

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós- Graduação em Microbiologia

**“Efeito do tratamento com atorvastatina na pneumonia
experimental induzida por *Klebsiella pneumoniae* em
camundongos”**

Talles Prospero de Paula

Orientadora: Prof. Dra. Danielle da Glória de Souza

Belo Horizonte

2013

Talles Prospero de Paula

**“Efeito do tratamento com atorvastatina na pneumonia
experimental induzida por *Klebsiella pneumoniae* em
camundongos”**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia como pré-requisito
parcial na obtenção do título de
Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Danielle da
Glória de Souza

Belo Horizonte

2013

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro (LIMHO) do Departamento de Microbiologia, o do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Dedico este trabalho a toda minha família e aos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família (em especial, meus pais, meus irmãos e meus queridos avós Deusolinda e Toninho);

A todos meus queridos amigos que me acompanharam durante esta importante trajetória e também ao Lincoln de Oliveira Rondas;

À minha orientadora Prof^a. Dra. Danielle da Glória de Souza;

À Prof^a. Karin Birgitt Botger;

À Prof^a. Vanessa Pinho e a todos os componentes do laboratório do Sistema Linfóide do Departamento de Morfologia;

À Dra. Angélica Tomaz Vieira;

Aos integrantes do Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro em especial àqueles que colaboraram diretamente para a realização deste trabalho: Raquel Duque do Nascimento Arifa, Thiago Vinícius Ávila, Patrícia Campi Santos, Zélia Menezes Garcia, Renata Lacerda Lima, Ludmila de Matos Baltazar, Luana Dourado, Lucas Secchim, Caio Fagundes Tavares, Mila Madeira, Celso Queiroz, Sílvia Weneck, Vívian Vasconcelos; Lívias (Tavares e Resende);

À Gilvânia, nossa técnica querida;

Ao Prof. Cristiano Xavier Lima;

A todos os integrantes do Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB;

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do ICB/UFMG e a todos seus integrantes;

Às agências de fomento Capes, CNPq e Fapemig.

“Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente, mas o que
melhor se adapta às mudanças”

(Charles Darwin)

RESUMO

A pneumonia bacteriana aguda é uma das principais preocupações de saúde pública atual e também uma das maiores causas de infecções nosocomiais no mundo inteiro. Neste contexto, vale ressaltar inúmeros relatos clínicos atuais no Brasil e no mundo acerca de linhagens bacterianas multirresistentes a antimicrobianos de última geração, disseminadas nos ambientes hospitalares. Alguns destes representantes bacterianos Gram negativo, altamente resistentes, incluem algumas amostras de *Klebsiella pneumoniae*. A busca por métodos alternativos, associados à terapia antimicrobiana, capazes de controlar o processo inflamatório inicial da doença e induzir melhora, pode representar ferramenta útil para auxílio no estudo da patogênese da pneumonia. Evidências clínicas e epidemiológicas tentam correlacionar regressão na mortalidade causada por infecções pulmonares bacterianas e virais em pacientes submetidos previamente à terapia com estatinas. As estatinas são fármacos utilizados no controle da dislipidemia, amplamente prescritos para a diminuição do colesterol plasmático. Seu uso demonstra declínio significativo de doenças cardiovasculares, sendo que, muitos estudos paralelos atuais também as correlacionam à proteção durante a incidência de algumas doenças respiratórias e auto-imunes. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos associados ao tratamento com atorvastatina antes e durante a infecção pulmonar experimental em camundongos por *Klebsiella pneumoniae*. O tratamento com atorvastatina mostrou diminuir o influxo de macrófagos e neutrófilos nos pulmões e também a produção de citocinas pró-inflamatórias na fase inicial da infecção em camundongos C57/BL/6. No entanto, não alterou o número de bactérias recuperadas nos pulmões ou no sangue. O pré- tratamento aumentou a fagocitose de bactérias contidas nos neutrófilos presentes no espaço broncoalveolar *in vivo* e de macrófagos *in vitro*. Também demonstramos que a atorvastatina não alterou a produção de ROS em macrófagos fagocíticos. Além disso, os camundongos pós-tratados com a combinação de atorvastatina e imipenem tiveram uma importante redução na mortalidade, em comparação aos camundongos tratados com veículos, atorvastatina ou imipenem de maneira isolada. A hipótese levantada em nosso trabalho é de que o tratamento com atorvastatina poderia auxiliar na antibioticoterapia, controlando respostas inflamatórias iniciais na pneumonia bacteriana experimental, propiciando aumento da sobrevivência.

PALAVRAS-CHAVE: *Klebsiella pneumoniae*, resposta inflamatória, atorvastatina, imipenem, pneumonia.

ABSTRACT

The clinical pathogen *Klebsiella pneumoniae* has still been involved in many nosocomial infections and resistance to the present carbapenic antibiotic treatments. Statins are inhibitors of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) well known for controlling plasmatic cholesterol levels and cardiovascular diseases. Some clinical evidences describe pleiotropic effects of some statins including therapeutic effects on the control of lung inflammation. Here, previous treatment with atorvastatin has shown to decrease cell influx of neutrophils and macrophages to the lungs and also pro-inflammatory cytokines levels in the initial phase of infection with *K. pneumoniae* in C57/BL6 mice. However, atorvastatin did not modify the number of bacteria in the lungs or in the blood, but decreased locally inflammatory responses. Treatment also increased phagocytosis of opsonized bacterium in the neutrophils present in bronchoalveolar space *in vivo* and macrophages *in vitro*. We also intriguingly demonstrated that atorvastatin did not alter ROS production by that phagocytic macrophages. Furthermore, mice post-treated with the combination of imipenem and atorvastatin had an important reduction in mortality compared to mice treated with vehicles, atorvastatin or imipenem alone. The present work hypothesized that pre- and conventional treatment with atorvastatin could be an adjuvant on the treatment of CAPS, capable of increasing survival and controlling initial inflammatory responses. Here, we suggest a screening of patients previously or regularly treated with this statin, in case of Gram negative pneumonia and when submitted to imipenem treatment.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, inflammation, atorvastatin, imipenem, pneumonia.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Fatores de virulência relacionados à <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	20
FIGURA 2	Curvas de letalidade inóculo-dependente e unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas dos pulmões de camundongos C57BL6 infectados por diferentes inóculos de <i>K. pneumoniae</i> .	45
FIGURA 3	Curvas de letalidade de camundongos C57/BL6 infectados com 3×10^6 UFC/mL de <i>K. pneumoniae</i> e submetidos ao tratamento diário com atorvastatina (10 mg/Kg) ou seu respectivo veículo. $P < 0,05$. $N=5$ a 7 por grupo.	46
FIGURA 4	Percentagem de perda de peso e medida do hematócrito em camundongos não infectados tratados com veículos (NI) infectados tratados com veículos (Kp) e infectados tratados com atorvastatina (Atorv).	47
FIGURA 5	Quantificação de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG) 24 h pós-infecção.	48
FIGURA 6	Contagem total e diferencial de células do lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos C57/BL6 tratados ou não com atorvastatina 24h após a infecção com <i>K. pneumoniae</i> .	49
FIGURA 7	Fotos representativas do parênquima pulmonar de camundongo infectado tratado com veículos e de camundongo infectado tratado com atorvastatina 10mg/Kg de peso corporal, 24 horas após a indução (barra corresponde a $100\mu\text{m}$ em aumento de 10X).	51
FIGURA 8	Níveis das citocinas TNF- α e IL-6 e quimiocina CXCL-1 nos pulmões de camundongos C57/BL6 não infectados ou infectados com 3×10^6 CFU/mL de inóculo com <i>K. pneumoniae</i> , pré-tratados com veículo ou atorvastatina 10 mg/Kg dia.	52
FIGURA 9	Níveis das citocinas TNF- α e IL-6 e quimiocina CXCL-1 no lavado broncoalveolar de camundongos C57/BL6 não infectados ou infectados com 3×10^6 CFU/mL de inóculo com <i>K. pneumoniae</i> , pré-tratados com veículo ou atorvastatina 10 mg/Kg dia.	53
FIGURA 10	Níveis das citocinas IL-1 β e IL-10 nos pulmões de camundongos não infectados (NI); camundongos infectados tratados com veículos (veículo) e infectados tratados com atorvastatina.	53
FIGURA 11	Unidades formadoras de colônia (UFC/100 mg de tecido pulmonar ou 100 mL de sangue) de camundongos C57/BL6 infectados com 3×10^6 CFU/mL de <i>K. pneumoniae</i> e submetidos ao tratamento com atorvastatina (10 mg/Kg) ou seu respectivo veículo.	54
FIGURA 12	Índice fagocítico de macrófagos peritoneais pré-tratados ou não com atorvastatina ($100\mu\text{M}$) duas horas após infecção com inóculo de <i>K.</i>	56

pneumonia.

FIGURA 13	Esquema de tratamento com antibiótico imipenem. Unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas nos pulmões de camundongos C57/BL6 infectados tratados com veículo e infectados com 3×10^6 UFC/mL de <i>K. pneumoniae</i> . tratados com antibiótico imipenem 40 mg/Kg 12h após infecção.	58
FIGURA 14	Combinação de tratamentos (pré-tratamento com atorvastatina e pós-tratamento com imipenem) na letalidade.	59
FIGURA 15	Níveis de mieloperoxidase e número de neutrófilos no lavado broncoalveolar em camundongos infectados tratados com veículos (Kp), tratados com imipenem e veículos (IMI), ou tratados com atorvastatina e veículos (Ator) ou com a combinação atorvastatina e imipenem.	60
FIGURA 16	PBMCs (polimorfonucleares provenientes da medula óssea) de camundongos não infectados, infectados tratados com imipenem e atorvastatina em separado e com a combinação de imipenem e atorvastatina.	61

TABELAS:

TABELA 1	Perfil fagocítico de polimorfonucleares provenientes do lavado broncoalveolar de camundongos infectados, tratados ou não com atorvastatina.	55
TABELA 2	Índice fagocítico e produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e NO (óxido nítrico) por macrófagos <i>in vitro</i> infectados ou não por <i>K. pneumoniae</i> .	57

ANEXOS:

ANEXO 1: Produção de ROS em macrófagos peritoneais infectados e tratados com atorvastatina ou inibidor de Rac GTPases 1 e 2b (EHT 1864) - p.91.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL: lavado broncoalveolar

BSA: soro albumina bovina

C57BL/6J: linhagem de camundongos *C57 black/6J*

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

CCR (): *Chemokine (C-C motif) Receptor ()* – receptor () de quimiocinas com motivo CC

CXCL (): *Chemokine (CXC motif) Ligand ()* – quimiocina ligante () com motivo CXC

CXCR (): *Chemokine (CXC motif) Receptor ()* receptor () de quimiocinas com motivo CXC

DAG: Diacilglicerol

DL-50: Dose Letal que representa a letalidade de 50% da população estudada

DMEM: *Dulbecco's Modified MeioEagle's Medium*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ICAM-I: molécula de adesão intercelular-I

IFN-(): Interferon

IgG: Imunoglobulina G

IL-(): interleucina-()

KC: *Keratinocyte Chemokine- quimiocina de queratinócitos*

MCP-(): *Monocyte chemotactic protein-()-proteína quimiotática de monócitos*

MIP-(): *Macrophage Inflammatory Protein-()*

MPO: Mieloperoxidase

NADPH: *Nicotinamida adenina dinucleotídiofosfato.*

NAG: N-acetil-glicosaminidase

NF-κB: *Nuclear Factor kappa B*

ng/mL: nanograma/mililitro

NK: *Natural Killer* – células matadoras naturais

NKT: *Natural Killer T cell* - células T matadoras naturais

PAF: Fator de Ativação Plaquetária

MAMPs: Microbe-associated molecular patterns

PBS: *Tampão fosfato salina*

CFU: unidade formadora de colônias

PKC: *Protein Kinase C* – proteína cinase C

PL(): *PhosphoLipase ()* – fosfolipase ()

PMSF: *phenylmethylsulphonyl fluoride*

RAC GTPases: *Rho A guanosina trifosfato fosfatases*

ROS: espécies reativas de oxigênio

RPMI 1640: meio de cultura desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*

TLR(): *Toll like receptor* – receptor do tipo Toll

TMB: tetrametilbenzidina

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha* – fator de necrose tumoral alfa

Tris/HCl: tampão tris hidroximetil aminometano com ácido clorídrico

OMS – Organização Mundial de Saúde .

