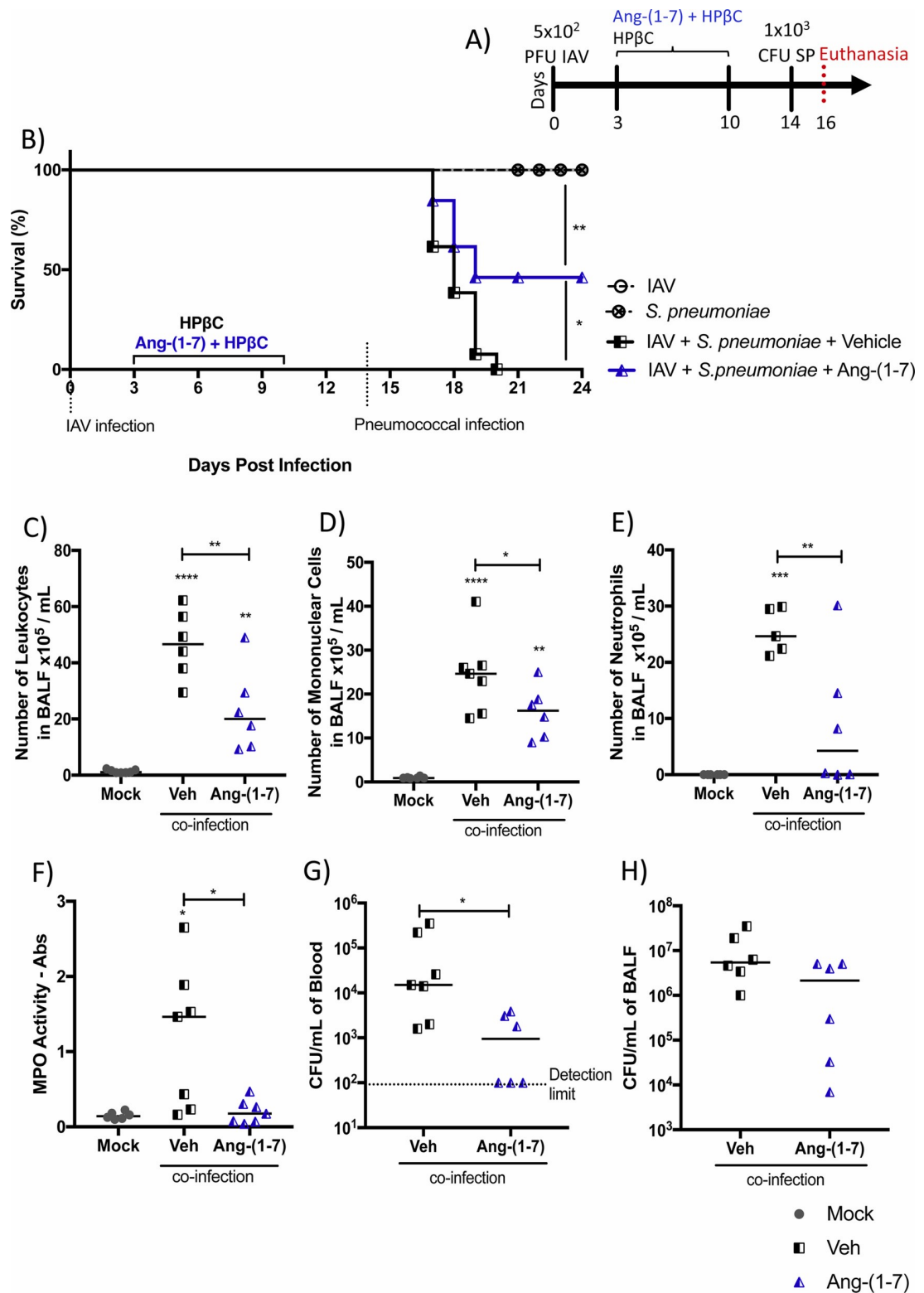


Fig. 6. Angiotensin-(1-7) protects mice from post-IAV pneumococcal pneumonia. (A) WT mice were infected with a non-lethal inoculum of IAV (500 PFU, i.n.) and treated twice a day, from day three to ten post-infection, with Vehicle (92 µg/Kg of HPβCD) or Angiotensin-(1-7) [60 µg/Kg of Ang-(1-7) and 92 µg/Kg of HPβCD], twice a day by gavage. On day 14 post-IAV, mice were secondarily infected with *Streptococcus pneumoniae* (10³ CFU, i.n.). Single infected (IAV or *S. pneumoniae*) and uninfected mice were used as controls. (B) Survival was monitored daily for 24 days. IAV and *S. pneumoniae* single infected groups overlap in the frame of 100 % survival. Data are presented * for p < 0.05 and ** for p < 0.01 by Log Rank test, n = 8-9 mice per group of two independent-experiments. On day 2 post-bacterial challenge, mice were euthanized and BALF was harvested for (C) total leukocyte, (D) mononuclear cells and (E) neutrophil counts. (F) Neutrophil recruitment into the lung parenchyma was assessed by MPO analysis. (G-H) Bacteria burden was evaluated in blood and BALF of secondarily infected mice. Data are presented as Median, n = 6-7 of three independent experiments. *, ** and *** for p < 0.05, p < 0.01 and p < 0.001, respectively, when compared to Mock or indicated groups by one-way ANOVA.

Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105292>

References

- [1] D.M. Morens, J.K. Taubenberger, A.S. Fauci, Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness, *J. Infect. Dis.* 198 (2008) 962–970, <https://doi.org/10.1086/591708>.
- [2] S.A. Madhi, K.P. Klugman, A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia, *Nat. Med.* 10 (2004) 811–813, <https://doi.org/10.1038/nm1077>.
- [3] R.K. Gupta, R. George, J.S. Nguyen-Van-Tam, Bacterial pneumonia and pandemic influenza planning, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 1187–1192, <https://doi.org/10.3201/eid1407.070751>.
- [4] J.A. McCullers, Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 571–582, <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-05>.
- [5] C. Paget, F. Trottein, Mechanisms of bacterial superinfection post-influenza: a role for unconventional T cells, *Front. Immunol.* 10 (2019), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00336>.
- [6] L.P. Tavares, M.M. Teixeira, C.C. Garcia, The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword, *Inflamm. Res.* 66 (2017) 283–302, <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0996-0>.
- [7] A.C. Kalil, P.G. Thomas, Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology, *Crit. Care* 23 (2019) 1–7, <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2539-x>.
- [8] A. Craig, J. Mai, S. Cai, S. Jeyaseelan, Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia, *Infect. Immun.* 77 (2009) 568–575, <https://doi.org/10.1128/IAI.00832-08>.
- [9] K.R. Short, M.N. Habets, P.W.M. Hermans, D.A. Diavatopoulos, Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus: a mutually beneficial relationship? *Future Microbiol.* 7 (2012) 609–624, <https://doi.org/10.2217/fmb.12.29>.
- [10] L.P. Sousa, V. Pinho, M.M. Teixeira, Harnessing resolving-based therapeutics to treat pulmonary viral infections: What can the future offer to COVID-19? *Br. J. Pharmacol.* (2020) <https://doi.org/10.1111/bph.15164> n/a.
- [11] G.S. Magalhaes, M.G. Rodrigues-Machado, D. Motta-Santos, A.R. Silva, M. V. Caliri, L.O. Prata, S.C. Abreu, P.R.M. Rocco, L.S. Barcelos, R.A.S. Santos, M. J. Campagnole-Santos, Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 2330–2342, <https://doi.org/10.1111/bph.13057>.
- [12] R.A.S. Santos, A.J. Ferreira, T. Verano-Braga, M. Bader, Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system, *J. Endocrinol.* (2013), <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0341>.
- [13] L.C. Barroso, K.D. Silveira, C.X. Lima, V. Borges, M. Bader, M. Rachid, R.A. S. Santos, D.G. Souza, A.C. Simoes e Silva, M.M. Teixeira, Renoprotective effects of ~ AVE0991, a nonpeptide Mas receptor agonist, in experimental acute renal injury, *Int. J. Hypertens.* 2012 (2012) 1–9, <https://doi.org/10.1155/2012/808726>.
- [14] K.D. Silveira, F.M. Coelho, A.T. Vieira, L.C. Barroso, C.M. Queiroz, V.V. Costa, L.F. Sousa, M.L. Oliveira, M. Bader, T.A. Silva, R.A.S. Santos, A.C. Simoes e Silva, M. M. Teixeira, Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis, *Peptides*. 46 (2013) 53–63, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.05.012>.
- [15] K.D. da Silveira, F.M. Coelho, A.T. Vieira, D. Sachs, L.C. Barroso, V.V. Costa, T.L. B. Bretas, M. Bader, L.P. de Sousa, T.A. da Silva, R.A.S. dos Santos, A.C. Simoes e Silva, M.M. Teixeira, Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin- (1–7) receptor, mas, in experimental models of arthritis, *J. Immunol.* 185 (2010) 5569–5576, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000314>.
- [16] F. Rago, E.M. Melo, L. Kraemer, I. Galvao, G.D. Cassali, R.A.S. Santos, R.C. Russo, ~ M.M. Teixeira, Effect of preventive or therapeutic treatment with angiotensin 1–7 in a model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice, *J. Leukoc. Biol.* 106 (2019) 677–686, <https://doi.org/10.1002/JLB.MA1218-490RR>.
- [17] L.C. Barroso, G.S. Magalhaes, I. Galvao, A.C. Reis, D.G. Souza, L.P. Sousa, R.A. ~ S. Santos, M.J. Campagnole-Santos, V. Pinho, M.M. Teixeira, Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice, *Front. Immunol.* 8 (2017), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01596>.
- [18] G.S. Magalhaes, L.C. Barroso, A.C. Reis, M.G. Rodrigues-Machado, J.F. Gregorio, D. Motta-Santos, A.C. Oliveira, D.A. Perez, L.S. Barcelos, M.M. Teixeira, R.A. S. Santos, V. Pinho, M.J. Campagnole-Santos, Angiotensin-(1-7) promotes resolution of eosinophilic inflammation in an experimental model of asthma, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00058>.
- [19] S.R. Tipnis, N.M. Hooper, R. Hyde, E. Karran, G. Christie, A.J. Turner, A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33238–33243, <https://doi.org/10.1074/jbc.M002615200>.
- [20] M. Donoghue, F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, B. Woolf, K. Robison, R. Jeyaseelan, R.E. Breitbart, S. Acton, A novel angiotensin-converting enzyme – related to angiotensin 1–9, *Circ. Res.* 87 (2000) 1–10, <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>.
- [21] R.A.S. Santos, W.O. Sampaio, A.C. Alzamora, D. Motta-Santos, N. Alenina, M. Bader, M.J. Campagnole-Santo, The ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system: focus on Angiotensin-(1-7), *Physiol. Rev.* 98 (2018) 505–553, <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>.
- [22] C.C. Garcia, R.C. Russo, R. Guabiraba, C.T. Fagundes, R.B. Polidoro, L.P. Tavares, A.P.C. Salgado, G.D. Cassali, L.P. Sousa, A.V. Machado, M.M. Teixeira, Platelet- activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by influenza A in mice, *PLoS Pathog.* 6 (2010), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001171>.
- [23] L.P. Tavares, C.C. Garcia, M.G. Machado, C.M. Queiroz-Junior, A. Barthelemy, F. Trottein, M.M. Siqueira, L. Brandolini, M. Allegretti, A.M. Machado, L.P. de Sousa, M.M. Teixeira, CXCR1/2 antagonism is protective during influenza and post-influenza pneumococcal infection, *Front. Immunol.* 8 (2017), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01799>.
- [24] I. Lula, A.L. Denadai, J.M. Resende, F.B. de Sousa, G.F. de Lima, D. Pilo-Veloso, T. Heine, H.A. Duarte, R.A.S. Santos, R.D. Sinisterra, Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its β-cyclodextrin inclusion complexes: complete sequence- specific NMR assignments and structural studies, *Peptides*. 28 (2007) 2199–2210, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.011>.
- [25] F.D. Marques, A.J. Ferreira, R. Sinisterra, B.A. Jacoby, F.B. Sousa, M.V. Caliri, G.A.B. Silva, M.B. Melo, A.P. Nadu, L.E. Souza, M.C.C. Irigoyen, A.P. Almeida, R.A. S. Santos, An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats, *Hypertension*. 57 (2011) 477–483, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.167346>.
- [26] D.F. Smee, M.H. Wong, K.W. Bailey, R.W. Sidwell, Activities of oseltamivir and ribavirin used alone and in combination against infections in mice with recent isolates of influenza A (H1N1) and B viruses, *Antivir. Chem. Chemother.* 17 (2006) 185–192, <https://doi.org/10.1177/095632020601700403>.
- [27] B. McQuade, M. Blair, Influenza treatment with oseltamivir outside of labeled recommendations, *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 72 (2015) 112–116, <https://doi.org/10.2146/ajhp140390>.
- [28] H. Fujisawa, Neutrophils play an essential role in cooperation with antibody in both protection against and recovery from pulmonary infection with influenza virus in mice, *J. Virol.* 82 (2008) 2772–2783, <https://doi.org/10.1128/jvi.01210-07>.
- [29] A.C. Bastos, G.S. Magalhaes, J.F. Gregorio, N.A. Matos, D. Motta-Santos, F. S. Bezerra, R.A.S. Santos, M.J. Campagnole Santos, M.G. Rodrigues-Machado, Oral formulation angiotensin-(1-7) therapy attenuates pulmonary and systemic damage in mice with emphysema induced by elastase, *Immunobiology*. 225 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.12.002>.
- [30] I. Galvao, J.P. Vago, L.C. Barroso, L.P. Tavares, C.M. Queiroz-Junior, V.V. Costa, F. ~ S. Carneiro, T.P. Ferreira, P.M.R. Silva, F.A. Amaral, L.P. Sousa, M.M. Teixeira, Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout, *Eur. J. Immunol.* 47 (2017) 585–596, <https://doi.org/10.1002/eji.201646551>.

- [31] J.P. Vago, C.R.C. Nogueira, L.P. Tavares, F.M. Soriani, F. Lopes, R.C. Russo, V. Pinho, M.M. Teixeira, L.P. Sousa, Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis, *J. Leukoc. Biol.* 92 (2012) 249–258, <https://doi.org/10.1189/jlb.0112008>
- [32] R.C. Russo, R. Guabiraba, C.C. Garcia, L.S. Barcelos, E. Roffe, A.L.S. Souza, F. A. Amaral, D. Cisalpino, G.D. Cassali, A. Doni, R. Bertini, M.M. Teixeira, Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40 (2009) 410–421, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0364OC>.
- [33] J.P. Vago, L.P. Tavares, M.A. Sugimoto, G.L.N. Lima, I. Galvao, T.R. de Caux, K. M. Lima, A.L.C. Ribeiro, F.S. Carneiro, F.F.C. Nunes, V. Pinho, M. Perretti, M. M. Teixeira, L.P. Sousa, Proresolving actions of synthetic and natural protease inhibitors are mediated by annexin A1, *J. Immunol.* 196 (2016) 1922–1932, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500886>.
- [34] I. Hahn, A. Klaus, A.K. Janze, K. Steinwede, N. Ding, J. Bohling, C. Brumshagen, H. Serrano, F. Gauthier, J.C. Paton, T. Welte, U.A. Maus, Cathepsin G and neutrophil elastase play critical and nonredundant roles in lung-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* in mice, *Infect. Immun.* 79 (2011) 4893–4901, <https://doi.org/10.1128/IAI.05593-11>.
- [35] V. Papayannopoulos, K.D. Metzler, A. Hakkin, A. Zychlinsky, Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps, *J. Cell Biol.* 191 (2010) 677–691, <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>.
- [36] M. De Carvalho Santuchi, M.F. Dutra, J.P. Vago, K.M. Lima, I. Galvao, F.P. De Souza-Neto, M.Morais E. Silva, A.C. Oliveira, F.C.B. De Oliveira, R. Gonçalves, M. M. Teixeira, L.P. Sousa, R.A.S. Dos Santos, R.F. Da Silva, Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages in Vitro and in Vivo, *Mediators Inflamm.* 2019 (2019), <https://doi.org/10.1155/2019/2401081>.
- [37] H.V. Fineberg, Global health: Pandemic preparedness and response - Lessons from the H1N1 influenza of 2009, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 1335–1342, <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208802>.
- [38] D.C. Blok, K.F. van der Sluijs, S. Florquin, O.J. de Boer, C. van't Veer, A.F. de Vos, T. van der Poll, Limited Anti-Inflammatory Role for Interleukin-1 Receptor Like 1 (ST2) in the Host Response to Murine Postinfluenza Pneumococcal Pneumonia, *PLoS One* 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058191>.
- [39] M.G. Machado, L.P. Tavares, G.V.S. Souza, C.M. Queiroz-Junior, F.R. Ascenção, M. E. Lopes, C.C. Garcia, G.B. Menezes, M. Perretti, R.C. Russo, M.M. Teixeira, L. P. Sousa, The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia, *FASEB J.* 34 (2020) 2749–2764, <https://doi.org/10.1096/fj.201902172R>.
- [40] M.A. Sugimoto, J.P. Vago, M. Perretti, M.M. Teixeira, Mediators of the resolution of the inflammatory response, *Trends Immunol.* 40 (2019) 212–227, <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.007>.
- [41] M. Morita, K. Kuba, A. Ichikawa, M. Nakayama, J. Katahira, R. Iwamoto, T. Watanebe, S. Sakabe, T. Daidoji, S. Nakamura, A. Kadowaki, T. Ohto, H. Nakanishi, R. Taguchi, T. Nakaya, M. Murakami, Y. Yoneda, H. Arai, Y. Kawaoka, J.M. Penninger, M. Arita, Y. Imai, The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza, *Cell.* 153 (2013) 112–125, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.027>.
- [42] S. Schloer, N. Hübel, D. Masemann, D. Pajonczyk, L. Brunotte, C. Ehrhardt, L. O. Brandenburg, S. Ludwig, V. Gerke, U. Rescher, The annexin A1/FPR2 signaling axis expands alveolar macrophages, limits viral replication, and attenuates pathogenesis in the murine influenza A virus infection model, *FASEB J.* 33 (2019) 12188–12199, <https://doi.org/10.1096/fj.201901265R>.
- [43] A.C. Simoes e Silva, K.D. Silveira, A.J. Ferreira, M.M. Teixeira, ACE2, angiotensin- (1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis, *Br. J. Pharmacol.* 169 (2013) 477–492, <https://doi.org/10.1111/bph.12159>.
- [44] A.C. Simoes e Silva, M.M. Teixeira, ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis, *Pharmacol. Res.* 107 (2016) 154–162, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.018>.
- [45] P. Yang, H. Gu, Z. Zhao, W. Wang, B. Cao, C. Lai, X. Yang, L.Y. Zhang, Y. Duan, S. Zhang, W. Chen, W. Zhen, M. Cai, J.M. Penninger, C. Jiang, X. Wang, Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) mediates influenza H7N9 virus-induced acute lung injury, *Sci. Rep.* 4 (2014) 7027, <https://doi.org/10.1038/srep07027>.
- [46] A. Hammer, G. Yang, J. Friedrich, A. Kovacs, D.H. Lee, K. Grave, S. Jorg, N. Alenina, J. Grosch, J. Winkler, R. Gold, M. Bader, A. Manzel, L.C. Rump, D. N. Müller, R.A. Linker, J. Stegbauer, Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 14109–14114, <https://doi.org/10.1073/pnas.1612668113>.
- [47] T.M. Tumpey, A. García-Sastre, J.K. Taubenberger, P. Palese, D.E. Swayne, M. J. Pantin-Jackwood, S. Schultz-Cherry, A. Solorzano, N. Van Rooijen, J.M. Katz, C. F. Basler, Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice, *J. Virol.* 79 (2005) 14933–14944, <https://doi.org/10.1128/jvi.79.23.14933-14944.2005>.
- [48] E.Y. Klein, B. Monteforte, A. Gupta, W. Jiang, L. May, Y.H. Hsieh, A. Dugas, The frequency of influenza and bacterial coinfection: a systematic review and meta-analysis, *Influenza Other Respi. Viruses.* 10 (2016) 394–403, <https://doi.org/10.1111/irv.12398>.
- [49] M.L. Metersky, R.G. Masterton, H. Lode, T.M. File, T. Babinchak, Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza, *Int. J. Infect. Dis.* 16 (2012) e321–e331, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.01.003>.
- [50] L.A. Pittet, L. Hall-Stoodley, M.R. Rutkowski, A.G. Harmsen, Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42 (2010) 450–460, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0417OC>.
- [51] A. Rynda-Apelle, K.M. Robinson, J.F. Alcorn, Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease, *Infect. Immun.* 83 (2015) 3764–3770, <https://doi.org/10.1128/IAI.00298-15>.
- [52] H. Wang, D. Anthony, S. Yatmaz, O. Wijburg, C. Satzke, B. Levy, R. Vlahos, S. Bozinovski, Aspirin-triggered resolvins D1 reduces pneumococcal lung infection and inflammation in a viral and bacterial coinfection pneumonia model, *Clin. Sci.* 131 (2017) 2347–2362, <https://doi.org/10.1042/CS20171006>.
- [53] V. Sencio, A. Barthelemy, L.P. Tavares, M.G. Machado, D. Souillard, C. Cuinat, C. M. Queiroz-Junior, M.L. Noordine, S. Salome-Desnoullez, L. Deryuter, B. Folign Wahl, B. Frisch, A.T. Vieira, C. Paget, G. Milligan, T. Ulven, I. Wolowczuk, C. Faveeuw, R. Le Goffic, M. Thomas, S. Ferreira, M.M. Teixeira, F. Trottein, Gut dysbiosis during influenza contributes to pulmonary pneumococcal superinfection through altered short-chain fatty acid production, *Cell Rep.* 30 (2020) 2934–2947, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.013>, e6.
- [54] M. Soto, K.J. Gaffney, K.E. Rodgers, Improving the innate immune response in diabetes by modifying the renin angiotensin system, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02885>.

3.2 Capítulo 2 – Trabalho científico não publicado

Nesta segunda parte da tese de doutorado avaliamos o efeito do tratamento Angiotensina-(1-7) em modelo de infecção pulmonar por *Streptococcus pneumoniae*.

No primeiro grupo de resultados Ang-(1-7) protegeu contra infecção por Influenza A e infecção pneumocócica secundária à gripe e neste segundo grupo de resultados, será avaliado o papel de Angiotensina-(1-7) na pneumonia pneumocócica. Os assuntos introdutórios sobre *Streptococcus pneumoniae* e Angiotensina-(1-7) fazem parte do tópico de Introdução, Justificativa e Objetivo geral, acima, desta tese de doutorado. A partir daqui serão desenvolvidos os novos tópicos de objetivos específicos, materiais e métodos, resultados, discussão e conclusão.

Como já supracitado, II) Objetivo geral é estudar a resposta inflamatória pulmonar, bem como avaliar o efeito de Ang-(1-7) na pneumonia pneumocócica e também sua função ao associá-la a antibiótico durante sepse pneumocócica.

3.2.1 Objetivo específico

3.2.1.2 Avaliar o papel do peptídeo pró-resolutivo Ang-(1-7) por administração oral, 48 horas após a infecção por *S. pneumoniae* em animais C57BL/6

- Influxo de leucócitos para as vias aéreas e pulmões,
- Presença de edema,
- Produção de citocinas e quimiocinas no lavado bronco-alveolar (BALF),
- Carga bacteriana no BALF,
- Dano pulmonar.

3.2.1.3 Avaliar efeito do peptídeo pró-resolutivo Ang-(1-7) por administração oral combinado com antibiótico ceftriaxona após sepse por *S. pneumoniae* em animais C57BL/6

- Letalidade desencadeada pela infecção

3.2.1.4 Avaliar efeito direto de Ang-(1-7) sobre *S. pneumoniae*

- Curva de crescimento bacteriano em meio de cultura acrescido de Ang-(1-7).