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas

Sumário	Página
1) Introdução e revisão de literatura.....	16
1.1 Pneumonia pulmonar, incidência e dados epidemiológicos.....	16
1.2 O patógeno <i>Klebsiella pneumoniae</i> e os antibióticos carbapenêmicos.....	18
1.3 A pneumonia e a resposta inflamatória.....	22
1.4 Potencial terapêutico das estatinas em doenças respiratórias e reposição de fármacos.....	27
2) Objetivos.....	32
2.1 Objetivos específicos.....	32
3) Material e Métodos.....	32
3.1 Animais.....	34
3.2 Modelo experimental de infecção por <i>K.pneumoniae</i>	34
3.3 Pré-tratamento com atorvastatina e pós-tratamento com imipenem.....	35
3.4 Lavado Broncoalveolar (BAL).....	35
3.5 Análise de hematócrito	36
3.6 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)...	36
3.7 Homogenato de tecido	37
3.8 Ensaio de MPO	37
3.9 Ensaio de NAG.....	39
3.10 Quantificação de citocinas/quimiocinas.....	40
3.11 Histologia.....	40
3.12 Obtenção de macrófagos para cultura.....	41
3.13 Ensaio de fagocitose.....	42
3.14 Avaliação da produção de ROS e dosagem de ROS.....	42
3.15 Análises estatísticas.....	43
4) Resultados	44
5) Discussão	72

6) Referências Bibliográficas.....	73.
---	------------

1) INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA:

1.1) Pneumonia: incidência e dados epidemiológicos:

A pneumonia é uma doença grave associada à infecção das células do parênquima pulmonar, podendo acometer estruturas respiratórias tais como brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares. Sua incidência está relacionada a múltiplos fatores, tanto endógenos como ambientais e seu agravamento clínico pode ser fatal. Seus principais sintomas incluem febre alta, dificuldade para respirar, dor torácica, fraqueza, tosse seca, entre outros (MIZGERD, 2008; WELTE; KOHLEIN, 2009; FILE e MARRIE; 2010; BARTEN et al., 2010).

As pneumonias adquiridas na comunidade (CAPs - *community acquired pneumonia*) constituem uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo inteiro (PINNEN et al., 1996; WELTE, KOHLEIN, 2009; OMS, 2010). Na América do Norte gera um custo anual de 17 a 23 bilhões de dólares por ano (revisões em RUIZ et al., 2000; FILE e MARRIE, 2010; RUUSKANEM et al., 2011). A cada ano, o número de pessoas acometidas ultrapassa três milhões e estimativa de óbitos em torno dos 40.000 a 70.000 nos Estados Unidos (MIZGERD, 2008). Na América Latina, dados epidemiológicos demonstram que as CAPS representam a terceira maior causa de mortalidade em adultos hospitalizados e sua percentagem gira em torno de 6% (ISTURIZ et al., 2010). Nesse contexto, vale salientar que a mortalidade entre os pacientes acometidos tratados fora do ambiente hospitalar é relativamente baixa (<2%), enquanto este índice aumenta de 5 a 20% em pacientes hospitalizados. Esta

situação é ainda mais agravante naqueles pacientes submetidos à terapia intensiva, onde os percentuais de mortalidade podem atingir níveis acima de 50% (WELTE; KOHNLEIN, 2009). Além disso, a mortalidade infantil pode chegar a 26 milhões por ano, em dados destacados principalmente nos países considerados em desenvolvimento (OMS, 2010). Vale ressaltar também que algumas pneumonias possuem períodos de incubação lentos e sintomas dificilmente diagnosticáveis (KELLY et al., 2002; revisão em MIZGERD, 2006; 2008).

A prevalência desta doença da aspiração endógena de microrganismos residentes da orofaringe, ou inalação de partículas do meio externo contendo os micro-organismos envolvidos na doença (PODSHUM, ULMANN 1999). Estes incluem vírus, fungos e bactérias Gram positivo e Gram negativo. Dentre as bactérias, merecem destaques representantes como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae* (revisão em PATEL et al., 2008), envolvidos na patogênese da pneumonia. Estas espécies bacterianas continuam sendo responsáveis por cerca de 5 a 10% dos casos agudos de pneumonias graves em ambientes hospitalares (KARNARD et al., 1985; TUDOSE et al., 2010). Além disso, vale ressaltar a importância da pneumonia induzida por agentes múltiplos, como na co-infecção (bactéria-bactéria, vírus-bactérias, fungos-vírus, bactérias-fungos). A especial atenção tem sido dada a co-infecção com o vírus Influenza, devido ao número de casos envolvendo este micro-organismo (HALASA et al., 2010; MCCULLERS et al., 2008; SHAHANGIAN et al., 2009).

A gravidade desta doença torna-se ainda mais alarmante quando levamos em conta os diferentes tipos de genes de resistência a antibióticos, adquiridos pelos tipos bacterianos relacionados. Entre eles, destacamos novamente *K. pneumoniae* (PATERSON, 2004), como um microrganismo que vem adquirindo nos últimos anos, múltiplos genes de resistência a diferentes tipos de agentes β -lactâmicos, frequentemente utilizados na prática clínica (revisão em KALAN, WRIGHT, 2011). Os surtos recentemente constatados em ambientes hospitalares de diversas partes do mundo envolvendo a bactéria produtora de *K. pneumoniae carbapenase* (KPC), enzimas que conferem resistência aos carbapenêmicos como meropenem e imipenem, são inerentes à esta questão, sendo portanto uma das principais causas de preocupação em saúde pública nos últimos anos (revisões em ARMAND et al., 2009; NORDMANN et al., 2009; KALAN e WRIGHT, 2011).

1.2) *Klebsiella pneumoniae* e os antimicrobianos carbapenêmicos:

Espécies do gênero *Klebsiellas* são bacilos Gram negativo, aeróbios, imóveis, capsulados e ubíquos na natureza, podendo ser isolados comumente em dois habitats distintos: o meio ambiente ou as superfícies de epitélios de muitos mamíferos hospedeiros. Em seres humanos, a espécie *Klebsiella pneumoniae*, um micro-organismo com comportamento oportunista é residente principalmente na nasofaringe e no trato digestivo, mas, algumas linhagens de *K. pneumoniae* são altamente patogênicas, sendo responsáveis por processos infecciosos pulmonares, no trato urinário, meningites e dermatoses (PODSHUM; ULMANN, 1998, 1999).

K. pneumoniae pode expressar vários fatores de virulência, incluindo desde polissacarídeos capsulares antifagocíticos (CORTÉS et al., 2002), até diferentes sorotipos de LPS (lipopolissacarídeos) ou CPS (polissacarídeos capsulares) importantes na pneumonia por *K. pneumoniae* (PODSHUM, ULMANN et al., 1999; SHANKAR-SINHA et al., 2004) ; adesinas contidas nas estruturas como *pilli* e fímbrias e sideróforos (PODSCHUN and ULMAN 1999; CORTÉS et al., 2002; LAWLOR et al., 2005). CANO et al., 2009; demonstraram que diferentes polissacarídeos da membrana, em diferentes linhagens de *K. pneumoniae* estão relacionados a variados graus de virulência. Além disso, sua citotoxicidade não está diretamente relacionada à sua aderência às células hospedeiras. Estes dados sugerem que fatores de virulência adicionais liberados ou secretados pela bactéria, juntamente com os polissacarídeos capsulares também possam estar envolvidos na patogênese da pneumonia por *K. pneumoniae* (LEE et al., 2012). Os fatores de virulência mencionados anteriormente estão representados esquematicamente na Figura 1. Vale ressaltar que a virulência de uma amostra de *K. pneumoniae* pode ser também determinada pelos mecanismos induzidos pelo sistema de secreção de proteínas. No gênero *Klebsiella* podemos incluir principalmente o sistema de secreção do tipo II (TSS2) e do tipo IV que são capazes de induzir lise de membranas, poros mediados por caspases do hospedeiro, destruição de tecidos ou lise de vacúolos (REYSS et al., 1990; SARRIS et al., 2011).

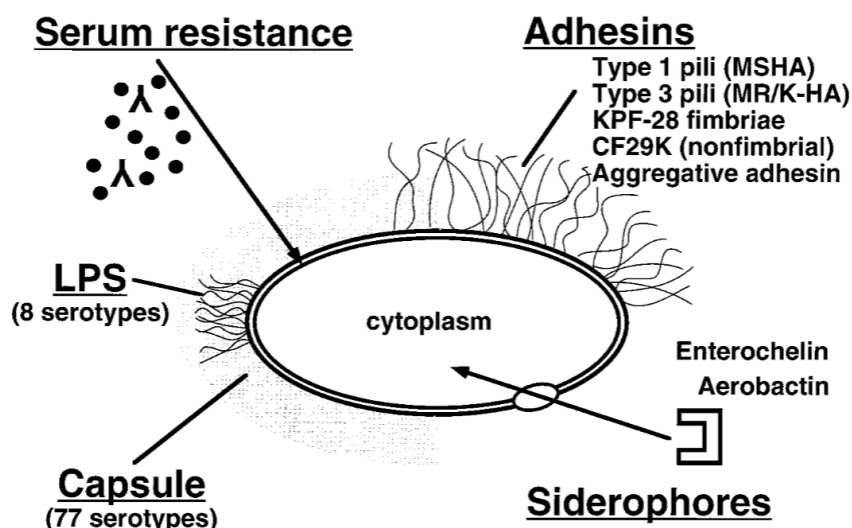


FIG. 1. Schematic representation of *Klebsiella* pathogenicity factors.

FIGURA 1: Esquema sobre os fatores de patogenicidade em *K. pneumoniae*. Fonte: Podschum, Ulmann, 1998. V.11, p.596.

Os antimicrobianos carbapenêmicos, pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos, são os mais frequentemente utilizados para controlar infecções nosocomiais causadas por microrganismo Gram negativo multirresistentes como *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* (NORDMANN et al., 2009; KALAN, WRIGHT, 2011). Estes antimicrobianos possuem atividade bactericida de amplo espectro e melhor estabilidade diante das betalactamases, o que os diferencia dos outros betalactâmicos (NORDMANN et al., 2009). Eles são capazes de se ligarem às proteínas fixadoras de penicilina presentes na parede bacteriana, principalmente as PBP1 e PBP2, provocando a lise osmótica da bactéria devido à facilidade de penetração pelos canais porínicos, nas bactérias Gram negativas (PAPP-WALLACE et al., 2011). Dessa maneira,

induzem um efeito pós-antibiótico, pelo qual as bactérias que não foram mortas só voltam a se multiplicar após duas a quatro horas, mesmo com a droga em sua concentração abaixo do nível inibitório. Os carbapenêmicos como imipenem e o meropenem são recomendados como antibióticos de primeira linha na terapia de uma série de doenças nosocomiais graves causadas por enterobactérias, embora ainda haja a preocupação sobre a emergência de cepas altamente resistentes, incluindo arsenal enzimático como imipenases (NORDMANN et al., 2009). O imipenem foi descoberto, em 1979, como um derivado mais estável, inicialmente denominado N-formimidóil-tienamicina. No entanto, sofre a ação de uma enzima renal, a dipeptidase, que provoca hidrólise e inativação da droga. (PAPP-WALLACE et al., 2011). A descoberta da cilastatina resolveu essa questão pela sua alta afinidade com a enzima, impedindo o metabolismo renal do antimicrobiano. Assim, este pode atingir alta concentração na urina e menor toxicidade sistêmica. Portanto, a apresentação disponível é o imipenem associado à cilastatina. Um novo antimicrobiano desse grupo foi descoberto em 1987, o meropenem, com o mesmo espectro de ação do imipenem, porém com maior estabilidade à ação da dipeptidase renal. Devido à presença de um grupamento metila no carbono 1, o meropenem dispensa a necessidade de um inibidor enzimático (NICOLAU et al., 2008)

Como já relatado, muitas amostras de *K. pneumoniae* atingiram alto grau de variabilidade. Hoje são relatados inúmeros genes de resistência aos antimicrobianos, que variam em tamanho e estrutura e encontram-se contidos geralmente em plasmídeos, mas também em transposons; caracterizados como genes *bla_{kpc}* (PATERSON et al., 2004). Os genes *bla_{kpc}* são os mais frequentemente identificados em *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, mas também

são descritos em outras enterobactérias como *E. coli*, *Salmonella cubana*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis* (NORDMANN et al., 2009).

As duas principais enzimas associadas à resistência são codificadas em plasmídeos e classificadas em dois tipos: AmpC β lactamases (cefaloporinas) ou ESPLP-carbapenemases (hidrolases específicas dos carbapenêmicos). O mecanismo de ação destas duas enzimas envolve predominantemente a quebra enzimática ou degradação das moléculas dos antimicrobianos carbapenêmicos tornando-os modificados e inativos (NORDMANN et al., 2009).

1.3) A pneumonia e a resposta inflamatória:

A instalação da pneumonia no organismo depende do estado imunológico do paciente e fatores etários, sendo que crianças e idosos são os mais afetados pela doença (WELTE, KOHNLEIN, 2009). A resposta inflamatória apropriada é essencial para a defesa do hospedeiro contra os estímulos infecciosos (TEIXEIRA et al., 2001). A ativação e recrutamento de leucócitos são necessários para o processamento e apresentação de antígenos, na manutenção da função efetiva de qualquer resposta imune. Na ausência de inflamação, a letalidade é comum após a exposição ao agente infeccioso. Por outro lado, a inflamação excessiva ou descontrolada pode causar morte após a infecção. São muitas as doenças relacionadas a respostas inflamatórias desapropriadas, devido a diversos estímulos (LIBBY, 2002; WEINER; SELKOE 2002 ; VILCEK & FELDMAN, 2004, MEDHZITOV et al., 2009; 2011).