3.2.2 Materiais e métodos

3.2.2.1 Animais

Os experimentos com animais foram realizados em camundongos C57BL/6 machos de 8 a 10 semanas, mantidos em gaiolas microisoladoras nas estantes com filtros de entrada e saída de ar, com condições de temperatura e luz controladas e livre acesso à água e ração. Os animais foram fornecidos pelo Biotério central da UFMG e todos os procedimentos descritos neste projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo CETEA/UFMG número: 65/2021).

3.2.2.2 *Streptococcus pneumoniae*

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303, sorotipo 3, cedida pela Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira do Instituto Butantã, São Paulo, Brasil.

O cultivo das bactérias foi realizado em caldo de cultura Todd Hewitt acrescido de 0.5% de extrato de levedura (THY) e Ágar Sangue (THY acrescido de 5% de sangue). No dia anterior à infecção, as bactérias foram semeadas em placa e incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO₂, por 12 horas. Em seguida, as bactérias foram transferidas para 10mL de caldo de cultura e incubadas a 37°C, 5% CO₂ até atingir a fase exponencial de crescimento - densidade óptica (OD) de 0.4 (600 nm). Após centrifugação e duas lavagens com 10 mL de salina 0.9% estéril apirogênica, o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de salina estéril e a partir dessa suspensão de bactérias, diluições em salina estéril foram realizadas, de forma que 40µL de solução contivesse os inóculos de 1x10⁴ ou 1x10⁵/ 5x10⁵ unidade formadora de colônia (CFU). Em todos os experimentos o inóculo foi confirmado através do plaqueamento da suspensão de bactérias em diferentes diluições e contagem das colônias após 12 horas de incubação a 37°C, 5% CO₂.

3.2.2.3 Infecção em camundongos

Os experimentos com animais são randômicos e duplo-cego. Após a divisão dos animais em grupos, eles foram anestesiados por via subcutânea com uma solução contendo 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina. Após a anestesia, os grupos de camundongos foram infectados com *S. pneumoniae* ou não. Os animais infectados com *S. pneumoniae* receberam 40 µL intranasal do inóculo bacteriano contendo 1x10⁴

CFU – pneumonia moderada – ou 10^5 / 5×10^5 CFU – pneumonia grave. O grupo de animais não infectados (Mock) recebeu 40 μ L de salina 0,9%. Todo o procedimento de infecção foi realizado no fluxo laminar e todos os animais foram monitorados até se recuperarem da anestesia.

3.2.2.4 Angiotensina-(1-7) e esquema de tratamento

O oligossacarídeo (hidroxipropil- β -ciclodextrina - HP β CD) protege a Ang-(1-7) da inativação por enzimas do trato digestivo. A duração da administração da formulação Ang-(1-7)/HP β CD variou de acordo com o experimento, mas sempre começando 12 h após a infecção e administrada duas vezes ao dia, a cada 12 h. Em experimentos de letalidade, os camundongos foram tratados com Ang-(1-7) por 3 dias, ou tratados com ceftriaxona 60 e 72 h associada ou não a Ang-(1-7) a após a infecção ou até a morte ser observada. Para experimentos de avaliação de citocinas e inflamação, a formulação foi administrada até 48 h após a infecção. Para administração oral, os grupos infectados receberam veículo (92 μ g / Kg de HP β CD em água filtrada, 100 μ L, por gavagem), o grupo Ang-(1-7) recebeu Ang-(1-7)/HP β CD [60 μ g/Kg de Ang-(1-7) e 92 μ g/Kg de HP β CD em água destilada, 100 μ L, por gavagem], o grupo ceftriaxona associada ou não a Ang-(1-7) recebeu 10 mg/kg solubilizada em salina 0,9%, 100 μ L intraperitoneal.

3.2.2.5 Eutanásia e coleta das amostras para análise de parâmetros inflamatórios

Para todos os experimentos (com exceção dos experimentos de letalidade), os animais foram eutanasiados com uma dose letal do anestésico à base de cetamina e xilazina. Após a morte, a traqueia dos animais foram expostas para a realização do BALF, para recolher os leucócitos e bactérias do espaço alveolar. O lavado consiste na introdução, por meio de uma cânula de 1.7 mm conectada a uma seringa, de 1 mL de PBS no pulmão, sendo que esse volume é recolhido e reintroduzido 3 vezes. Para a obtenção de uma quantidade satisfatória de células, o lavado é realizado duas vezes, totalizando 2 mL de PBS. Após a realização do BALF, os animais tiveram os seus pulmões coletados e divididos em duas porções: o pulmão esquerdo foi processado para as análises histológicas; e o pulmão direito foi retirado para o ensaio de MPO (atividade da mieloperoxidase). O BALF foi utilizado para contagem leucócitos, dosagem de citocinas e contagem de bactérias.

3.2.2.6 Contagem de *S. pneumoniae* no lavado bronco-alveolar

Após a realização do BALF, 100 µl do fluido recuperado passou por diluições seriadas e foi plaqueado em placa de ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO₂ por 18 horas. Em seguida, as placas com a diluição contendo colônias – número entre 30 e 300 – foram contadas e o resultado foi expresso em CFU/mL de BALF.

3.2.2.7 Contagem total e diferencial de leucócitos

O BALF recuperado foi submetido à centrifugação a 4°C a 1600 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi recolhido e congelado, para posterior dosagem de citocinas por ELISA, enquanto o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de BSA (Albumina sérica bovina) 3% em PBS. Uma alíquota das células em albumina foi diluída 10 vezes na solução de lise de hemácias Turk, para a então contagem total de células, na câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, foram preparadas lâminas de *Citospin* com as células ressuscitadas em albumina, de forma que a lâmina de *Citospin* contivesse aproximadamente 40 mil células. Tais lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido (LB Laborclin®), para a contagem diferencial de células no aumento de 1000 vezes no microscópio óptico. As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos, monócitos e linfócitos) e neutrófilos através de três contagens em campos aleatórios totalizando 100 células em cada contagem.

3.2.2.8 Dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos nos pulmões pode ser correlacionado com a atividade da enzima MPO, a qual está presente em altos níveis em neutrófilos e, por isso é usada como indicador da presença dessas células (RUSSO *et al.*, 2009). Para isso, 50 mg do pulmão direito dos camundongos foram homogeneizados em 0.95 mL do Tampão 1 pH 4.7 (0.1 M de NaCl, 0.02 M de NaPO₄, 0.015 M de NaEDTA) utilizando para tanto um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Após centrifugação por 10 minutos, a 4°C a 9400 g, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi submetido à lise de hemácias através da adição de 0,75 mL de NaCl 0.2%, seguida de 0.75 mL de uma solução de NaCl 1.6% com glicose 5%. A solução final foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos, a 4°C a 9400 g. O sobrenadante foi novamente desprezado e foram adicionados 0.8 mL

de Tampão 2 (0.05 M de Na₃PO₄ e 0.5% de HETAB em pH 5.4) ao *pellet*, o qual foi novamente homogeneizado.

As amostras obtidas a partir do processamento descrito anteriormente foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para liberação da enzima mieloperoxidase das vesículas citoplasmáticas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 9400 g e o sobrenadante, diluído em Tampão 2 na proporção de 1:5, foi utilizado para o ensaio enzimático colorimétrico. Em uma placa contendo 96 poços foi adicionada 25 µL da amostra diluída e em seguida, 25 µL de tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) na concentração final de 1.6mM. A placa foi incubada a 37°C por 5 minutos e, após a adição de 100 µL de peróxido de hidrogênio 0.003% (diluído em Tampão 2 para MPO), uma nova incubação a 37°C por 5 minutos foi realizada. A reação leva ao aparecimento de uma cor azulada pela quebra do substrato TMB e para o término desta reação, adicionou-se 100 µL de H₂SO₄ 1M. A atividade de MPO é então proporcional à intensidade da cor observada em cada poço. A absorbância foi então lida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm.

3.2.2.9 Dosagem de proteína no lavado bronco-alveolar (BALF) – edema

A concentração de proteínas foi dosada pelo método colorimétrico de Bradford, técnica que consiste em diluir a solução estoque de Bradford da Biorad® (5x) para a concentração de 1x. Foram pipetados 200µl de Bradford 1x por poço, usando uma placa de 96 poços. Em seguida, 10µl do sobrenadante do BALF em duplicata foi adicionado em cada poço contendo a solução de Bradford e homogeneizado. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm, descontando a leitura do branco. Os resultados obtidos da absorbância foram comparados a uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de BSA.

3.2.2.10 Dosagem de citocinas por ELISA

O sobrenadante BALF foi utilizado para a dosagem das citocinas e quimiocinas CXCL-1, TNF-α, CCL-2, IL-6 e IL-10. O protocolo utilizado foi estabelecido no kit de ELISA murino da R&D Systems, em placa de 96 poços. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, e adicionados à placa de 96 poços para que a sensibilização ocorresse *overnight* à 4°C. A placa foi lavada 3 vezes e em seguida, foi realizado o bloqueio da reação com 1% de albumina bovina diluída em PBS por 2 horas à

temperatura ambiente, para evitar a ligação inespecífica durante o ensaio. Após o bloqueio, a placa foi lavada e 50ul de amostra foi adicionado a cada poço e incubado overnight. No dia seguinte, após a lavagem, os anticorpos de detecção (diluídos em 0.1% de BSA/PBS) foram adicionados à placa e esta foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingen” - 1:4000) e revelada com o substrato OPD (ophenylenediamine dihydrochloride - Sigma) com 0.006% peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1 M. A leitura foi feita no espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. A cor obtida pela reação é diretamente proporcional à concentração da citocina na amostra analisada. As absorbâncias obtidas pela leitura foram comparadas a uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina analisada, fornecida no kit.

3.2.2.11 Análise histopatológica

Após a eutanásia dos animais os pulmões esquerdos foram recolhidos e fixados em solução de formol 10% tamponado. As amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo e fixadas em lâminas histológicas. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As análises das lâminas foram realizadas por patologista experiente, sem conhecimento prévio sobre os grupos experimentais, em microscópio óptico nas objetivas de 10 e 40 vezes, para determinação do padrão inflamatório. O grau de inflamação foi quantificado usando um escore semi-quantitativo da gravidade das alterações observadas. Os pontos foram distribuídos da seguinte forma: 0-5 para inflamação do parênquima e 0-5 para o infiltrado de polimorfonuclear (0- ausente, 1-mínimo, 2-pouco, 3-moderado, 4-intenso e 5-muito intenso); 0-4 inflamação das vias aéreas e 0-4 inflamação vascular (0-ausência de células inflamatórias, 1- presença de poucas células inflamatórias, 2-presença de inflamação significativa e focalizada, 3- Presença de inflamação disseminada, 4- Inflamação significativa e disseminada). O total do escore histopatológico representa 18 pontos. Campos de imagens representativos de cada grupo foram capturados e fotografados no Microscópio Olympus Bx41 nas objetivas de 400x.

3.2.2.12 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como mediana. As diferenças entre as medianas foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0.05$. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad PRISM 9. As curvas de letalidade, construídas no mesmo software, foram comparadas utilizando o teste Log-rank qui-quadrado.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Tratamento com Ang-(1-7) controla a inflamação durante infecção pneumocócica

Animais infectados com 1×10^4 CFU de *S. pneumoniae* e tratados com 152 $\mu\text{g/Kg}$ de Ang-(1-7)/HP β CD [grupo Ang-(1-7)] ou 92 $\mu\text{g/Kg}$ de HP β CD (grupo veículo – Veh) ou água filtrada (grupo Mock) foram submetidos a eutanásia 48 h após a infecção. O grupo Ang-(1-7) apresentou menor influxo de leucócitos (Figura 8A), sendo estes os neutrófilos nas vias aéreas comparado ao grupo veículo (Veh) (Figura 8C). Não houve diferença no recrutamento de células mononucleares entre os grupos Ang-(1-7) e Veh 48 h após a infecção (Figura 8B). Além disso, observamos menor concentração de proteínas no exsudato alveolar do grupo Ang-(1-7) comparado ao grupo Veh, indicando menor edema pulmonar nos animais tratados com Ang-(1-7) (Figura 8D). Porém não foi possível observar menor atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar do grupo Ang-(1-7) em relação ao Veh (Figura 8E), o que seria complementar a redução de neutrófilos vista nas vias aéreas (Figura 8C). Uma vez que MPO é uma enzima produzida principalmente por neutrófilos, sendo assim uma dosagem indireta de neutrófilos no tecido pulmonar. Indo ao encontro de uma resposta imune controlada, sendo observada, por consequência da administração de Ang-(1-7), houve maior controle pneumocócico no BALF (Figura 8F) e menor disseminação de *S. pneumoniae* para o sangue (Figura 8G).