Macrófagos alveolares, bem como neutrófilos, são dotados de mecanismos capazes de reconhecer os micro-organismos associados à pneumonia e exercer atividade fagocítica específica, pela utilização ou liberação de mediadores inflamatórios e complexos enzimáticos (SEREZANI et al., 2005; SOARES et al., 2006; CAI et al, 2010).

Diferindo de outras pneumonias, a induzida por *K. pneumoniae* sofre resolução lenta, com tendência a se tornar crônica (DOYLE et al.,1997).

K. pneumoniae é classicamente reconhecida por de receptores FcγR após sua opsonização (SEREZANI et al., 2005). Este reconhecimento envolve vias de sinalização ativadas por TLR-2 e principalmente TLR4. Primariamente, a infecção por *K. pneumoniae* patogênica não gera a indução da expressão de NF-KB e ativação de MAPKs pelas células epiteliais, até que as bactérias atinjam o micro-ambiente alveolar, onde é capaz de se estabelecer. Neste contexto, um estudo anterior demonstrou que o receptor intracelular NOD1 é requerido e importante para induzir a ativação de MAPK-1 e NF-KB (REGUEIRO et. al., 2010). Além disso, esta deficiência na produção de MyD88 e TRIF em camundongos está correlacionada a uma aumento na letalidade e na carga bacteriana nos pulmões, sendo estas moléculas imprescindíveis no estabelecimento do processo inflamatório (LIESHOUT et al., 2012). Dessa forma, podemos concluir, que uma vez que a bactéria chega no pulmão, ela é reconhecida por diferentes receptores de padrões moleculares (PRRs) e a partir disso, o hospedeiro é capaz de montar uma resposta inflamatória com a produção de vários mediadores inflamatórios.

De forma interessante, alguns estudos recentes demonstraram um importante papel de vesículas secretoras (*outer membrane vesicles* - OMV), frequentemente produzidas e secretadas por micro-organismos gram negativos como *K. pneumoniae*. Estas vesículas, por sua vez, seriam veiculadoras de fatores de virulência e padrões de reconhecimento moleculares “empacotados”, atuando em receptores contidos em células apresentadoras de antígenos e fagócitos, antes da infecção propriamente dita ocorrer. Dessa forma, as OMVs seriam importantes na regulação da resposta imune inata durante infecção por *K. pneumoniae* (KULP et al., 2005 e 2010). Outro estudo recente mostrou que as OMVs induziam respostas primárias de moléculas pro-inflamatórias como IL-1 β e IL-8 em células epiteliais *in vitro*. Ainda neste mesmo estudo, a administração intratraqueal destas OMVs provenientes de *K. pneumoniae* em camundongos, induziu aumento significativo na produção de IL-1 β e IL-8 no tecido pulmonar, através de uma resposta dose dependente durante a infecção pulmonar (LEE et al., 2012) .

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar o papel de mediadores inflamatórios na resposta a infecção por *K. pneumoniae* (SOARES et al., 2002, 2006; REGUEIRO et al., 2008; CAI et al., 2010; FAGUNDES et al., 2011). Entretanto, os mecanismos envolvidos com a produção/atividade desses mediadores ainda não estão bem elucidados e merecem grande atenção. Dentre os mediadores inflamatórios liberados durante a infecção por *K. pneumoniae* podemos destacar as citocinas e quimiocinas. As citocinas possuem papel importante na infecção pulmonar por *K. pneumoniae* (CAI et al., 2010, POE et al., 2013) uma vez que na ausência de citocinas, como TNF- α (MOORE et al., 2003) e IL-6 (YOSHIDA et al., 2001; SUTHERLAND et al.,

2008) os animais se tornam mais susceptíveis à infecção. As citocinas podem agir por vários mecanismos, entre eles a estimulação da produção de radicais livres: espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (principalmente o NO); destacando o complexo NADPH oxidase (SEREZANI et al., 2004) e indução da produção de quimiocinas como CXCL-1, CXCL-2 e CXCL-5 (TSAI et al., 1998; SOARES et al., 2003; 2006; CAI et al. 2010). Camundongos deficientes na produção de CXCL-1 apresentam menor percentagem de mortalidade diante à infecção, comparando-se com animais selvagens; além de exibirem diminuição no recrutamento de polimorfonucleares para o pulmão. Além disso, os camundongos também apresentaram aumento da carga bacteriana no parênquima pulmonar 48 horas após a indução da infecção. Neste mesmo contexto, também se demonstrou que CXCL-1 é importante para a expressão secundária de outras quimiocinas tais como CXCL-2 e CXCL-5. Além disso, ativação de seus receptores vem seguida da ativação de MAPKs e NF-KB (CAI et al., 2010).

As citocinas também são importantes na produção de mediadores lipídicos e esses podem exercer papel crucial na infecção por *K. pneumoniae*. Neste contexto podemos destacar o LTB4 (MANCUSO et. al., 1998; MANCUSO; PETERS-GOLDEN; 2000) e o PAF (SOARES et. al., 2002). De forma geral, a ausência desses mediadores também está associada a um aumento da susceptibilidade a infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*, uma vez que o bloqueio dos receptores de PAF ou LTB4, induz uma falência no recrutamento de leucócitos e conseqüentemente aumento da carga bacteriana.

Dessa forma podemos concluir que a resposta inflamatória possui papel essencial na proteção à infecção. A resposta inflamatória é orquestrada por vários mediadores inflamatórios, conforme descrito acima, o que culmina com o recrutamento e ativação celular responsável pela fagocitose e *killing* bacteriano. Nesse contexto, as citocinas ganham papel de destaque, uma vez que podem desencadear todo o processo inflamatório. Porém, vale ressaltar que os mecanismos associados a infecção ainda não são bem elucidados. Como descrito anteriormente, a produção de um mediador culmina com a produção de outro, o que exacerba a resposta inflamatória. Entretanto, a cascata pelo qual os mediadores são liberados permanece como objeto de estudo. Apesar da importância na resposta inflamatória, sabe-se que a exacerbação da mesma está relacionada com dano tecidual, aumento das lesões induzidas e morte (TEIXEIRA et al., 2001). Esses efeitos contraditórios dos mediadores inflamatórios nos instiga a entender como a resposta inflamatória poderia ser controlada sem, entretanto, estar associada com aumento da carga bacteriana. Vários grupos demonstram que o uso de drogas que inibam a inflamação exacerbada, sem, contudo, bloquear a capacidade do hospedeiro em lidar com a infecção pode ser importante alvo terapêutico (POE, et al.2013).

Um estudo publicado recentemente aponta um importante papel de células da linhagem monocítica residente alveolar (*MDSC-myeloid-derived suppressor cells*) atuando especificamente na resolução da infecção por *K. pneumoniae* em camundongos da linhagem C57BL/6. Tais células controlam a eferocitose (fenômeno da fagocitose controlada de neutrófilos apoptóticos da fase aguda) pela produção de IL-10 na fase tardia. Estas células intra-alveolares residentes

possuem fenótipo estabelecido como CD11b⁺Gr1^{int}F4/80 e são semelhantes à linhagem mielóide de células supressoras atuando na regulação da expressão de STAT-1 (*infection signal transducer and activator of transcription 1*). Neste mesmo contexto, estes autores discutem estratégias de inibição de STAT-1 em combinação com o uso de antimicrobianos como nova estratégia terapêutica na melhora de pacientes com resolução ineficiente deste tipo de pneumonia (POE et al., 2013).

1.4) Potencial terapêutico das estatinas em doenças respiratórias e o reposicionamento de fármacos.

As estatinas são fármacos amplamente utilizados, prescritos para o tratamento de hiperlipidemias e que atuam no controle dos níveis de colesterol plasmáticos, reduzindo com isso, os índices de mortalidade por doenças cardiovasculares, principalmente coronarianas (revisão em HOTHERSALL et al., 2006; CHOW et al., 2010). São compostos moleculares inibidores da 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA), imprescindível na biossíntese de colesterol, que inibem a conversão do mevalonato (HOTHERSALL et. al, 2006). Essa inibição reduz a secreção das lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apo-B) que, por sua vez, aumentam a síntese do receptor de LDL e diminuem seus níveis plasmáticos (ENDO 1992). Esta inibição da HMG-CoA mediada pelas estatinas acontece devido à sua similaridade estrutural ao substrato da enzima. Desta forma, como inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, as estatinas causam, além da diminuição de mevalonato, a redução de outros compostos importantes como os

isoprenóides, amplamente utilizados em vias de sinalização intracelular: farnesilpirofosfato (FPP) e o geranylgeranylpirofosfato (GGPP).

A redução hepática do colesterol leva à ativação de uma família de fatores de transcrição denominados proteínas ligantes do elemento regulador de esterol (SREBPs). Assim, ocorre um aumento concomitante na transcrição do gene que codifica o receptor LDL hepático. O aumento no número de receptores para LDL, por sua vez, regula o *clearance* de LDL circulante (BROWN e GOLDSTEIN, 1997; HORTON e SHIMOMURA, 1999). Com a inibição da síntese de mevalonato, também diminui os níveis de FPP e GGPP, sendo estas moléculas importantes na isoprenilação de proteínas traduzidas, tais como os membros das GTPases, Ras, RhoA e Rac-1. A isoprenilação, portanto, é um passo importante de associação dos complexos enzimáticos na membrana plasmática e na dissociação dos *rafts* lipídicos que, conseqüentemente, podem disponibilizar múltiplos sítios de ligação ou fosforilação (LIAO, 2002; LANDSBERGER et al., 2005). A redução da isoprenilação é de fato, o mecanismo molecular mais promissor para explicar os efeitos independentes da redução de lipídeos pelas estatinas (TAKEMOTO e LIAO, 2001). A geranylgeranilação é também de particular interesse, pois afeta a ativação dependente de proteína G e com isso, muitas rotas de sinalização.

Atualmente se sabe que algumas estatinas atuam em mecanismos celulares diferentes dos originalmente descritos, induzindo outras reações ainda pouco esclarecidas, incluindo propriedades anti-inflamatórias. Como exemplo, as estatinas tem-se mostrado potentes inibidoras da atividade de

TNF- α durante fibrose pulmonar e lesão pulmonar aguda (revisão em HOTHERSALL et al., 2006).

A atorvastatina é uma estatina mais recentes, sendo um composto sintético (WIERZBICKI et al., 2003) com meia vida plasmática de 14 horas, possuindo também propriedades antioxidantes (RIKITAKE et al., 2001; SHISHEHBOR et al., 2003). Encontra-se envolvida em muitos fenômenos fisiológicos, ainda pouco compreendidos. KIENER e colaboradores (2001) confirmam que a atorvastatina e a sinvastatina possuem efeitos anti-inflamatórios mais significativos em relação à outras estatinas, atuando como moduladora em diferentes leucócitos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, muitos estudos descrevem seu potencial terapêutico regulando a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e também de LFA-1 (GIGUERE et al., 2005). Autores afirmam também que este fármaco pode agir diminuindo a produção de IgG e a proteinúria durante lesão glomerular auto imune, reduzindo assim, a deposição de imunoglobulinas, diminuindo a lesão glomerular (LAWMAN et al., 2004). Ainda no contexto da inflamação renal, constatou-se diminuição na expressão de MHC de classe II por monócitos e linfócitos B. Ainda, a atorvastatina age reduzindo a proliferação de células T *in vitro* e *in vivo* e a expressão do MHC II glomerular durante a lesão auto-imune (revisão em HOTHERSALL, 2006). A atorvastatina também foi eficiente como estratégia terapêutica explorada no tratamento da artrite reumatóide. O uso de 40mg/Kg diários durante seis meses, atuou amenizando o processo inflamatório gerado na doença (revisão em HOTHERSALL, 2006; WAHANE et al., 2010; KUMAR et al., 2010). Além disso, em um modelo de artrite induzida em ratos realizado por nosso grupo, o tratamento com 10 mg/Kg de atorvastatina inibiu o influxo de neutrófilos para o

tecido articular após a indução e diminuiu os níveis de IL1- β , IL-6, TNF- α e das quimiocinas CCL-5 e CCL-2; além de declínio na nocicepção (BARSANTE et al., 2009, SANTODOMINGO-GARZÓN et al., 2006).

Alguns estudos clínicos e epidemiológicos correlacionam a utilização de estatinas com a redução na mortalidade associada a infecções bacterianas respiratórias graves, tais como as induzidas por *Staphylococcus aureus* entre outras (CHOW et al., 2010).

Neste contexto, FESSLER e colaboradores (2005) demonstraram experimentalmente as ações correlacionadas à diminuição do perfil inflamatório em camundongos pré-tratados com lovastatina, durante a infecção pulmonar com *K. pneumoniae*. Neutrófilos isolados de camundongos tratados com lovastatina apresentaram uma ativação de Rac-1, redução da resposta inflamatória associada, além de alterações na polimerização da actina, quimiotaxia e diminuição de bactérias no tecido.

Outros estudos também tentam evidenciar o uso das estatinas como promissor no controle da resposta imune e inflamatórias por infecções virais como o HIV-1, Influenza A H5N1, o vírus coxsackievirus relacionado à miocardite viral (LEAL et al., 2004; LIU et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Porém, alguns autores discordam desta hipótese, indagando um papel mais bem descrito em infecções bacterianas (FEDSON et al., 2009).

Estas estatinas, incluindo a atorvastatina como foco deste estudo, por possuírem todos estes efeitos pleitrópicos ainda pouco descritos, podem ser incluídas no reposicionamento de fármacos. Este procedimento representa a

nova indicação de medicamentos, na busca por novas terapias. O reposicionamento vem sendo bem sucedido e explorado, inclusive pelas maiores indústrias farmacêuticas, consistindo em um novo uso de medicamentos já aprovados e disponíveis no mercado como alvo de investigações futuras (ASHBURN et al., 2004, EICHBORN et al., 2010).

2) OBJETIVOS:

2.1) Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com atorvastatina durante infecção pulmonar experimental por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos.

2.2) Objetivos específicos:

2.2.1) Avaliar a infecção com diferentes concentrações de inóculos do patógeno *K. pneumoniae* ATCC-27736, em um modelo de infecção intranasal *in vivo* analisando os seguintes parâmetros:

- mortalidade;
- recuperação da carga bacteriana dos pulmões;
- análise do influxo celular para os pulmões.

2.2.2) Avaliar o efeito do pré-tratamento com atorvastatina em camundongos infectados com *K. pneumoniae*. Para isso, analisamos os seguintes parâmetros:

- mortalidade;
- recuperação de carga bacteriana;
- influxo celular para o pulmão;

- níveis de citocinas/quimiocinas TNF- α , IL-6, CXCL-1, IL-1 β , IL-10 nos pulmões e lavado broncoalveolar;

- parâmetros histológicos.

2.2.3) Verificar o efeito do pré-tratamento com atorvastatina em animais infectados com *K. pneumoniae*, tratados com Imipenem. Para isso, analisamos os mesmos parâmetros descritos no item anterior.

2.2.4) Avaliar o índice fagocítico *in vitro* e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos infectados com *K. pneumoniae* e tratados com atorvastatina.

3) MATERIAL E MÉTODOS:

3.1) Animais:

Os experimentos com animais foram realizados em camundongos C57BL/6J fêmeas de 8 a 12 semanas (total de 20 a 30 animais por experimento, divididos em grupos distintos de acordo com o experimento em questão); fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG e mantidos em condições de temperatura e luz controladas, com livre acesso à água e à ração, no biotério do laboratório de Interação microrganismo hospedeiro do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal sob o número de processo 224/11 (CETEA-UFMG).

3.2) Condições de crescimento do micro-organismo:

As amostras de *K. pneumoniae* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica do ICB/UFMG, congeladas previamente a -70°C (em solução contendo 1×10^9 CFU/mL, congeladas em estoque, contendo glicerol 10% v/v). Alíquotas dessa amostra foram inoculados em caldo trípico de soja e submetidos ao crescimento em escala logarítmica, durante 18 horas em estufa a 37°C . Após o crescimento, as amostras foram rapidamente centrifugadas a $375 \times g$ durante 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foram ressuspensas em solução de salina 0,9%, plaqueadas em Agar McConkey e também utilizadas para a infecção de acordo com o crescimento.

3.3) Modelo experimental de infecção por *Klebsiella pneumoniae*

Os animais C57BL/6J fêmeas foram infectados por inoculação intranasal de *K. pneumoniae* ATCC-27736, mantidas em nosso laboratório, congeladas a -70°C em solução 10% glicerol, na concentração de 10^9 UFC/mL. A concentração do inóculo foi determinada através de culturas quantitativas para atestar a viabilidade das colônias através do cultivo e plaqueamento em ágar McConkey de amostras estocadas, seguindo diluições sucessivas. Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina, ketamina e salina na proporção de 50mg/mL de ketamina e 0,02 mg/mL de xilazina, e respectivamente submetidos à instilação de 30 μ L de uma suspensão contendo 3×10^6 UFC/mL de *K. pneumoniae*. No primeiro grupo de animais (12 camundongos) foi levantada a curva de letalidade. Em um próximo experimento, os animais foram eutanasiados para retirada dos pulmões e do lavado broncoalveolar para posterior análise do crescimento bacteriano (contagem de UFCs), recrutamento leucocitário e da concentração de citocinas. Além disso, retiramos sangue para coleta de soro e avaliação da concentração sistêmica de citocinas.

3.4) Pré-tratamento e tratamento de camundongos com atorvastatina e pós-tratamento com o Imipenem:

O pré-tratamento com atorvastatina foi feito na dose de 10 mg/Kg de peso corporal, em dose única diária (PFIZER), através de gavagem com solução contendo veículo PBS 24 horas antes da infecção por *K. pneumoniae*. Durante os experimentos de letalidade, os camundongos foram tratados

diariamente, sendo que os camundongos controles foram tratados com o respectivo veículo carboximetilcelulose 1,5% em PBS. O IMIPENEM (TIEPEM) foi administrado 12 horas após a infecção por *K. pneumoniae* na dose de 40mg/Kg de peso corporal de 8 em 8 horas.

3.5) Análises do lavado broncoalveolar (BAL):

O BAL foi retirado para contagem de leucócitos presentes nos espaços alveolares. A traquéia foi exposta e um cateter de polietileno de 1,7 mm de diâmetro foi inserido. Foram então injetadas três alíquotas de 1 mL de tampão fosfato (PBS). Aproximadamente 2 ml de fluido foram recolhidos de cada camundongo. Após a centrifugação do lavado o sedimento foi usado para contagem de células, conforme descrito abaixo e o sobrenadante para realização do ensaio de ELISA e MPO. O número total de leucócitos presentes no lavado foi analisado em câmara de Neubauer, após adicionar solução de Turk. A contagem celular diferencial foi realizada após diluição em BSA a 3% e utilização de citospin CIENTEC (375xg por 3 minutos) pela avaliação da porcentagem de cada leucócito na lâmina corada com May-Grunwald-Giemsa. As lâminas confeccionadas foram utilizadas tanto para contagem diferencial de leucócitos quanto para avaliação do índice fagocítico.

O índice fagocítico foi determinado pela porcentagem média de neutrófilos presentes nas análises do BAL que continham ao menos 2 bactérias em seu citoplasma, a partir das lâminas preparadas por citospin, conforme descrito por SOARES e colaboradores (2002).

3.6) Análise do índice de hematócrito:

Uma amostra de sangue de cada animal foi coletada por meio de um tubo capilar de vidro heparinizado para determinação do hemoconcentrado (Perfecta), o qual foi centrifugado em uma centrífuga de micro-hematócrito por 10 minutos (Centrifuge hematocrit HT). Em seguida, foi realizada uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e transparente (concentração de plasma), através de uma regra de três simples.

3.7) Contagem das unidades formadoras de colônia de *K. pneumoniae*:

No momento da eutanásia, alíquotas de sangue foram coletadas do plexo braquial. Além disso, os ventrículos direitos foram reperfundidos com 3 mL de salina estéril e os pulmões coletados e posteriormente homogeneizado . Os homogenatos e o sangue foram colocados em gelo e diluídos em uma série de 1:10. Cem microlitros de cada solução foram plaqueados em meio de cultura ágar McConkey (Difco) e incubados por 24h a 37°C. Posteriormente, as unidades formadoras de colônia foram contadas. O limite de detecção de UFCs foi de 100 bactérias por mL ou 100 bactérias por 100 mg de tecido em meio McConkey.

3.8) Preparo do homogenato de tecido:

Os fragmentos de pulmões foram removidos e estocados a -20°C. Para obtenção do extrato, amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de extração (NaCl 0.4 M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0.1 mM, cloreto de benzetônio 0.1

mM, EDTA 10 mM, Tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20 KI de aprotinina), utilizando o homogenizador Ultra-Turrax (Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000xg/10min a 4° C em centrífuga BR4 (Jouan Winchester VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados a -20°C, para posterior análise.

3.9) Quantificação da mieloperoxidase (MPO):

A quantificação indireta do acúmulo de neutrófilos no tecido foi obtida pelos ensaios da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) como descrito anteriormente por RUSSO et al., 2009.

Fragmentos teciduais foram removidos e congelados a -20° C. Após descongelamento, os tecidos (1g de tecido em 19 mL de solução tampão) foram homogeneizados em tampão pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M de Na PO₄, 0,015 M de NaEDTA), utilizando homogeneizador elétrico (Power Gen 125-Fischer Scientific Pennsylvania, USA) e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (15 mL de solução NaCl 0,2% seguido da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundo após). Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de "hexadecyltrimethylammonium (HTAB)" 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL de suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se de nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min

a 2500xg e recolhidos os sobrenadantes. As amostras de tecido foram diluídas previamente à análise em tampão NaPO_4 0,05 M. A atividade da mieloperoxidase é calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando-se de TMB (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Status-labsystems, multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos acompanhado da OD do sobrenadante do tecido comparados com neutrófilos da cavidade peritoneal igualmente processados. Para tanto, a indução de neutrófilos na cavidade abdominal foi realizada pela injeção de 3 mL de caseína 5%.

3.10) Quantificação da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG):

A enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados, que quando quantificada no tecido pulmonar, serve como medida indireta de macrófagos no tecido. Fragmentos de pulmões foram homogeneizados em uma solução contendo 200 mM de ácido cítrico, 0.5% Triton X-100 até a obtenção uma suspensão homogênea, posteriormente centrifugada a 2500xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático.

Para o ensaio, foram adicionados 100 μ L das amostras diluídas em duplicata a uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 μ L do substrato NAG (p-nitrofenil-n-acetil- β -D-glicosamina) (SIGMA) diluído em tampão citrato/fosfato (pH 4,5). As amostras foram incubadas a 37° C durante 10

minutos. Por último, foram adicionados 100 µL de tampão glicina 0,2M pH 10,6 (contendo 133 mM glicina, 83 mM Na₂CO₃, and 67 mM NaCl). A absorbância correspondente foi medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda equivalente a 405 nm e a atividade de NAG foi calculada baseada em uma curva, com diferentes concentrações de p-nitrofenol-n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).

3.11) Quantificação de citocinas/quimiocinas (ELISA):

ELISA foi feito a partir do sobrenadante do extrato de pulmões e do lavado broncoalveolar obtido conforme procedimento descrito acima no item 3.8. Os níveis das citocinas/quimiocinas foram detectados de acordo com as normas contidas nos protocolos do fabricante (R&D Systems), para cada mediador em análise (IL-1β, IL-6, TNFα, CXCL-1(KC), IL-10. A concentração referente a cada amostra é calculada a partir de uma curva padrão correspondente.

3.12) Histologia:

Amostras de pulmões foram removidas e fixadas em solução de formol a 10% em tampão fosfato pH=7,4 durante 24h e posteriormente processadas segundo protocolo de desidratação, com soluções de etanol em diferentes concentrações (70%, 85%, 95% absoluto I, II, III durante 30 minutos cada. Posteriormente foram colocados em xilol I, II por 20 min; paraplast (Sigma) líquido (3 banhos de 30 minutos) e posteriormente incluídos em blocos de paraplast. Os tecidos incluídos foram cortados posteriormente em micrótomo,

com espessura de 5 µm e distendidos sobre lâminas de microscopia previamente identificadas. Após desparafinização (xilol), álcool absoluto, álcool 90, 80, 70%, água) as lâminas foram então coradas em corante hematoxilina (20 segundos)- eosina (8 segundos), segundo protocolo de coloração H.E (hematoxilina-eosina). Após serem novamente desidratadas, as lâminas foram diafanizadas e montadas com lamínulas, utilizando solução sintética de colagem (Entelan, Sigma) para posterior análise em microscópio óptico. As lâminas foram submetidas a uma escore semi-quantitativo de acordo com o grau relativo do infiltrado inflamatório, tal como descrito no CROWE e colaboradores (2007). A inflamação parenquimatosa foi pontuada como se segue: 0, ausência de inflamação; 1, infiltrado inflamatório local perivascular; 2, inflamação branda, estendendo-se ao longo de 25% dos cortes de pulmão; 3, inflamação moderada cobrindo 25-50% do parênquima dos cortes de pulmão; 4, inflamação extensiva cobrindo até 75% dos cortes de pulmão; 5, inflamação grave cobrindo mais de 75% ou mais das áreas avaliadas dos cortes de pulmão.