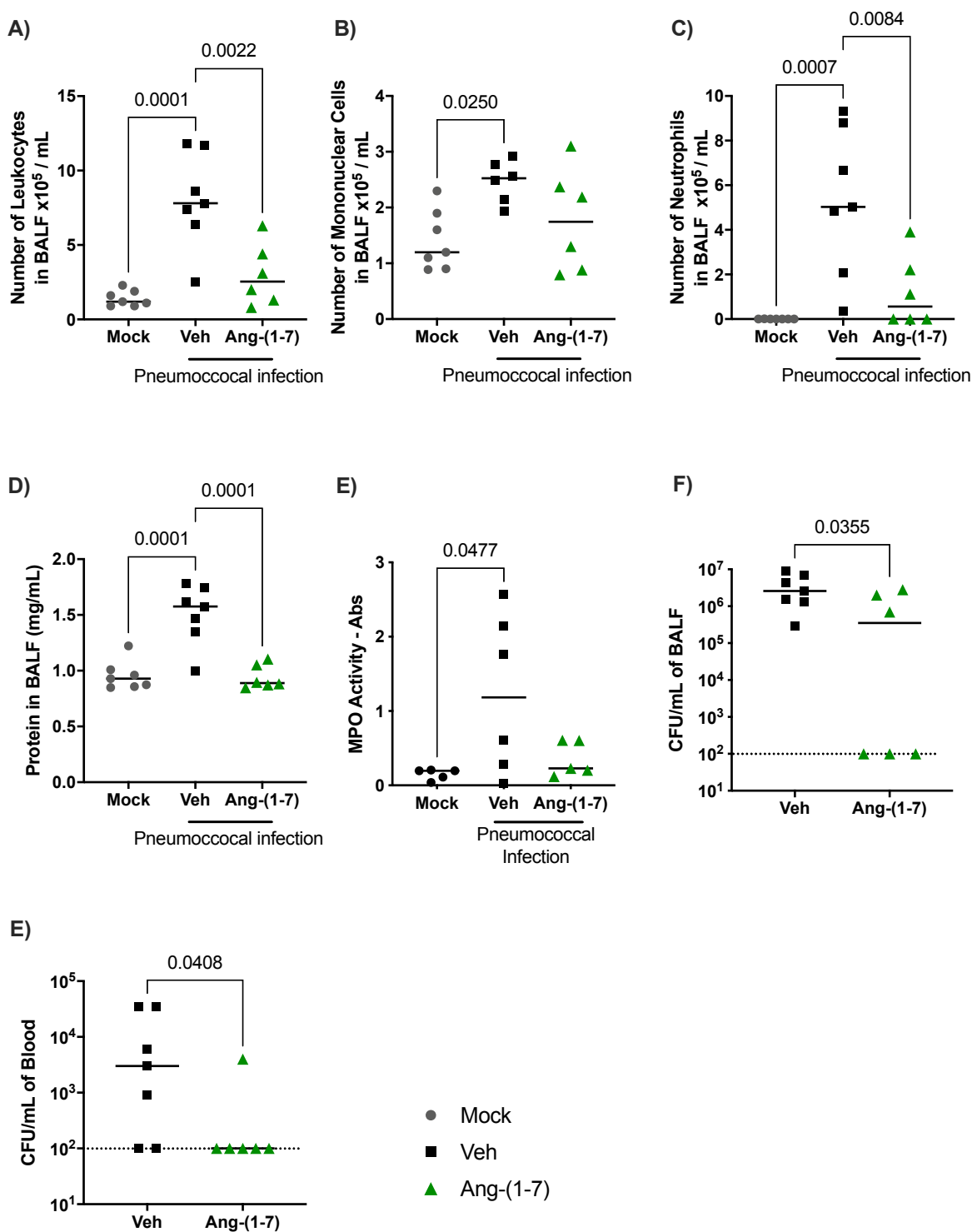


Figura 8: Parâmetros inflamatórios após a infecção por *S. pneumoniae*: leucócitos, edema, carga bacteriana e MPO.

Recrutamento celular, edema e carga bacteriana de animais C57BL/6J infectados com 1×10^4 CFU *S. pneumoniae* e tratados ou não com Ang-(1-7). Contagens de células totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) presentes no BALF após 48 h de infecção. Animais tratados, 12, 24, 36, 48 h após infecção, com 152 μ g/Kg de Ang-(1-7)/HP β CD [grupo Ang-(1-7)] ou 92 μ g/Kg de HP β CD (grupo veículo – Veh). Concentração de proteína no BALF (D), medida da atividade de mieloperoxidase no pulmão (E), número de bactérias presente no

BALF (F) e no sangue (G). Os resultados representam a mediana de 7 animais por grupo com o valor de p sobre os grupos indicados comparados.

3.2.3.2 Animais tratados com Ang-(1-7) apresentaram menores níveis de citocinas e quimiocinas

Para compreender a redução do infiltrado inflamatório e da carga bacteriana em animais tratados com Ang-(1-7), os níveis de citocinas e quimiocinas produzidos foram avaliados. Os animais do grupo Ang-(1-7) reduziram os níveis de CXCL-1 (Figura 9A) que auxilia no recrutamento de neutrófilos, CCL-2 (Figura 9B) que atua no recrutamento de células mononucleares, TNF- α (Figura 9C) e IL-6 consequentes da infecção bacteriana (Figura 9D) em relação ao Veh imunomodulando de forma eficiente a inflamação exacerbada. Diferentemente destas citocinas e quimiocinas analisadas, níveis de IL-10 não foram alterados após a infecção, tanto em Ang-(1-7) quanto no Veh, comparado ao Mock (Figura 9E).

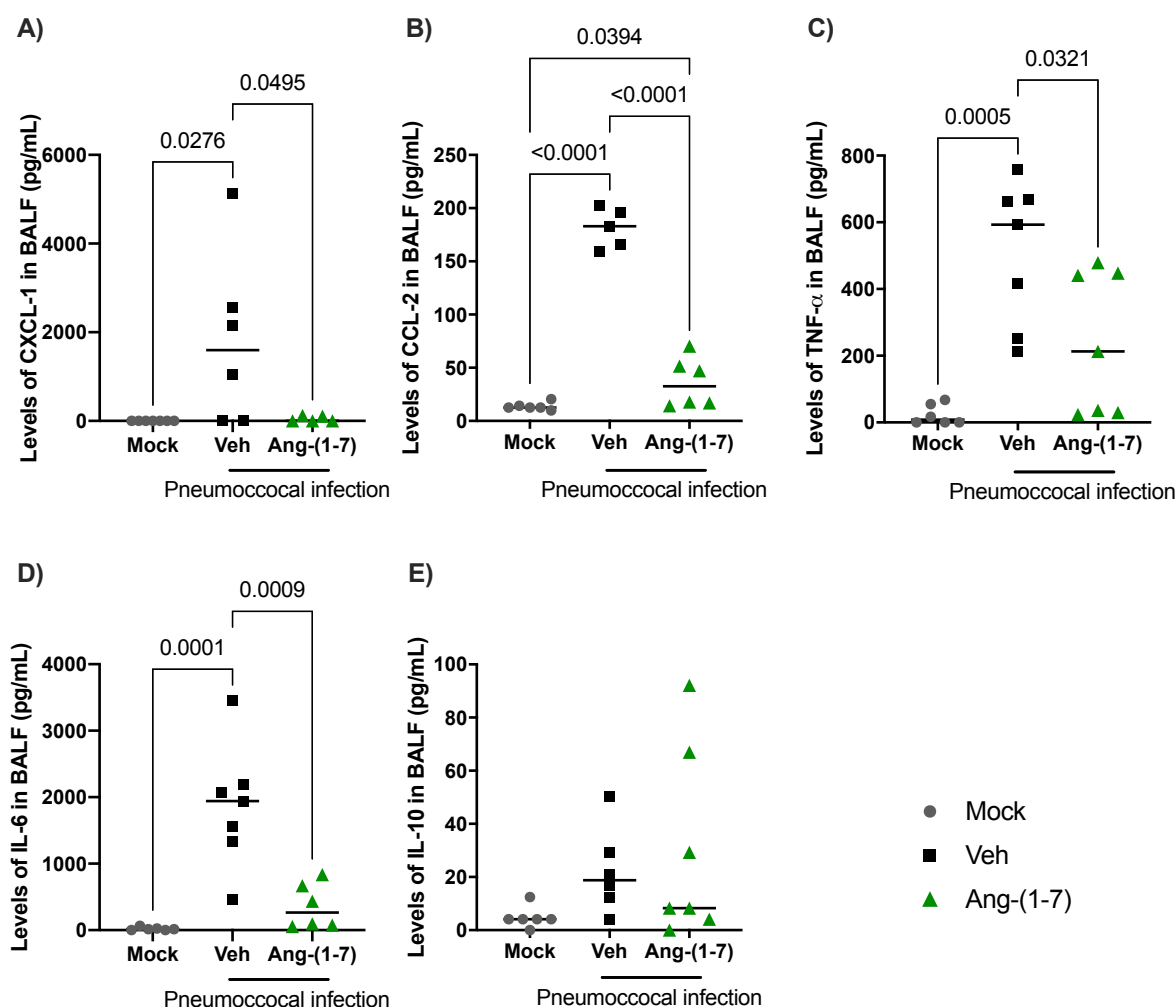
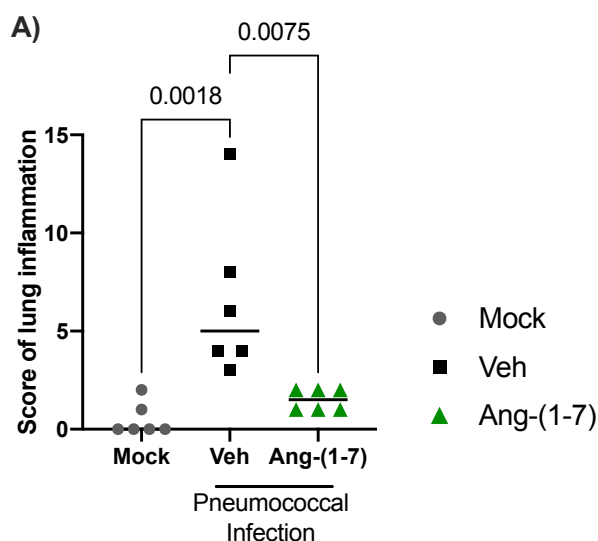


Figura 9: Parâmetros inflamatórios após a infecção por *S. pneumoniae*: dosagem de citocinas e quimiocinas.

Produção de citocinas dos animais C57BL/6J infectados com 1×10^4 CFU *S. pneumoniae* e tratados ou não com Ang-(1-7). Dosagem das citocinas CXCL-1 (A), CCL-2 (B), TNF- α (C), IL-6 (D) e IL-10 (E) presentes no BALF após 48 h de infecção. Animais tratados, 12, 24, 36 e 48 h após a infecção, com 152 $\mu\text{g/Kg}$ de Ang-(1-7)/HP β CD [grupo Ang-(1-7)] ou 92 $\mu\text{g/Kg}$ de HP β CD (grupo veículo – Veh). Os resultados representam a mediana de 7 animais por grupo com o valor de p sobre os grupos indicados comparados.

3.2.3.3 Animais tratados com Ang-(1-7) apresentaram redução do infiltrado inflamatório

Para avaliar o dano pulmonar desencadeado por *S. pneumoniae*, o score histopatológico semi-quantitativo foi avaliado de acordo com o infiltrado inflamatório nas vias aéreas, inflamação vascular, inflamação do parênquima e presença de neutrófilos nos pulmões após a infecção. As análises histopatológicas nas lâminas mostraram que animais tratados com Ang-(1-7) tiveram menor dano tecidual em relação ao Veh (Figura 10A). Em adição, a Figura 10B mostra em fotografias as alterações citadas.