3.13) Obtenção de macrófagos para cultura:

Camundongos C57BL/6 foram injetados com solução de tioglicolato 3% na cavidade intraperitoneal. As células foram coletadas 3 a 4 dias após a injeção, através de lavagem peritoneal (3 vezes com 3 mL de PBS gelado) e foram adicionadas em meio incompleto (RPMI-1640), centrifugadas por 10 minutos a 859x g. O sobrenadante foi então descartado e ressuspensionado com 10 mL de meio incompleto e centrifugados novamente por 10 minutos a 859X

g. Após remover o sobrenadante por aspiração, novamente o pellet foi ressuspenso em meio completo RPMI-1640, onde depois foi obtida a contagem do número de células em câmara de Neubauer. A quantidade de células foi então ajustada para 3×10^5 células por poço e incubadas em placas de 96 poços em 200µL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino, por um período de 18h a 37°C em 5% CO₂.

3.14) Ensaio de fagocitose:

Macrófagos peritoneais, obtidos conforme descrito anteriormente foram pré-tratados por um período de 30 minutos com 100 µM/ml de atorvastatina (PFIZER). Após o tratamento, o inóculo de *K. pneumoniae* foi adicionado na proporção de 1:30 (macrófagos/bactérias).

A fagocitose de *K. pneumoniae*, bem como a análise dos níveis de NO, ROS e mediadores inflamatórios foram feitas 30 minutos, 2 e 24 horas após a infecção dos macrófagos.

3.15) Avaliação da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e NO (óxido nítrico):

As espécies reativas de oxigênio (ROS) foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados e tratados ou não com atorvastatina (10µM) a partir da utilização de 50mM por poço de diacetato de 2',7'dichlorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA, Invitrogen). A fluorescência foi

determinada em fluorímetro (Synergy 2, BioTek, USA) utilizando-se o comprimento de onda equivalente a 485 nm. A emissão foi medida em comprimento de onda de 530 nm. Os valores foram expressos na forma de números relativos (*fold increase*) da fluorescência em relação aos controles. A dosagem de NO foi realizada a partir do sobrenadante das culturas de macrófagos, utilizando-se do método de Griess: 50µL do sobrenadante foram adicionados a 50 µL do reagente de Griess (1% de sulfanamida em 2,5% de ácido fosfórico e 0,1% de naftilenodiamida-HCl) e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. O índice de NO foi avaliado a partir da leitura em comprimento de onda de 540 nm e a concentração determinada baseada em uma curva padrão de nitrito de sódio.

3.16) Análise Estatística:

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de pelo menos 5 animais por grupo. As análises de variância (ANOVA ONE-WAY) foram realizadas para comparar os grupos de experimentos. Em caso de significância foi realizado o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi considerado em $p < 0,05$.

4) RESULTADOS:

No modelo de pneumonia experimental induzida por *Klebsiella pneumoniae* em murinos, mediadores inflamatórios são expressos durante as primeiras 24 horas após a infecção, acompanhado do influxo de células polimorfonucleares para os espaços alveolares, com consequente aumento do infiltrado inflamatório (CHEUNG et al., 2000; SOARES et al., 2002; 2003 e 2006; FESSLER, et al. 2005; COGEN et al., 2009).

Inicialmente, camundongos fêmeas da linhagem C57BL6 foram infectados com vários inóculos de *Klebsiella pneumoniae* ATCC-27736, como verificado na figura 2A, com o inóculo de 3×10^6 UFC/mL, 40% dos animais sucumbiram a morte com até 7 dias após a infecção. O inóculos de 10^4 e 10^5 não foram capazes de induzir letalidade.

A recuperação da carga bacteriana no pulmão 24 horas pós-infecção com *K. pneumoniae* foi proporcional ao tamanho do inóculo, sendo que a maior recuperação foi conseguida com o inóculo de 10^6 (Figura 2B). Vale ressaltar, que este inóculo foi associado com sintomas típicos de morbidade gerados pela infecção como piloereção, secreções oculares, ptose palpebral, encurvamento do dorso. Baseado nesses achados, todos os experimentos seguintes foram realizados com o inóculo de 3×10^6 .

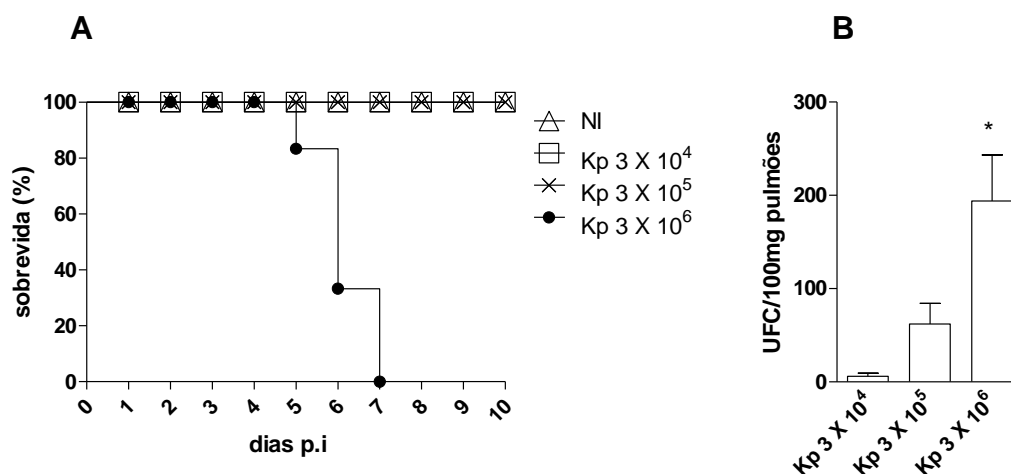


FIGURA 2: (A) Curva de letalidade inóculo-dependentes (cada camundongo foi infectado através de instilação intranasal de 30 μ L de cada inóculo, n =6), (B) Unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas dos pulmões de camundongos C57BL6 infectados por diferentes inóculos de *K. pneumoniae*, * $p < 0,05$ em relação ao inóculo de concentração 10^4 .

Uma vez que, dados epidemiológicos apontam a hipótese de melhora de infecções bacterianas nosocomiais em pacientes previamente tratados com estatinas e que a atorvastatina está relacionada a efeitos pleiotrópicos anti-inflamatórios realizamos experimentos de infecção por *K. pneumoniae* em animais tratados com atorvastatina.

Conforme, demonstrado na Figura 3, o tratamento com atorvastatina foi capaz de inibir a letalidade induzida por *K. pneumoniae*. A infecção por *K. pneumoniae* induziu a morte de camundongos a partir do terceiro dia, gerando um percentual de sobrevivência equivalente a 25% (n=12 por grupo), no final do período de 13 dias após a infecção. O pré-tratamento com a atorvastatina aumentou de maneira significativa esta percentagem, além de gerar também

um atraso da letalidade. A morte dos animais iniciou-se sete dias após a infecção. O percentual de sobrevivência no final de 15 dias foi de 70% em camundongos tratados em relação a camundongos não tratados.

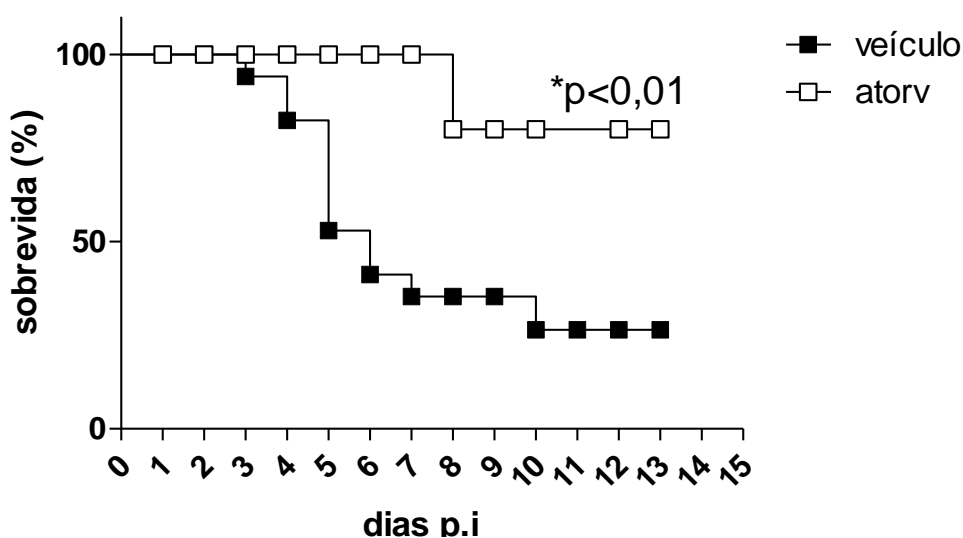


FIGURA 3: Curva de letalidade de camundongos C57/BL6 infectados com 3×10^6 UFC/mL de *K. pneumoniae*. Os animais foram submetidos ao tratamento diário com atorvastatina (10 mg/Kg) ou seu respectivo veículo. $p < 0,05$. $n=5$ a 7 por grupo.

Inicialmente, avaliamos o efeito do tratamento com atorvastatina na perda de peso induzida pela infecção. Como demonstrado na Figura 4A, a infecção pulmonar com *K. pneumoniae* induz significativa perda de peso nos primeiros dias pós infecção, sendo que em 3 dias, os animais perderam cerca de 30 % do peso corporal. O tratamento com atorvastatina, não foi capaz de reduzir esse padrão. Apesar de importante perda de peso, os animais infectados com *K. pneumoniae* não apresentaram alteração na hemoconcentração. Conforme demonstrado na Figura 4B, não houve diferença no nível de hematócrito em nenhum dos grupos avaliados.

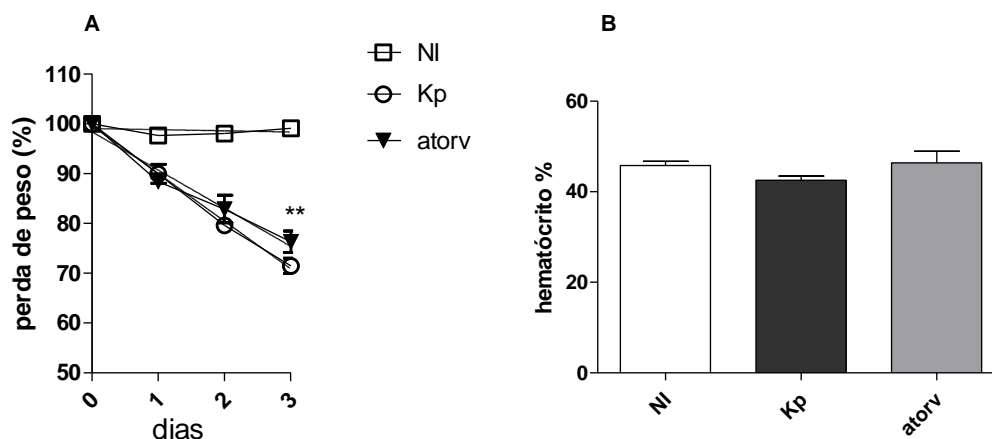


FIGURA 4: Percentagem de perda de peso (A) e medida do hematócrito (B) em camundongos não infectados tratados com veículos (NI) infectados tratados com veículos (Kp) e infectados tratados com atorvastatina (atorv), n=6 ** p< 0,05 em relação a camundongos não infectados (One-Way ANOVA).

Como demonstrado na Figura 5A, a infecção por *K. pneumoniae* induz um aumento significativo da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em relação a animais não infectados. A quantificação desta enzima refere-se à medida indireta do acúmulo de neutrófilos nos pulmões (MATOS et al., 1999). O tratamento com atorvastatina foi capaz de reverter significativamente os níveis de MPO observados em camundongos infectados. Além disso, dosamos os níveis da enzima n-acetilglicosaminidase, que indica, indiretamente, o acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar. A atividade dessa enzima foi aumentada no pulmão de camundongos infectados (Figura 5B). O pré-tratamento com a atorvastatina também levou a uma diminuição significativa na concentração NAG, em comparação aos camundongos tratados com veículo.

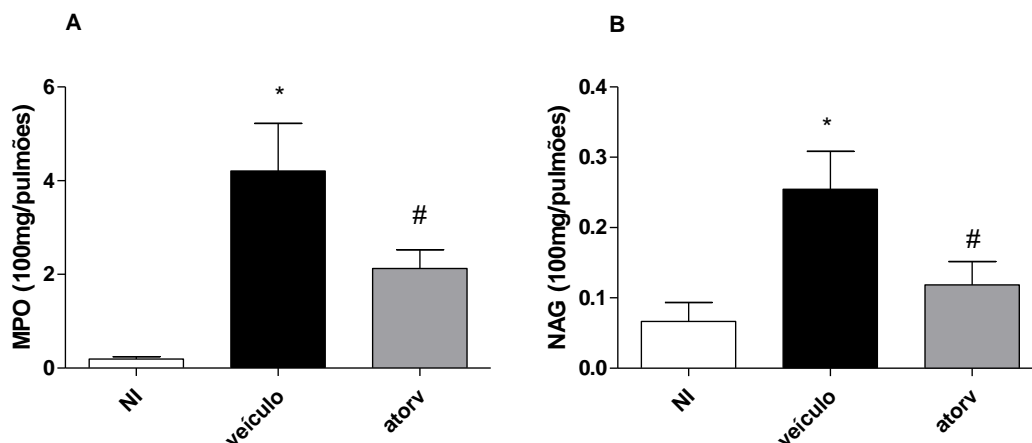


FIGURA 5: (A) Quantificação de mieloperoxidase (MPO) e (B) N-acetilglicosaminidase (NAG) 24h pós-infecção com *K. pneumoniae*: NI (não infectado tratado com veículo de atorvastatina carboximetilcelulose 1,5%); veículo (infectado tratado com veículo de atorvastatina); atorv (infectado tratado com atorvastatina). # $p < 0,05$, * $p < 0,01$ em relação aos camundongos infectados tratados com veículo. (n = 7 nos grupos tratados com veículo e atorvastatina e n=6 no grupo não infectado). One-Way ANOVA).

A infecção com *K. pneumoniae* induziu um aumento significativo do número total de leucócitos no lavado broncoalveolar. O tratamento com atorvastatina diminuiu o influxo de células totais induzido pela infecção pulmonar (Figura 6). Corroborando esses dados, o tratamento com atorvastatina diminuiu o número de monócitos e neutrófilos induzidos pela infecção. Vale ressaltar que não houve alteração do número de linfócitos em nenhum grupo avaliado. Também não houve alteração do número de células totais ou diferenciais no sangue em nenhum dos grupos avaliados (dados não demonstrados).

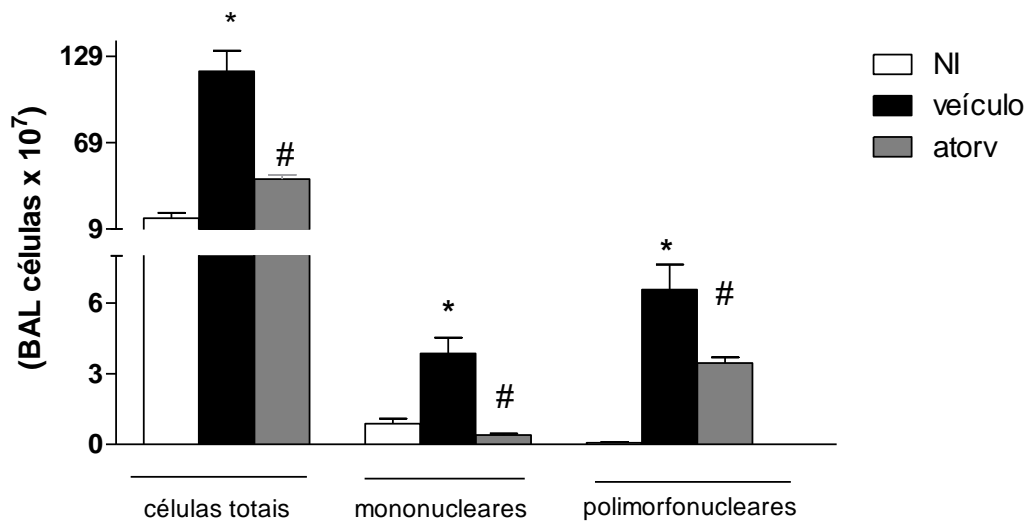


FIGURA 6: Contagem total e diferencial de células contidas no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos C57/BL6 tratados ou não com atorvastatina 24h após a infecção com *K. pneumoniae*. * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; (n experimental = 7 nos grupos tratados com veículo e atorvastatina e n=6 no grupo não infectado. One-Way ANOVA).

Esse conjunto de resultados demonstra que o tratamento com atorvastatina foi capaz de diminuir a letalidade e o recrutamento leucocitário, sem contudo diminuir a perda de peso dos animais infectados. Trabalhos anteriores demonstram que a infecção pulmonar por *K. pneumoniae* está associada a alterações histológicas importantes caracterizadas por influxo celular e hiperemia (VAN DER WINDT et al., 2010; POE et al., 2013). De fato, animais infectados apresentaram grandes áreas de intensa hiperemia tecidual, acompanhado de aumento na ocorrência de infiltrados inflamatórios tanto perivascularares quanto parenquimatosos (Figura 7 B D, F). Estes processos patológicos observados em camundongos infectados acometeram cerca de 50 a 75% do total do tecido pulmonar avaliado. De maneira interessante, os camundongos infectados e tratados com atorvastatina, apresentaram uma

significativa diminuição de áreas hiperêmicas preenchidas por infiltrados inflamatórios, comparando-se com camundongos somente infectados (Figura 7 C, E e F). Além disso, apresentaram acometimento tecidual diminuído em relação a camundongos infectados, com cerca de 30 a 45% do total das áreas avaliadas preservadas. A Figura 7 também mostra o escore histopatológico e as fotos comparativas entre os grupos infectados com *K. pneumoniae* e tratados com veículo ou atorvastatina.

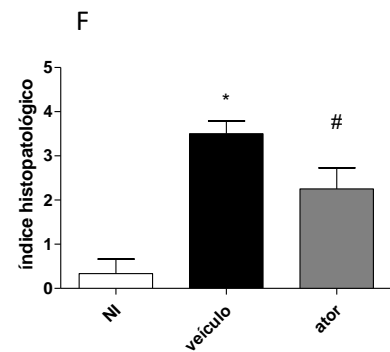
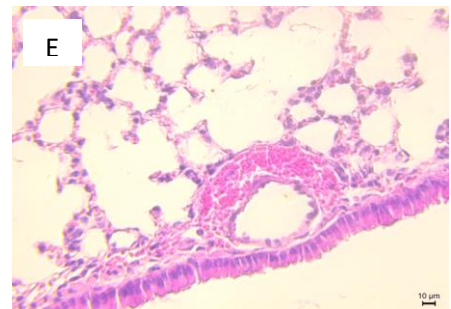
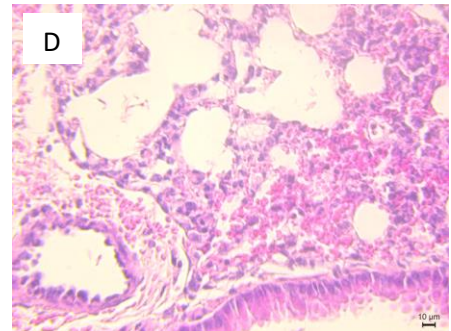
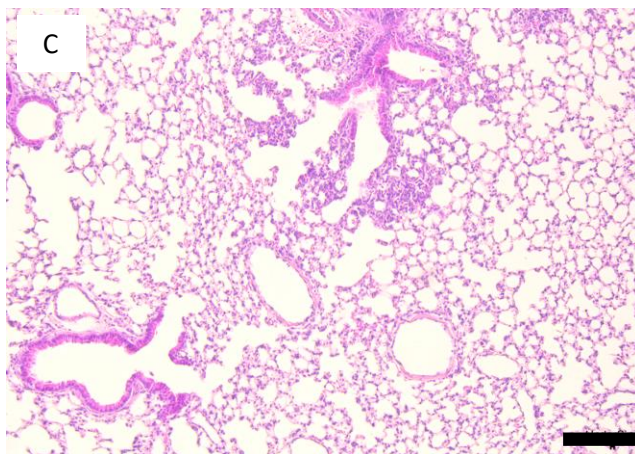
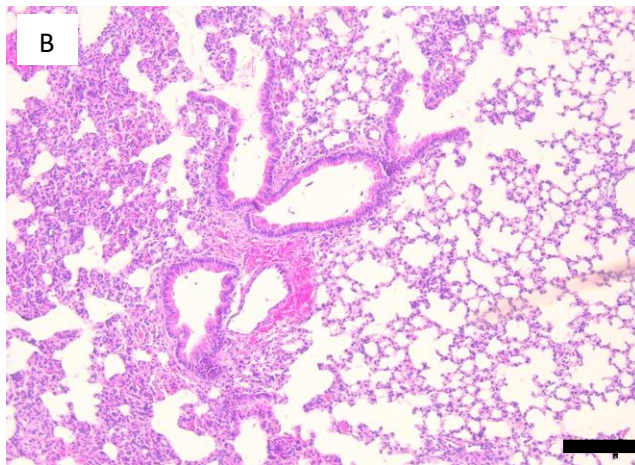


FIGURA 7: (A) Parênquima pulmonar de camundongos não infectados (NI); (B e D) pulmão de animais infectados tratados com veículos (veículo); (C e E) pulmão de animais infectados tratados com atorvastatina (ator). n= 4 por grupo. (F) Escore histopatológico. * $p < 0,05$ NI em relação ao grupo veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado tratados ator. Barra em A, B, C (100 μm) e 10 μm em D e E.

A infecção com *K. pneumoniae* induziu um aumento significativo na concentração das citocinas TNF- α , IL-6 e CXCL-1, dosadas do tecido pulmonar em comparação com as concentrações observadas em camundongos não infectados (Figura 8). O tratamento com atorvastatina foi associado a uma diminuição significativa na concentração dessas citocinas nos pulmões.

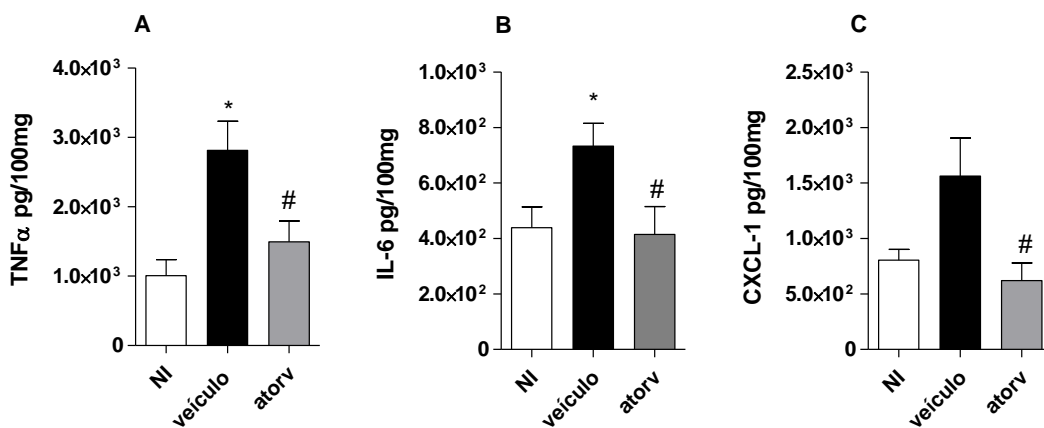


FIGURA 8: Concentração de citocinas TNF α e IL-6 e quimiocina CXCL-1 nos pulmões de camundongos C57/BL6 não infectados ou infectados com 3×10^6 CFU/mL de inóculo com *K. pneumoniae*, pré-tratados com veículo ou atorvastatina. * $p < 0,001$; # $p < 0,05$. $n = 6$ nos NI e $N = 7$ nos infectados tratados com veículos ou atorvastatina 10mg/Kg. One Way ANOVA. e test t *Student* para CXCL-1 nos pulmões $p < 0,05$.

Avaliamos também a concentração dessas citocinas no lavado bronco-alveolar. De forma similar ao pulmão, ocorreu aumento de TNF α , IL-6 e CXCL-1 no lavado broncoalveolar que também foi diminuído pelo tratamento com atorvastatina (Figura 9).

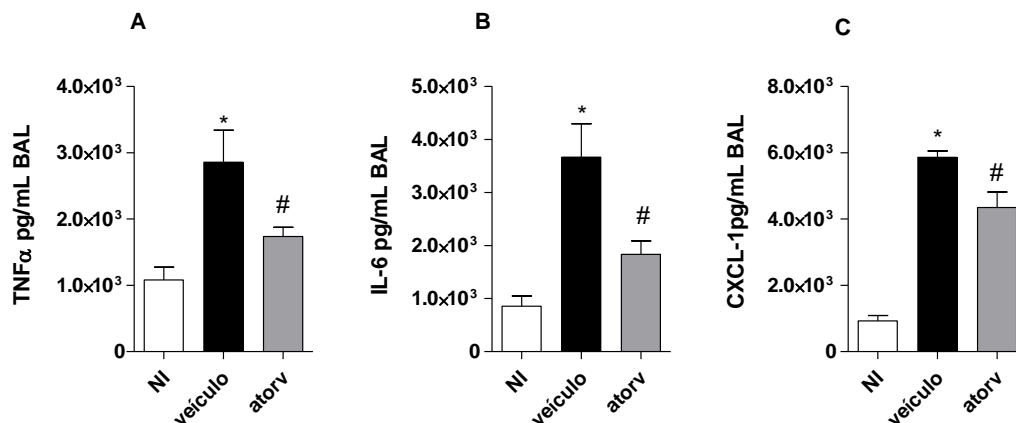


FIGURA 9: Concentração de citocinas TNF α e IL-6 e quimiocina CXCL-1 em BAL de camundongos C57/BL6 não infectados ou infectados com 3×10^6 CFU/mL de inóculo com *K. pneumoniae*, pré-tratados com veículo ou atorvastatina. * $p < 0,001$; # $P < 0,05$. $n=6$ nos NI e $n=7$ nos infectados tratados com veículos ou atorvastatina 10mg/Kg. One Way ANOVA. e test t *Student* para CXCL-1 nos pulmões $p < 0,05$.