B)

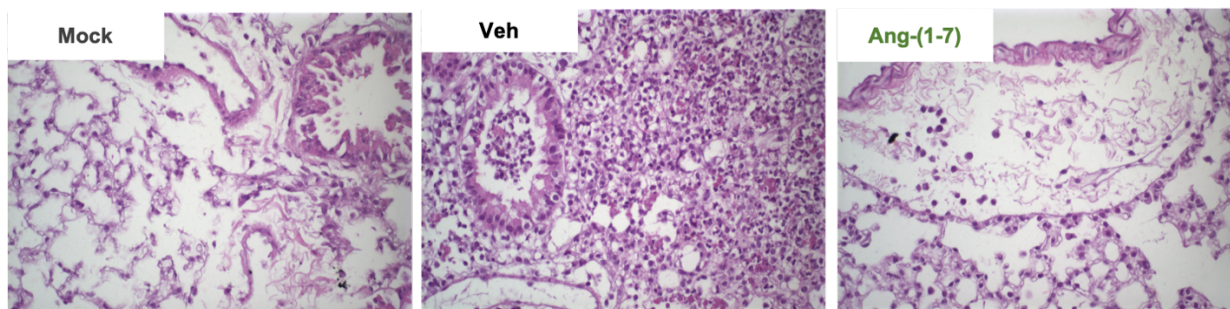


Figura 10: Score histopatológico pulmonar.

Quantificação do score histopatológico do pulmão de animais C57BL/6J infectados com 1×10^4 CFU *S. pneumoniae* e tratados ou não com Ang-(1-7). Score da inflamação nas seções pulmonares no aumento de 400x (A) após 48 h de infecção e sua representação fotográfica (B). Animais tratados, 12, 24, 36 e 48 h após a infecção, com 152 $\mu\text{g/Kg}$ de Ang-(1-7)/HP β CD [grupo Ang-(1-7)] ou 92 $\mu\text{g/Kg}$ de HP β CD (grupo veículo – Veh). Os resultados de (A) representam a mediana de 6 animais por grupo com o valor de p sobre os grupos indicados comparados.

3.2.3.4 Ang-(1-7) não inibe crescimento de *Streptococcus pneumoniae* diretamente

Para compreendermos a diminuição do número de bactéria no BALF e sangue de animais do grupo Ang-(1-7), o caldo de cultura Todd Hewitt acrescido de extrato de levedura foi condicionado com diferentes concentrações de Ang-(1-7) com intuito de observar efeito no crescimento bacteriano. A molécula Ang-(1-7) em diferentes doses não inibiu o crescimento de *S. pneumoniae* durante a sua fase lag, log e estacionária ao longo do tempo analisado comparado ao crescimento no caldo de cultura Todd Hewitt acrescido de extrato de levedura sem condicionamento (grupo Sp vermelho). O antibiótico penicilina-estreptomicina, utilizado como grupo controle do crescimento bacteriano, impediu o crescimento de *S. pneumoniae* em todo o período experimental acompanhado. A figura x da curva de crescimento (Figura 11).

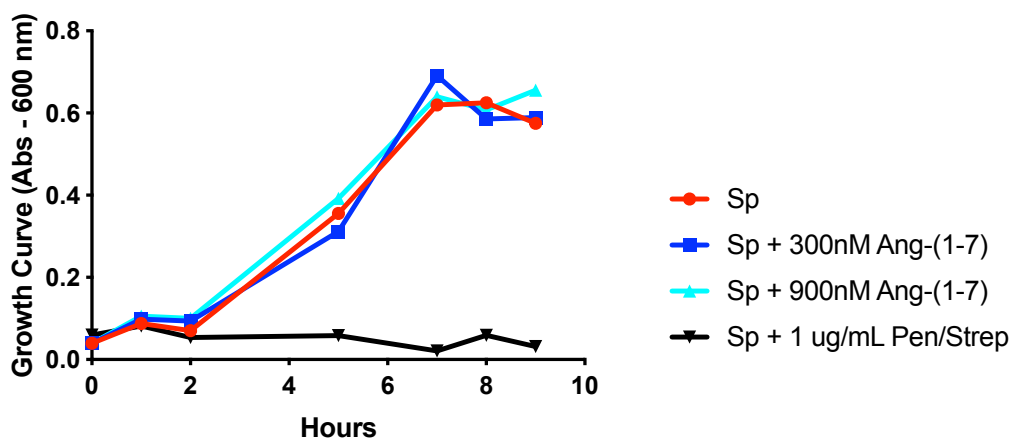


Figura 11: Curva de proliferação bacteriana.

Avaliação da densidade óptica da curva de crescimento de *S. pneumoniae*. Ang-(1-7) a 300 e 900 nM (linha azul escuro e azul claro, respectivamente) foram adicionados em tubos distintos contendo *S. pneumoniae* inicialmente a 0.1 nm de absorbância acompanhado a cada 1 h

durante a fase lag e a cada 30 min durante a fase log até atingir a fase estacionária de crescimento.

3.2.3.5 Ang-(1-7) associado ao antibiótico ceftriaxona preveniu morte em infecção pneumocócica grave

Foi demonstrado que tratamento oral com Ang-(1-7) diminuiu parâmetros inflamatórios e lesão pulmonar durante infecção pneumocócica moderada (1×10^4 CFU de *S. pneumoniae*). Então, em um modelo mais grave e que provoca morte de 100% dos camundongos (1×10^5 / 5×10^5 CFU/C57BL/6), avaliamos o efeito de Ang-(1-7) [152 µg/Kg de Ang-(1-7)/HPβCD – grupo Ang-(1-7)] associado ou não ao antibiótico ceftriaxona (10 mg/kg – grupo ATB) intraperitoneal 60 e 72 h após a infecção em experimento de letalidade. Foi possível observar que Ang-(1-7) associado a ceftriaxona (ATB) preveniu mais de 85% dos animais da morte e houve diferença comparado ao Veh (92 µg/Kg de HPβCD) e ATB. Em contrapartida, animais tratados com Ang-(1-7) (grupos Ang-(1-7) 12 h e Ang-(1-7) 60 h) sucumbiram 6 e 7 dias respectivamente após a infecção, assim como os animais do grupo Veh. O grupo ATB, apesar dos 14% de sobrevivência, não apresentou diferença comparado ao grupo Veh. Figura 12 representa dado de tratamento de Ang-(1-7) e ATB associados em experimento de letalidade.

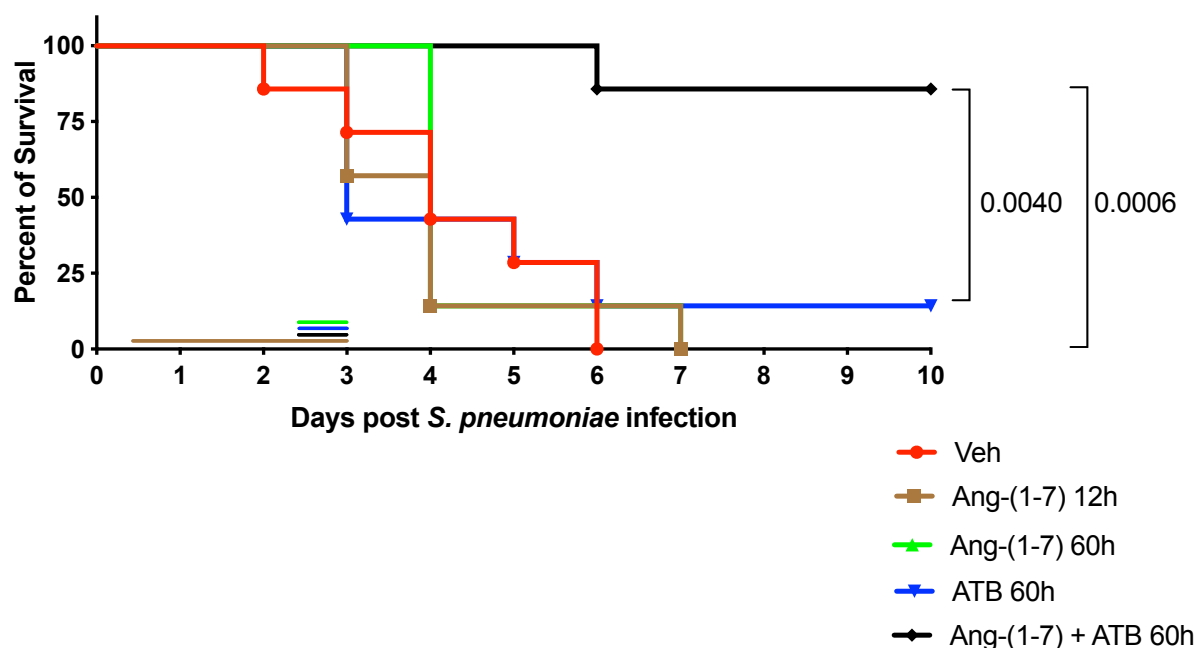


Figura 12: Curva de sobrevivência durante infecção pneumocócica grave.

Curva de sobrevivência observada após a infecção com 5×10^5 CFU de *S. pneumoniae* em camundongos C57BL/6 tratados com Ang-(1-7) [152 µg/Kg de Ang-(1-7)/HPβCD – grupo Ang-

(1-7) 12 h e 60h], ceftriaxona (10 mg/kg – grupo ATB), veículo (92 µg/Kg de HPβCD) e Ang-(1-7) associada a ceftriaxona (grupo Ang-(1-7) + ATB).

3.2.4 Discussão

As infecções no trato respiratório inferior são mostradas como a 4º principal causa de morte no mundo em 2019 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Dentre estas infecções que podem ser causadas por fungos, vírus e bactérias, as provocadas por bactérias são as mais comuns. Sendo *Streptococcus pneumoniae* o principal agente da pneumonia adquirida na comunidade (PAC) levando a 36% dos casos de pneumonia em adultos e entre 30 a 50% em crianças (CDC, C. FOR D. C. AND P., 2021; RUDAN *et al.*, 2008).

Em resposta a infecção por *S. pneumoniae*, frequentemente pulmonar aguda, caracterizada pela inflamação com influxo de neutrófilos e produção de mediadores pró-inflamatórios, pode ser autolimitada eliminando o patógeno e retornando a homeostase tecidual ou pode ser ativando excessivamente o sistema imune com falha na resolução da inflamação provocada pela pneumonia grave (DOCKRELL; WHYTE; MITCHELL, 2012; STEEL *et al.*, 2013; SUGIMOTO *et al.*, 2016). Como consequência dessa inflamação exacerbada, pode haver dano tecidual irreversível, não necessariamente contribuindo para o eliminação bacteriana e podendo provocar até a morte de indivíduos acometidos.

Então, constantemente a eliminação bacteriana por meio do uso de antibiótico não é eficaz, uma vez que o epitélio pulmonar é também danificado devido ao intenso recrutamento e atividade das células do sistema imune no local infectado. Além disso, esse dano pulmonar pode facilitar a disseminação de *S. pneumoniae*. Já as terapias anti-inflamatórias podem apresentar muitos efeitos colaterais no contexto da inflamação provocada pela infecção por *S. pneumoniae*, e a utilização de moléculas pró-resolutivas endógenas, como Ang-(1-7), é uma possibilidade terapêutica que tem chamado atenção no contexto de infecção (MELO *et al.*, 2021).

Ang-(1-7) tem capacidade de modular sistema imune ao reduzir produção de mediadores pró-inflamatórios, promover resolução da inflamação com aumento de apoptose de neutrófilo, eferocitose, migração de monócitos e reprogramação de macrófagos, além de prevenir remodelamento e diminuir dano pulmonar ao se ligar em seu receptor Mas em inflamações agudas e crônicas (BARROSO *et al.*, 2017; DE CARVALHO SANTUCHI *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2021).

Neste trabalho, Ang-(1-7) se mostra eficaz ao controlar infecção pneumocócica moderada reduzindo número de leucócitos, principalmente infiltrado neutrofílico que é quimicamente atraído por CXCL-1 e está reduzida nas vias aéreas 48 h após a infecção. Esta ação também é vista em modelos de artrite, ARDS e fibrose pulmonar (BARROSO *et al.*, 2017; ZAMBELLI *et al.*, 2015). Além de reduzir a produção de CXCL-1, Ang-(1-7) reduziu também CCL-2 – recrutador monócitos – e citocinas IL-6 e TNF- α que conduzem a resposta imune na eliminação de bactéria. Quando IL-6 e TNF- α são aumentadas, há maior susceptibilidade ao desenvolvimento de PAC grave comparado a indivíduos também acometidos pela doença, porém com níveis mais baixos dessas citocinas (YENDE *et al.*, 2005).

As citocinas dosadas refletem a resposta celular após o reconhecimento dos componentes bacterianos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) das células epiteliais e imunes, em seguida as citocinas são regularmente aumentadas após a infecção pneumocócica e o tratamento com Ang-(1-7) foi eficiente em reduzi-las sem alterar a capacidade dos animais acometidos lidarem com a infecção. O que pode ser observado, no grupo Ang-(1-7), com o menor número de *S. pneumoniae* nas vias aéreas, menor dano pulmonar, edema e consequentemente menor disseminação pneumocócica no sangue. Assim como Ang-(1-7), outras moléculas pro-resolutivas são capazes de controlar infecção bacteriana, como Anexina A1 na contra pneumonia pneumocócica e Resolvina D2 em modelo de sepse (MACHADO, M. G. *et al.*, 2020; SPITE *et al.*, 2009). Além disso, no presente trabalho, observamos que o efeito do tratamento é modulando o sistema imune, uma vez que não houve redução em sua curva de crescimento na presença de Ang-(1-7) *in vitro* e apenas *in vivo*.

O controle da resposta inflamatória durante as infecções tem sido uma boa estratégia terapêutica, principalmente quando associada a antibióticos (CHIANG *et al.*, 2012; HOOGENDIJK *et al.*, 2012). Mesmo os antibióticos sendo a principal estratégia terapêutica contra as várias doenças pneumocócicas, a mortalidade associada a PACs continua alta (ESPOSITO; PRINCIPI, 2013). Um dos fatores que contribuem para isso é a liberação dos componentes microbianos de bactérias mortas que superestimulam o sistema imune e consequentemente contribuem para uma inflamação exacerbada (GHONEIM; MCCULLERS, 2014; KARLSTRÖM *et al.*, 2011). Sendo assim, a utilização de terapias associadas pode ser favorável à sobrevivência principalmente durante pneumonia grave da qual somente Ang-(1-7) não foi capaz de lidar, assim como Anexina A1 (MACHADO, M. G. *et al.*, 2020). Nesse contexto,

observamos que ao associar Ang-(1-7) ao antibiótico ceftriaxona, amplamente usado na clínica, foi capaz de prevenir mortes de maneira expressiva comparado ao tratamento apenas com ceftriaxona, também observado com o tratamento rolipram (TAVARES, L. *et al.*, 2016).

3.2.5 Conclusão

Esse estudo sugere que a intervenção farmacológica, via intranasal, com o Angiotensina-(1-7), em camundongos, interfere na resposta inflamatória da infecção moderada por *Streptococcus pneumoniae* por meio da diminuição do recrutamento celular para as vias aéreas, assim como a diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios, bactéria no pulmão e no sangue e consequentemente menor de dano tecidual. Além disso, durante a infecção grave por *S. pneumoniae*, Ang-(1-7) associada ao antibiótico ceftriaxona preveniu notavelmente o número de mortes.

4 CONCLUSÃO GERAL

Infecções no aparelho respiratório inferior são muito frequentes e abordagens terapêuticas diferentes são amplamente estudadas devido a necessidade de reduzir a gravidade dessas infecções. Mediadores pró-resolutivos são moléculas endógenas que apresentam papéis diversos em diferentes doenças inflamatórias, inclusive no contexto pulmonar. Dessa forma, nosso trabalho mostrou que Angiotensina-(1-7) possui um efeito benéfico em contextos infecciosos por Influenza A e *Streptococcus pneumoniae*, além do melhor prognóstico da infecção pneumocócica secundária à gripe.

Referências bibliográficas

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ed. 2015.

ABEYTA, M.; HARDY, G.; YOTHER, J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*, v. 71, n. 1, p. 218–225, 1 jan. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496169/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

AHL, J. *et al.* High incidence of septic shock caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 - a retrospective epidemiological study. *BMC Infectious Diseases* 2013 13:1, v. 13, n. 1, p. 1–7, 22 out. 2013. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-492>>. Acesso em: 1 set. 2021.

AHOOKHOSH, K. *et al.* Development of human respiratory airway models: A review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 145, p. 105233, 30 mar. 2020.

ALBIGER, B. *et al.* Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cellular Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 633–644, 2007.

ALLEN, I. C. *et al.* The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. *Immunity*, v. 30, n. 4, p. 556–565, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.005>>.

AUSTRIAN, R. A brief history of pneumococcal vaccines. *Drugs & aging*, v. 15 Suppl 1, n. SUPPL. 1, p. 1–10, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10690790/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

BARKER, W. H.; MULLOOLY, J. P. Pneumonia and Influenza Deaths During Epidemics. *Archives of Internal Medicine*, v. 142, n. 1, p. 85, 1982. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/601671>>.

BARROSO, L. C. *et al.* Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. NOV, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5701946/>>.

BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 1, p. 51–67, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5242505/>>.

BEIGEL, J.; BRAY, M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Research*, v. 78, n. 1, p. 91, abr. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18419434/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

BELOVA, L. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry. Biokhimiia*, v. 65, n. 12, p. 1337–1345, dez. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11173502/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

BELSHE, R. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine*, v. 28 Suppl 4, n. SUPPL. 4, set. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20713260/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

BENDER, J. *et al.* Pneumococcal necrotizing pneumonia in Utah: does serotype matter? *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 46, n. 9, p. 1346–1352, 1 maio 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18419434/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease. *Lancet Infectious Diseases*, v. 4, n. 3, p. 144–154, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14998500/>>.

BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, v. 26, n. SUPPL. 4, p. 49–53, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19230160/>>.

BRANDILEONE, M.-C. C. *et al.* Increase in numbers of β -lactam-resistant invasive Streptococcus pneumoniae in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 567–574, 1 maio 2006. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46387-0>>. Acesso em: 2 set. 2021.

BROWN, J.; HAMMERSCHMIDT, S.; ORIHUELA, C. *Streptococcus Pneumoniae: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions*. [S.l: s.n.], 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/book/9780124105300/streptococcus-pneumoniae#book-description>>.

BUI, M.; WHITTAKER, G.; HELENIUS, A. Effect of M1 Protein and Low pH on Nuclear Transport of Influenza Virus Ribonucleoproteins. *Journal of Virology*, v. 70, n. 12, p. 8391–8401, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8970960/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

BURGOS, J. *et al.* Risk factors for respiratory failure in pneumococcal pneumonia: the importance of pneumococcal serotypes. *European Respiratory Journal*, v. 43, n. 2, p. 545–553, 1 fev. 2014. Disponível em: <<https://erj.ersjournals.com/content/43/2/545>>. Acesso em: 1 set. 2021.

CALBO, E.; GARAU, J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *International journal of antimicrobial agents*, v. 35, n. 2, p. 107–113, fev. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20005681/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

CAMBERLEIN, E. *et al.* Importance of bacterial replication and alveolar macrophage-independent clearance mechanisms during early lung infection with Streptococcus pneumoniae. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 3, p. 1181–1189, 2015.

CDC, C. FOR D. C. AND P. *The pink book*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>>.

CDC, C. FOR D. C. AND P.; NCIRD, N. C. FOR I. AND R. D. *How Flu Spreads*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/about/disease/spread.htm>>.

CDC, C. FOR D. C. AND P.; NCIRD, N. C. FOR I. AND R. D. *How the Flu Virus Can Change: “Drift” and “Shift”*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>>. Acesso em: 2 ago. 2021.

CDC, N. C. FOR I. AND R. D. *Streptococcus pneumoniae*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/streptococcus-pneumoniae.html>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Pandemic Influenza*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/index.htm>>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Types of Influenza Viruses*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

CHEN, J.; DENG, Y.-M. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virology Journal*, v. 6, n. 1, p. 1–3, 13 mar. 2009. Disponível em:

<<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-6-30>>. Acesso em: 1 set. 2021.

CHIANG, N. *et al.* Infection Regulates Pro-Resolving Mediators that Lower Antibiotic Requirements. *Nature*, v. 484, n. 7395, p. 524, 26 abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22340015/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

COLMAN, P. M.; VARGHESE, J. N.; LAVER, W. G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, v. 303, n. 5912, p. 41–4, 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6188957/>>.

CORRÊA, R. DE A. *et al.* Diretrizes brasileiras para pneumonia adquirida na comunidade em adultos imunocompetentes-2009* Brazilian guidelines for community-acquired pneumonia in immunocompetent adults-2009 Diretrizes da SBPT. *J Bras Pneumol*, v. 35, n. 6, p. 574–601, 2009.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Influenza. *The Lancet*, v. 354, n. 9186, p. 1277–1282, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10520648/>>.

CRAIG, A. *et al.* Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 2, p. 568–575, 2009.

CROUCHER, N. J. *et al.* Selective and Genetic Constraints on Pneumococcal Serotype Switching. *PLOS Genetics*, v. 11, n. 3, p. e1005095, 31 mar. 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005095>>. Acesso em: 1 set. 2021.

DAIGNEAULT, D. *et al.* Influenza A Virus Binding to Human Neutrophils and Cross-Linking Requirements for Activation. *Blood*, v. 80, n. 12, p. 3227–3234, 1 dez. 1992.

DASARAJU, P. V.; LIU, C. Infections of the Respiratory System. *Concise Handbook of Infectious Diseases*. [S.l.]: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. p. 65–65. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8142/>>. Acesso em: 14 set. 2021.

DE CARVALHO SANTUCHI, M. *et al.* Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages in Vitro and in Vivo. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, 2019.

DE SOUSA MARQUES, H. *et al.* Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 7, n. 6, p. 433–434, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3393404/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

DOCKRELL, D.; WHYTE, M.; MITCHELL, T. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest*, v. 142, n. 2, p. 482–491, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22871758/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

DOMÍNGUEZ-CHERIT, G. *et al.* Critically Ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA*, v. 302, n. 17, p. 1880–1887, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19822626/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

DONKOR, E. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 3, n. MAR, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23471303/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

DRIVER, C. Pneumonia part 1: pathology, presentation and prevention. *British Journal of Nursing*, v. 21, n. 2, p. 103–107, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22306639/>>.

EISFELD, A. J.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 28–41, 2014.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25417656/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

ESPOSITO, S.; PRINCIPI, N. Pharmacotherapy for pneumococcal infections: an update. *Expert opinion on pharmacotherapy*, v. 14, n. 1, p. 65–77, jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23256539/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

FARKOUH, R. A. *et al.* Cost–effectiveness models of pneumococcal conjugate vaccines: variability and impact of modeling assumptions. *Expert review of vaccines*, v. 11, n. 10, p. 1235–1247, 10 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erv.12.99>>. Acesso em: 2 set. 2021.

FDA, F. AND DRUG ADMINISTRATION. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - PREVNAR 13*. Disponível em: <[https://www.fda.gov/files/vaccines%2C blood %26 biologics/published/Package-Insert-----Pneumovax-13.pdf](https://www.fda.gov/files/vaccines%2C%20blood%26%20biologics/published/Package-Insert-----Pneumovax-13.pdf)>.

FEHRENBACH, H. Alveolar epithelial type II cell: Defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*, v. 2, n. 1, p. 33–46, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC59567/pdf/RR-2-1-033.pdf>>.

FELDMAN, C.; ANDERSON, R. New insights into pneumococcal disease. *Respirology (Carlton, Vic.)*, v. 14, n. 2, p. 167–179, mar. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19272081/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

FUJISAWA, H. Inhibitory role of neutrophils on influenza virus multiplication in the lungs of mice. *Microbiology and Immunology*, v. 45, n. 10, p. 679–688, 2001.