Além disso, a infecção também induziu um aumento significativo dos níveis de IL-1 β no tecido pulmonar (Figura 10A), embora, a atorvastatina não tenha alterado sua concentração no tempo avaliado. Não observamos diferenças na produção de IL-10 entre os diferentes grupos (Figura 10B).

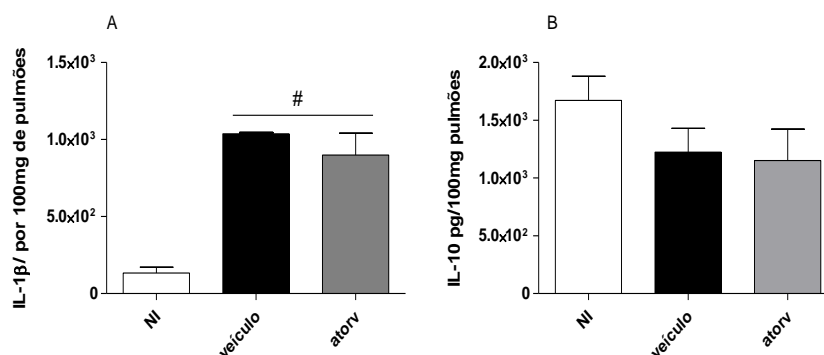


FIGURA 10: Concentração de citocinas IL-1 β (A) e IL-10 (B) nos pulmões de camundongos não infectados (NI); camundongos infectados tratados com veículos (veículo) e infectados tratados com atorvastatina. # $p < 0,05$. $n=6$ nos NI e $n=7$ nos infectados tratados com veículos ou atorvastatina 10mg/Kg. One Way ANOVA.

Uma vez que houve diminuição significativa de resposta inflamatória com diminuição do recrutamento celular, a nossa próxima pergunta foi verificar se a inibição no recrutamento de neutrófilo estava associada a um aumento da carga bacteriana. Interessantemente, embora com importante diminuição do influxo de leucócitos para o sítio pulmonar, não houve prejuízo na capacidade do hospedeiro em combater os microrganismos. Como observado na Figura 11 A e B, recuperamos o mesmo número de unidades formadoras de colônias tanto do sangue quanto dos pulmões de animais tratados com veículo ou atorvastatina.

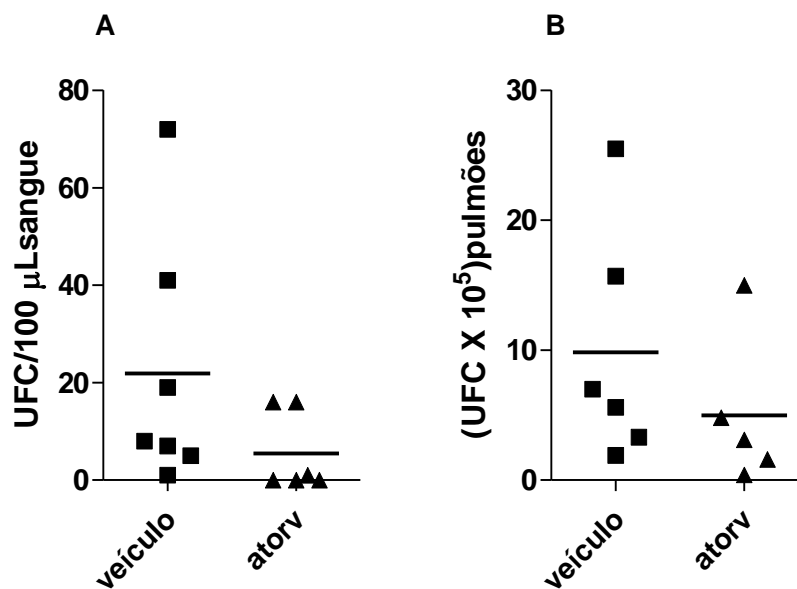


FIGURA 11: (A) Unidades formadoras de colônia no sangue, (B) UFC/100 mg de tecido pulmonar recuperadas de camundongos C57/BL6 infectados com 3×10^6 CFU/mL de *K. pneumoniae* e submetidos ao tratamento com atorvastatina (10 mg/Kg) ou seu respectivo veículo.

Uma vez que houve diminuição do número de leucócitos sem haver alteração da recuperação da carga bacteriana, nosso próximo passo foi avaliar

a atividade fagocítica dos leucócitos tratados ou não com atorvastatina. Para esse fim, realizamos contagens de neutrófilos contendo bactérias no citoplasma de animais infectados tratados com veículo ou atorvastatina. Os resultados demonstraram que cerca de 25% dos neutrófilos de animais infectados tratados com veículo continham pelo menos 2 bactérias, ao passo que cerca de 50% dos neutrófilos retirados de camundongos tratados com atorvastatina continham pelo menos 2 bactérias. Os resultados estão expressos na Tabela 1 e esta análise baseou-se no total de 200 células por lâmina. Vale ressaltar que os neutrófilos de animais tratados com atorvastatina parecem mais eficientes, baseado na maior atividade fagocítica.

TABELA 1: Perfil fagocítico de polimorfonucleares provenientes do lavado broncoalveolar de camundongos infectados, tratados ou não com atorvastatina.

Grupos	M±SD
Veículo	56,42 ± 38,14
Atorvastatina	109, 85 ± 54,56 *

***p < 0,05 em relação a camundongos tratados com veículo. Teste t Student (n=6 p.g)**

Para entender se a maior habilidade fagocítica induzida por atorvastatina se estendia a outros tipos celulares, nosso próximo passo foi avaliar o papel da atorvastatina em macrófagos. Para esse fim, realizamos experimentos *in vitro* de macrófagos peritoneais infectados por *K. pneumoniae* (1:30) cultivados na presença ou ausência de atorvastatina.

Em macrófagos cultivados na presença da bactéria *K.pneumoniae* (M.O.I. 30:1), não observamos índices significativos de fagocitose meia hora após infecção, apenas uma distribuição difusa de poucas células contendo bactérias (dados não demonstrados). Entretanto, após 2 horas de infecção (Figura 12) observamos índices significativos de macrófagos contendo bactérias no citoplasma. De forma interessante, os macrófagos previamente tratados com atorvastatina (100 μ M) e cultivados na presença de bactérias apresentaram um aumento do índice fagocítico comparado a macrófagos infectados tratados com veículo DMSO nas mesmas concentrações da droga. Dessa forma, esse dado reforça a idéia que a atorvastatina melhora o “fitness” celular.

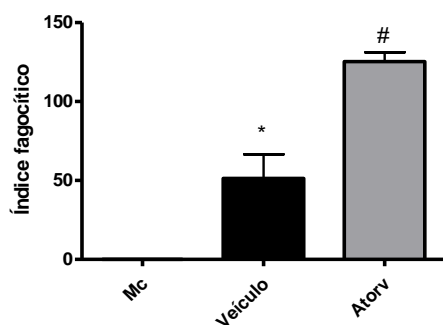


FIGURA 12: Índice fagocítico de macrófagos peritoneais pré-tratados ou não com atorvastatina (100 μ M) duas horas após infecção com inóculo de *K. pneumoniae* na proporção de 1:30 células* p<0,05 e # p<0,01. Teste t *Student*.

Uma vez demonstrado que a atorvastatina melhora a capacidade fagocítica da célula, nosso próximo passo foi avaliar se a célula cultivada na presença da atorvastatina possui maior capacidade de produzir agentes microbicidas como os radicais livres. Para isso, dosamos os níveis de ROS (espécies reativas de oxigênio) e NO (óxido nítrico), produzidos pelos macrófagos peritoneais em diferentes tempos, nos sobrenadantes das culturas.

Como visto na Tabela 2 ocorreu produção significativa de NO e de ROS em comparação às células não infectadas, tratadas apenas com dimetilsulfóxido (DMSO). O pré-tratamento de macrófagos com a atorvastatina (100µM) não alterou os níveis de ROS/NO produzidos pelos macrófagos infectados *in vitro*, comparados aos níveis expressos por macrófagos somente infectados.

Tabela 2: Índice fagocítico e produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e NO (óxido nítrico) por macrófagos *in vitro* infectados ou não por *K.pneumoniae*:

MACRÒFAGOS	Índice fagocítico (M±SD)	ROS (H ₂ DCFDA) fluorescence relative units (M±SD)	NOµM (M±SD)
Controle	ND	39,94± 9,26	0,36± 0,44
Veículo	33,3± 14,3	194,69± 14,56*	1,42± 4,67*
Atorvastatina	62,5± 28,4*	204,40± 62,33*	1,70± 5,23*

* $p < 0,05$ em relação aos controles não infectados.

Os resultados obtidos até aqui demonstram um efeito importante da atorvastatina na prevenção da letalidade induzida por *K. pneumoniae*. Essa inibição foi associada à diminuição da resposta inflamatória, sem, contudo inibir a habilidade do hospedeiro em lidar com a infecção. Dessa forma, acreditamos que a atorvastatina é capaz de frear a resposta inflamatória exacerbada; e de forma importante, que a exacerbação da resposta está associada a dano tecidual com conseqüente morte do hospedeiro. Entretanto, conforme visualizado na Figura 3, a atorvastatina diminuiu mas não inibiu totalmente a letalidade, o que sugere que essa mortalidade residual se deve ao crescimento

bacteriano. Para testar esta hipótese, o nosso próximo passo foi avaliar o tratamento com atorvastatina em associação com o antibiótico. Utilizamos imipenem (Tiepem/BioChimico/ 40 mg/Kg) , uma vez que esse é o antibiótico de primeira escolha no tratamento de pneumonia grave associada a *K. pneumoniae*. O tratamento foi feito segundo esquema apresentado na Figura 13A. O antibiótico foi administrado 12 horas após a infecção; e de 6 em 6 horas após a primeira dose de 40mg/Kg por via endovenosa durante 3 dias .

Como visto na Figura 13B, o uso do antibiótico conseguiu reduzir significativamente o número de bactérias nos pulmões comparando-se ao grupo infectado tratado com veículos, em apenas 12 horas após o tratamento com imipenem. Esse resultado valida o nosso protocolo experimental.

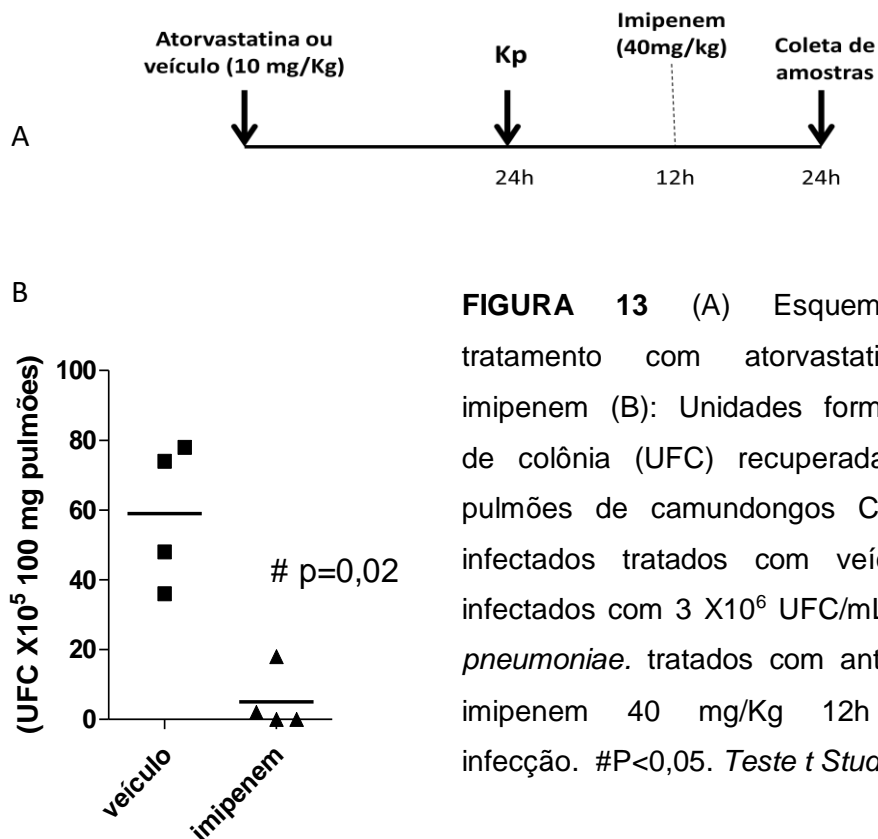


FIGURA 13 (A) Esquema de tratamento com atorvastatina e imipenem (B): Unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas nos pulmões de camundongos C57/BL6 infectados tratados com veículo e infectados com 3×10^6 UFC/mL de *K. pneumoniae*. tratados com antibiótico imipenem 40 mg/Kg 12h após infecção. #P<0,05. Teste t Student.