FULLER, J.; MCGEER, A.; LOW, D. Drug-resistant pneumococcal pneumonia: clinical relevance and approach to management. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, v. 24, n. 12, p. 780–788, dez. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16344922/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

GARCIA, C. *et al.* The development of anti-inflammatory drugs for infectious diseases. *Discovery medicine*, v. 10, n. 55, p. 479–488, 2010. Disponível em: <<https://www.discoverymedicine.com/Cristiana-C-Garcia/2010/12/08/the-development-of-anti-inflammatory-drugs-for-infectious-diseases/>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

GEISTERFER, A.; PEACH, M.; OWENS, G. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation research*, v. 62, n. 4, p. 749–756, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3280155/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

GHEDIN, E. *et al.* Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature*, v. 437, n. 7062, p. 1162–1166, 20 out. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16208317/>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

GHONEIM, H.; MCCULLERS, J. Adjunctive corticosteroid therapy improves lung immunopathology and survival during severe secondary pneumococcal pneumonia in mice. *The Journal of infectious diseases*, v. 209, n. 9, p. 1459–1468, 1 maio 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24273183/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

GILROY, D.; DE MAEYER, R. New insights into the resolution of inflammation. *Seminars in Immunology*, v. 27, n. 3, p. 161–168, 1 maio 2015.

GRABOWSKA, K. *et al.* Occurrence of invasive pneumococcal disease and number of excess cases due to influenza. *BMC Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, p. 1–9, 20 mar. 2006. Disponível em:

<<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-6-58>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

GUILLIAMS, M. *et al.* Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 10, p. 1977–1992, 2013.

GUILLOT, L. *et al.* Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 45, n. 11, p. 2568–2573, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.009>>.

GUILLOT, L. *et al.* Involvement of Toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 7, p. 5571–5580, 2005.

HALSEY, N. A. *et al.* The safety of influenza vaccines in children: An Institute for Vaccine Safety white paper. *Vaccine*, v. 33, p. F1–F67, 30 dez. 2015.

HARTSHORN, K. L. *et al.* Characterization of Influenza A Virus Activation of the Human Neutrophil. *Blood*, v. 75, n. 1, p. 218–226, 1 jan. 1990.

HARTSHORN, K.; WHITE, M. Influenza A virus up-regulates neutrophil adhesion molecules and adhesion to biological surfaces. *Journal of leukocyte biology*, v. 65, n. 5, p. 614–622, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10331489/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HASHIMOTO, G.; WRIGHT, P.; KARZON, D. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza virus-infected cells. *The Journal of infectious diseases*, v. 148, n. 5, p. 785–794, 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6605395/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HASHIMOTO, Y. *et al.* Evidence for Phagocytosis of Influenza Virus-Infected, Apoptotic Cells by Neutrophils and Macrophages in Mice. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 4, p. 2448–2457, 15 fev. 2007. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/178/4/2448>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HILLAIRE, M. L. *et al.* Pulmonary surfactant protein D in first-line innate defence against influenza A virus infections. *Journal of innate immunity*, v. 5, n. 3, p. 197–208, abr. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23391661/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HIRST, R. *et al.* The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clinical and experimental immunology*, v. 138, n. 2, p. 195–201, nov. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15498026/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

HOOGENDIJK, A. *et al.* R-roscovitine reduces lung inflammation induced by lipoteichoic acid and *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, v. 18, n. 1, p. 1086–1095, jul. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22692577/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

HUA, L. *et al.* Cytokine-dependent induction of CD4⁺ T cells with cytotoxic potential during influenza virus infection. *Journal of virology*, v. 87, n. 21, p. 11884–11893, 1 nov. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23986597/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HUET, S. *et al.* Nuclear Import and Assembly of Influenza A Virus RNA Polymerase Studied in Live Cells by Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy †. *Journal of Virology*, v. 84, n. 3, p. 1254–1264, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25867750/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

HUFFORD, M. *et al.* Antiviral CD8⁺ T cell effector activities in situ are regulated by target cell type. *The Journal of experimental medicine*, v. 208, n. 1, p. 167–180, 17 jan. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21187318/>>. Acesso em:

1 set. 2021.

HUFFORD, M. M. *et al.* Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8+ T Cells. *PLOS ONE*, v. 7, n. 10, p. e46581, 8 out. 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046581>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HULSE-POST, D. J. *et al.* Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, v. 102, n. 30, p. 10682–10687, 26 jul. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16030144/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

HUSSAIN, M. *et al.* A longitudinal household study of Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal carriage in a UK setting. *Epidemiology & Infection*, v. 133, n. 5, p. 891–898, out. 2005. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/longitudinal-household-study-of-streptococcus-pneumoniae-nasopharyngeal-carriage-in-a-uk-setting/5B6D30C99116B823D910D99DA49548E4>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HUSSELL, T. *et al.* Co-stimulation: novel methods for preventing viral-induced lung inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, v. 10, n. 8, p. 379–386, 1 ago. 2004. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1471491404001534/fulltext>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

HWANG, I. *et al.* Activation mechanisms of natural killer cells during influenza virus infection. *PloS one*, v. 7, n. 12, 31 dez. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23300570/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

HYAMS, C. *et al.* The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 2, p. 704–715, fev. 2010. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/iai>>. Acesso em: 1 set. 2021.

ICHINOHE, T.; PANG, I. K.; IWASAKI, A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nature Immunology*, v. 11, n. 5, p. 404–410, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1861>>.

ICTV. *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Disponível em: <<https://ictv.global/taxonomy/>>.

IP, D. K. *et al.* The Dynamic Relationship Between Clinical Symptomatology and Viral Shedding in Naturally Acquired Seasonal and Pandemic Influenza Virus Infections. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 62, n. 4, p. 431–437, 4 nov. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26518469/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

IULIANO, A. D. *et al.* Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*, v. 391, n. 10127, p. 1285–1300, 2018. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)33293-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)33293-2/fulltext)>.

JACOBY, P. *et al.* Modelling the co-occurrence of Streptococcus pneumoniae with other bacterial and viral pathogens in the upper respiratory tract. *Vaccine*, v. 25, n. 13, p. 2458–2464, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17030494/>>.

JEGASKANDA, S. *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. *Journal of virology*, v. 87, n. 10, p. 5512–5522, 15 maio 2013. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23468501/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

JORBA, N.; COLOMA, R.; ORTÍN, J. Genetic trans-Complementation Establishes a New Model for Influenza Virus RNA Transcription and Replication. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 5, p. e1000462, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19478885/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

JULKUNEN, I. *et al.* Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 12, n. 2–3, p. 171–180, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11325600/>>.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 12a Ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2013.

KADIOGLU, A. *et al.* The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 288–301, abr. 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro1871>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

KARLSTRÖM, A. *et al.* Toll-like receptor 2 mediates fatal immunopathology in mice during treatment of secondary pneumococcal pneumonia following influenza. *The Journal of infectious diseases*, v. 204, n. 9, p. 1358–1366, 1 nov. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21900488/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

KESHAVARZ, M. *et al.* Influenza vaccine: Where are we and where do we go? *Reviews in medical virology*, v. 29, n. 1, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30408280/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

KHAN, A. *et al.* Endogenous pro- and anti-inflammatory cytokines differentially regulate an in vivo humoral response to *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*, v. 70, n. 2, p. 749–761, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11796608/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

KILLINGLEY, B.; NGUYEN-VAN-TAM, J. Routes of influenza transmission. *Influenza and other respiratory viruses*, v. 7 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 42–51, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24034483/>>. Acesso em: 2 ago. 2021.

KIM, S. *et al.* In vivo activation of rat aortic platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptors by angiotensin II and hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 20, n. 12, p. 2539–2545, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11116050/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

KOHLMEIER, J. E.; WOODLAND, D. L. Immunity to respiratory viruses. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 61–82, 2009.

KOPPE, U. *et al.* *Streptococcus pneumoniae* stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 188, n. 2, p. 811–817, 15 jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22156592/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

KOPPE, U.; SUTTORP, N.; OPITZ, B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cellular microbiology*, v. 14, n. 4, p. 460–466, abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22212419/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

KUBA, K.; IMAI, Y.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 6, n. 3, p. 271–276, 2006.

LAWRENCE, S. *et al.* Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation. *Scientific reports*,

v. 5, 25 set. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26403197/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

LEVY, B. D.; SERHAN, C. N. Resolution of Acute Inflammation In The Lung. *Annual review of physiology*, v. 76, p. 467, fev. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26175732/>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

LIN, K. L. *et al.* CCR2 + Monocyte-Derived Dendritic Cells and Exudate Macrophages Produce Influenza-Induced Pulmonary Immune Pathology and Mortality. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 4, p. 2562–2572, 2008.

LOFANO, G. *et al.* B Cells and Functional Antibody Responses to Combat Influenza. *Frontiers in immunology*, v. 6, n. JUN, p. 336, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26175732/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

LOPUŠNÁ, K. *et al.* Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta virologica*, v. 57, n. 2, p. 171–179, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23600875/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

LOREGIAN, A. *et al.* Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 71, n. 19, p. 3659–3683, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24699705/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

MACHADO, M. G. *et al.* The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. *FASEB Journal*, v. 34, n. 2, p. 2749–2764, 2020.

MACHADO, R. D. P.; SANTOS, R. A. S.; ANDRADE, S. P. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sciences*, v. 66, n. 1, p. 67–76, 26 nov. 1999.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. Orthomyxoviridae. *Fenner's Veterinary Virology*. [S.l.: s.n.], 2017. p. 389–410. Disponível em: <doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00021-0>.

MAGALHAES, G. *et al.* Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma. *Frontiers in immunology*, v. 9, n. JAN, 29 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29434591/>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

MAGALHÃES, G. S. *et al.* Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *British Journal of Pharmacology*, v. 172, n. 9, p. 2330–2342, 2015.

MARRIOTT, H. M. *et al.* Contrasting roles for reactive oxygen species and nitric oxide in the innate response to pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*, v. 25, n. 13, p. 2485–2490, 2007.

MCCULLERS, J. Do specific virus-bacteria pairings drive clinical outcomes of pneumonia? *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 19, n. 2, p. 113–118, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23231363/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

MELO, E. M. *et al.* Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus and post-influenza pneumococcal infection. *Pharmacological research*, v. 163, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33171305/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

MILLAR, E. *et al.* Activity of the renin-angiotensin system in acute severe asthma and the effect of angiotensin II on lung function. *Thorax*, v. 49, n. 5, p. 492–495, 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8016772/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Informe técnico da vacina pneumocócica 10-valente*

(conjugada).

Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_723_infotec.pdf>.

MITCHELL, A.; MITCHELL, T. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 16, n. 5, p. 411–418, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20132250/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

MOFFITT, K. L.; MALLEY, R. Next Generation Pneumococcal Vaccines. *Current opinion in immunology*, v. 23, n. 3, p. 407, jun. 2011. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3109250/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20132250/)>. Acesso em: 2 set. 2021.

MONDAL, A. *et al.* Phosphorylation at the Homotypic Interface Regulates Nucleoprotein Oligomerization and Assembly of the Influenza Virus Replication Machinery. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 4, p. E1004826, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25867750/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

MORENS, D. M.; TAUBENBERGER, J. K. Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine. *Influenza and other respiratory viruses*, v. 4, n. 6, p. 327–337, nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20958926/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

MORENS, D. M.; TAUBENBERGER, J. K.; FAUCI, A. S. Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 198, n. 7, p. 962–970, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18710327/>>.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. *Microbiologia Médica*. 7ed. [S.l.: s.n.], 2014.

NCIRD, N. C. FOR I. AND R. D.; CDC, C. FOR D. C. AND P. *Clinical Features*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/clinical-features.html>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

NEILL, D. *et al.* T regulatory cells control susceptibility to invasive pneumococcal pneumonia in mice. *PLoS pathogens*, v. 8, n. 4, abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22563306/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

NICHOL, K.; TREANOR, J. Vaccines for seasonal and pandemic influenza. *The Journal of infectious diseases*, v. 194 Suppl, n. SUPPL. 2, 1 nov. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17163383/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

PAPADOPOULOS, N. G.; SKEVAKI, C. L. VIRUSES OF THE LUNG. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, p. 483, 1 jan. 2006. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7149659/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17163383/)>. Acesso em: 14 set. 2021.

PARK, J.; LANGMEAD, C. J.; RIDDY, D. M. New Advances in Targeting the Resolution of Inflammation: Implications for Specialized Pro-Resolving Mediator GPCR Drug Discovery. *Cite This: ACS Pharmacol. Transl. Sci*, v. 2020, n. 3, p. 88–106, 2020. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/acspsci.9b00075>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

PASSOS-SILVA, D. G.; BRANDAN, E.; SANTOS, R. A. S. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 36, n. 5, p. 310–320, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.03.001](https://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.03.001)>.

PAULES, C.; SUBBARAO, K. Influenza. *The Lancet*, v. 390, n. 10095, p. 697–708, 2017. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)30129-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)30129-0/fulltext)>.

PECHOUS, R. With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. *Frontiers in cellular and infection microbiology*,

v. 7, n. MAY, 1 maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28507954/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

PINTO, L.; LAMB, R. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *The Journal of biological chemistry*, v. 281, n. 14, p. 8997–9000, 7 abr. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16407184/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

PITTET, L.; POSFAY-BARBE, K. Pneumococcal vaccines for children: a global public health priority. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 18 Suppl 5, n. SUPPL. 5, p. 25–36, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22862432/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

PIZZOLLA, A. *et al.* Pattern recognition receptor immunomodulation of innate immunity as a strategy to limit the impact of influenza virus. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 101, n. 4, p. 851–861, 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.4MR0716-290R>>. Acesso em: 1 set. 2021.

POEHLING, K. *et al.* Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA*, v. 295, n. 14, p. 1668–1674, 12 abr. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16609088/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

RADIN, J. *et al.* beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*, v. 73, n. 12, p. 7827–7835, dez. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16299272/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

RAGO, F. *et al.* Effect of preventive or therapeutic treatment with angiotensin 1–7 in a model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 106, n. 3, p. 677–686, 2019. Disponível em: <<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JLB.MA1218-490RR>>.

REGOES, R. R.; BONHOEFFER, S. Emergence of Drug-Resistant Influenza Virus: Population Dynamical Considerations. *Science*, v. 312, n. 5772, p. 389–391, 21 abr. 2006. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/312/5772/389>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

REHWINKEL, J. *et al.* RIG-I Detects Viral Genomic RNA during Negative-Strand RNA Virus Infection. *Cell*, v. 140, n. 3, p. 397–408, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.020>>.

REICH, S. *et al.* Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature*, v. 516, n. 7531, p. 361–366, 19 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature14009>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

REIS, J. N. *et al.* Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. *Journal of Infection*, v. 57, n. 3, p. 204–213, 1 set. 2008. Disponível em: <<http://www.journalofinfection.com/article/S0163445308002235/fulltext>>. Acesso em: 1 set. 2021.

RÖSLER, B.; HEROLD, S. Lung epithelial GM-CSF improves host defense function and epithelial repair in influenza virus pneumonia—a new therapeutic strategy? *Molecular and Cellular Pediatrics* 2016 3:1, v. 3, n. 1, p. 1–6, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://molcellped.springeropen.com/articles/10.1186/s40348-016-0055-5>>. Acesso em: 1 set. 2021.

ROSSMAN, J. S.; LAMB, R. A. Influenza Virus Assembly and Budding. *Virology*, v. 411, n. 2, p. 229–236, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086653/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

RUDAN, I. *et al.* Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bulletin of*

the World Health Organization, v. 86, n. 5, p. 408–416, maio 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18545744/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

RUSSO, R. C. *et al.* Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 40, n. 4, p. 410–421, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18836137/>>.

SAKAI, T. *et al.* Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. *Nature Publishing Group*, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344335/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

SAMJI, T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *The Yale journal of biology and medicine*, v. 82, n. 4, p. 153–159, dez. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20027280/>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

SAMPAIO, W. O. *et al.* Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, v. 50, n. 6, p. 1093–1098, dez. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17984366/>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

SANTOS, R. A. S. *et al.* The ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews*, v. 98, n. 1, p. 505–553, 2018.

SANTOS, RA *et al.* Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert opinion on investigational drugs*, v. 14, n. 8, p. 1019–1031, ago. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16050794/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

SANTOS, RAS *et al.* The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 316, n. 5, p. H958–H970, 1 maio 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30707614/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual review of immunology*, v. 32, p. 513, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25000000/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

SCOTT, J. *et al.* Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 22, n. 6, p. 973–981, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8783696/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE, M. O que é gripe influenza? Disponível em: <<https://www.saude.mg.gov.br/gripe>>.

SEYOUM, B.; YANO, M.; PIROFSKI, L. The innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the lung depends on serotype and host response. *Vaccine*, v. 29, n. 45, p. 8002–8011, 19 out. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21864623/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

SOEMA, P. C. *et al.* Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 94, p. 251–263, 1 ago. 2015.

SONG, J. Y.; NAHM, M. H.; MOSELEY, M. A. Clinical Implications of Pneumococcal Serotypes: Invasive Disease Potential, Clinical Presentations, and Antibiotic Resistance. *Journal of Korean Medical Science*, v. 28, n. 1, p. 4–15, 8 jan. 2013. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/articles/1022201>>. Acesso em: 1 set. 2021.

SPITE, M. *et al.* Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls

microbial sepsis. *Nature*, v. 461, n. 7268, p. 1287–1291, 29 out. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19865173/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

SRIDHAR, S.; BROKSTAD, K. A.; COX, R. J. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines*, v. 3, n. 2, p. 373–389, 24 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26343192/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

STAEHEL, P. *et al.* Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, v. 44, n. 1, p. 147–158, 17 jan. 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3000619/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

STEEL, H. *et al.* Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. *Mediators of inflammation*, v. 2013, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24453422/>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

STUPKA, J. E. *et al.* Community-acquired pneumonia in elderly patients. *Aging health*, v. 5, n. 6, p. 763, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19865173/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

SUBRAMANIAM, R. *et al.* Delivery of GM-CSF to Protect against Influenza Pneumonia. *PloS one*, v. 10, n. 4, 29 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25923215/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

SUGIMOTO, M. A. *et al.* Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. APR, p. 160, 26 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26343192/>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

SURLS, J. *et al.* Differential effect of CD4+Foxp3+ T-regulatory cells on the B and T helper cell responses to influenza virus vaccination. *Vaccine*, v. 28, n. 45, p. 7319–7330, 21 out. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10012442?via%3Diuhub>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TAN, W. *et al.* Targeting the renin-angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Current opinion in pharmacology*, v. 40, p. 9–17, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29288933/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

TAUBENBERGER, J. K.; KASH, J. C. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation. *Cell Host Microbe*, v. 7, n. 6, p. 440–451, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20542248/>>.

TAUBENBERGER, J.; MORENS, D. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging infectious diseases*, v. 12, n. 1, p. 15–22, jan. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16494711/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TAVARES, L. *et al.* Inhibition of Phosphodiesterase-4 during Pneumococcal Pneumonia Reduces Inflammation and Lung Injury in Mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 55, n. 1, p. 24–34, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26677751/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

TAVARES, L. P.; TEIXEIRA, M. M.; GARCIA, C. C. The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword. *Inflammation Research*, v. 66, n. 4, p. 283–302, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27744631/>>.

THORLUND, K. *et al.* Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC infectious diseases*, v. 11, 19 maio 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21592407/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TOMLINSON, G. *et al.* TLR-mediated inflammatory responses to Streptococcus pneumoniae are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins.

Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 193, n. 7, p. 3736–3745, 1 out. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25172490/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TOPHAM, D.; DOHERTY, P. Clearance of an influenza A virus by CD4+ T cells is inefficient in the absence of B cells. *Journal of virology*, v. 72, n. 1, p. 882–885, jan. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9420305/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TOPHAM, D. J.; TRIPP, R. A.; DOHERTY, P. C. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *The Journal of Immunology*, v. 159, n. 11, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9548456/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TRAVANTY, E. *et al.* Differential Susceptibilities of Human Lung Primary Cells to H1N1 Influenza Viruses. *Journal of Virology*, v. 89, n. 23, p. 11935–11944, 2015.

TRIPATHI, S.; WHITE, M. R.; HARTSHORN, K. L. The amazing innate immune response to influenza A virus infection. *Innate immunity*, v. 21, n. 1, p. 73–98, 4 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24217220/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TROEGER, C. *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Infectious diseases*, v. 17, n. 11, p. 1133–1161, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28843578/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TUOMANEN, E. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Current opinion in microbiology*, v. 2, n. 1, p. 35–39, 1 fev. 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10047549/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

VAN DE SANDT, C.; KREIJTZ, J.; RIMMELZWAAN, G. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*, v. 4, n. 9, p. 1438–1476, set. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23170167/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

VAN DEN BERGH, M. R. *et al.* Associations between Pathogens in the Upper Respiratory Tract of Young Children: Interplay between Viruses and Bacteria. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, p. e47711, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23082199/>>.

VAN DER POLL, T. *et al.* Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *The Journal of infectious diseases*, v. 174, n. 5, p. 994–1000, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8896500/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

VAN DER SLUIJS, K. F. *et al.* Bench-to-bedside review: Bacterial pneumonia with influenza - pathogenesis and clinical implications. *Critical Care* 2010 14:2, v. 14, n. 2, p. 1–8, 19 abr. 2010. Disponível em: <<https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc8893>>. Acesso em: 1 set. 2021.

VAN RIEL, D. *et al.* Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 6, p. 1–9, 2011.

WANG, J. P. *et al.* Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood*, v. 112, n. 5, p. 2028–2034, 2008.

WARTHA, F. *et al.* Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cellular Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 1162–1171, 1 maio 2007. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2006.00857.x>>. Acesso em: 1 set. 2021.

WEBBY, R.; WEBSTER, R. Are we ready for pandemic influenza? *Science*, v. 302, n. 5650, p. 1519–1522, 28 nov. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14645836/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

WEBSTER, R. G. Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic. *Archives of virology. Supplementum*, v. 13, n. 13, p. 105–113, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9413531/>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

WEISER, J. N.; FERREIRA, D. M.; PATON, J. C. Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology* 2018 16:6, v. 16, n. 6, p. 355–367, 29 mar. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-018-0001-8>>. Acesso em: 1 set. 2021.

WHO, G. H. E. *Pneumonia*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>>.

WHO GLOBAL HEALTH ESTIMATES. *The top 10 causes of death*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 16 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Influenza (avian and other zoonotic)*. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic))>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The top 10 causes of death*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2021. Disponível em: <<https://covid19.who.int>>.

XIONG, X.; MCCAULEY, J. W.; STEINHAEUER, D. A. Receptor binding properties of the influenza virus hemagglutinin as a determinant of host range. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 385, p. 63–91, 31 jul. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25078920/>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

YENDE, S. *et al.* Preinfection systemic inflammatory markers and risk of hospitalization due to pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 172, n. 11, p. 1440–1446, 1 dez. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16166617/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

YESILKAYA, H. *et al.* Streptococcus pneumoniae and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 4, p. 187–195, 1 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0966842X13000152/fulltext>>. Acesso em: 2 set. 2021.

YORK, A. *et al.* Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a negative-strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, v. 110, n. 45, p. E4238–E4245, 2013. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1315068110>. Acesso em: 1 ago. 2021.

ZAMBELLI, V. *et al.* Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Intensive care medicine experimental*, v. 3, n. 1, dez. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26215809/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

ZAMBON, M. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 44 Suppl B, n. TOPIC B, p. 3–9, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10877456/>>. Acesso em: 1 set. 2021.

ZAR, H. J. *et al.* Pneumonia in low and middle income countries: progress and challenges. *Thorax*, v. 68, n. 11, p. 1052, nov. 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3960724/>. Acesso em: 18 ago. 2021.

ZHAO, Y. *et al.* Neutrophils may be a vehicle for viral replication and dissemination in human H5N1 avian influenza. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 47, n. 12, p. 1575–1578, 15 dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18990065/>>. Acesso em: 1 set. 2021.