De forma similar ao verificado com atorvastatina (Figuras 3 e 14) o tratamento com antibiótico foi capaz de diminuir a letalidade induzida pela infecção pulmonar por *K. pneumoniae*. Entretanto; e de maneira muito interessante, a associação do tratamento com os fármacos atorvastatina e imipenem anulou a letalidade observada em camundongos infectados por *K. pneumoniae* (n=5 a 7 camundongos).

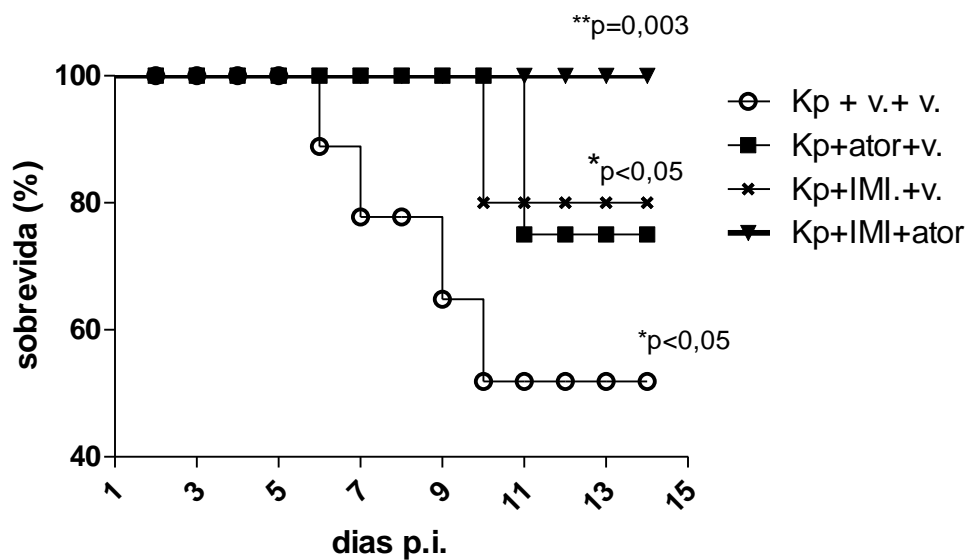


FIGURA 14: A combinação de tratamentos (pré-tratamento com atorvastatina e pós tratamento com imipenem) anulou a letalidade de camundongos C57/BL6 infectados por *K. pneumoniae*. Teste estatístico One Way ANOVA (Newman-Keuls multiple comparison test, n experimental 5 a 7 por grupo). Gráfico representativo de 3 experimentos isolados.

A partir destes dados procuramos verificar se a associação dos fármacos estava relacionada a uma diminuição da resposta inflamatória em relação a animais tratados apenas com atorvastatina. Conforme demonstrado na Figura 5A e 15A a atorvastatina diminuiu a atividade de MPO. Entretanto, o

imipenem não foi capaz de alterar o recrutamento de neutrófilo (Figura 5B). Conforme esperado, a associação dos tratamentos não induziu uma diminuição significativa em relação aos grupos tratados somente com atorvastatina. Esses dados sugerem que o efeito anti-inflamatório é dado pelo uso da atorvastatina e não secundário a inibição da bactéria pelo tratamento com imipenem, ou seja, esses fármacos não possuem efeito sinérgico sobre a resposta inflamatória.

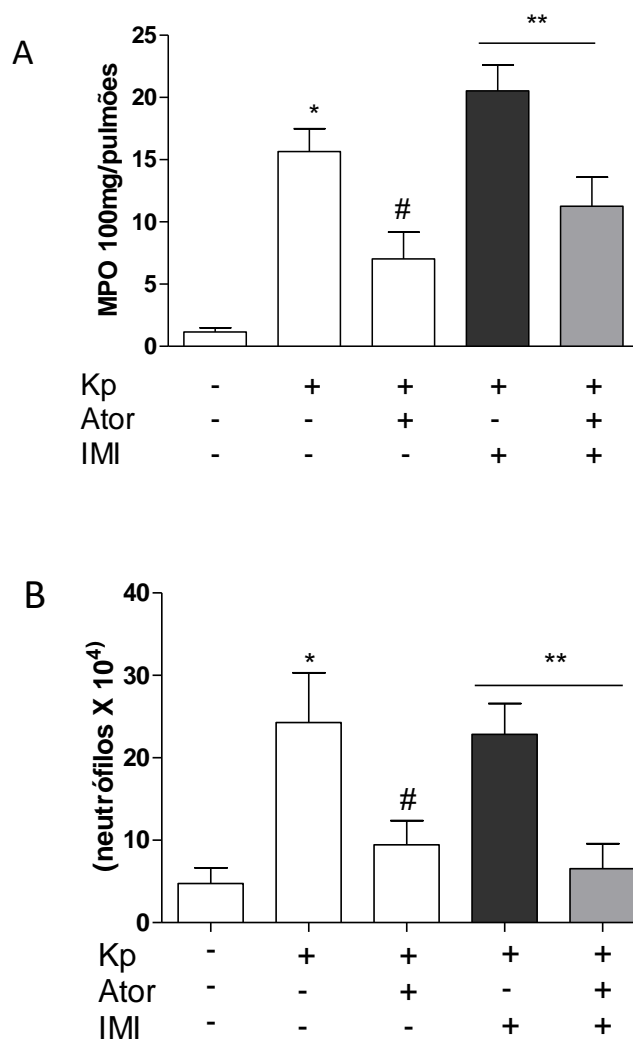


FIGURA 15: Níveis de mieloperoxidase (A) e número de neutrófilos (B) no lavado broncoalveolar (B) em camundongos infectados tratados com veículos (Kp), tratados com imipenem e veículos (IMI); tratados com atorvastatina e veículos (Ator) ou com a associação de imipenem e atorvastatina *p< 0,05 em relação a camundongos não infectados; **p<0,05 em

relação a infectados tratados com imipenem ou atorvastatina em B. # $p < 0,05$ em relação aos tratados somente com atorvastatina. $n=7$ (One Way ANOVA).

Vale ressaltar que a inibição do influxo de células tanto para o pulmão quanto para o espaço broncoalveolar, não está associado à diminuição da saída de células da medula (FIG. 16), nem na diminuição do número de leucócitos circulantes (dado não mostrado).

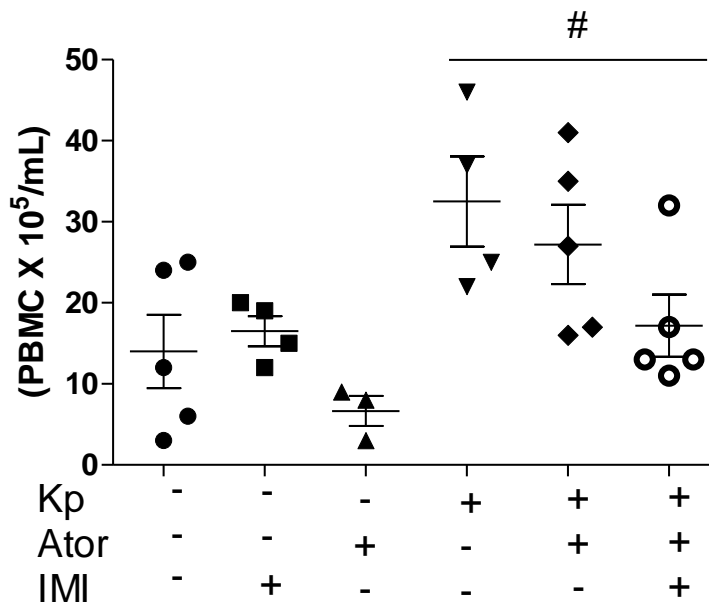


FIGURA 16: PBMCs (polimorfonucleares provenientes da medula óssea) de camundongos não infectados, infectados tratados com imipenem e atorvastatina em separado e com a combinação de imipenem e atorvastatina. One Way ANOVA. # $p < 0,05$ entre grupos infectados e não infectados).

5) DISCUSSÃO:

As doenças de caráter infeccioso já foram entendidas anteriormente como o resultado de respostas insuficientes do organismo hospedeiro, induzidas por uma proliferação exacerbada de um microrganismo patogênico, seguido do aparecimento de manifestações patológicas inerentes. Atualmente, a infecção e a instalação de uma doença são vistos como um conjunto de muitas relações complexas e específicas, que têm seu eixo de balanço intermediado pelo sistema imune e na sua habilidade em responder a um agente potencialmente patogênico ou mesmo à colonização por espécies oportunistas, através da tolerância imunológica (MEDZHITOV et al., 2012). A infecção pode ou não culminar em doença e a doença pode ser assintomática ou se manifestar de diversas formas, desde as mais brandas e inespecíficas até as fatais. Dessa forma, sabe-se que a infecção não necessariamente leva à doença e a doença não se restringe ao resultado de uma proliferação descontrolada do microrganismo diante de uma resposta imune e inflamatória ineficiente. Muitas vezes, a doença é desencadeada por respostas inflamatórias, exacerbadas ou descontroladas, que se não forem amenizadas podem matar o organismo hospedeiro. Outras vezes, o contato do microrganismo pode resultar inclusive em ausência ou deficiências de interações. Portanto, a imunidade age de forma íntima e dependente do reconhecimento destas moléculas específicas presentes nos microrganismos, através de padrões moleculares e de receptores específicos, intracelulares ou contidos nas superfícies de leucócitos e células apresentadoras de antígenos (PHILPOT et al., 2004; KAWAY et al., 2010).

A infecção pelo patógeno *K. pneumoniae* de linhagens patogênicas está correlacionado a inúmeras mortes nosocomiais no mundo todo (NORDMANN et al., 2009; CHEN et al., 2013). A resposta inicial à infecção bacteriana é uma reação inflamatória local que ativa o sistema imune. Os neutrófilos e macrófagos são células imprescindíveis na imunidade inata, bem como os monócitos e linfócitos, fundamentais na defesa contra bactérias, delimitando a proliferação bacteriana no tecido e exercendo suas funções não somente como células fagocíticas mas também como indutoras/produtoras de mediadores do processo inflamatório (CAI et al., 2010; POE et al., 2013).

Em nosso trabalho nós avaliamos os efeitos da atorvastatina, que reconhecidamente, possui efeitos pleiotrópicos descritos, incluindo diminuição de respostas inflamatórias em modelos murinos de artrite reumatóide e lesão estéril (BARSANTE et al., 2006, MULLER et al., 2010). Como já mencionado anteriormente, o reposicionamento de fármacos representa uma nova linha de raciocínio, amplamente discutida e ainda pouco explorada (ASHBURN et al., 2004; EICHBORN et al., 2010).

Segundo nossos dados, o tratamento com atorvastatina está associado a uma diminuição de mortalidade e morbidade, e isso está de acordo com dados epidemiológicos. Muitas evidências clínicas demonstram aumento da sobrevivência de pacientes com doenças respiratórias diagnosticadas, quando previamente tratados com algumas estatinas (JAIN et al., 2005; BJORKMAMBERGHAM et al., 2010). Porém, ainda existe uma carência de dados experimentais comprobatórios quanto ao benefício da sua utilização neste contexto, da mesma forma como ainda não se sabe os mecanismos que justifiquem esses dados epidemiológicos. De maneira bastante significativa, os

resultados de meta-análise sugerem que as estatinas podem ser associadas com efeitos benéficos no tratamento e prevenção principalmente de infecções bacterianas secundárias em geral e sepse (HOTERSALL et al., 2006; TLEYJEH et al., 2009; BJORKMAN-BERGAN et al., 2010).

É importante ressaltar que, apesar da diminuição dos sintomas característicos da infecção os camundongos não apresentaram melhora na perda de peso. Embora não avaliado aqui, acreditamos que esse efeito pode ser secundário à diminuição de alimentação dos animais.

A diminuição da letalidade está associada à redução do influxo de células durante a infecção por *K. pneumoniae* (SOARES et al., 2003; CAI et al. 2010; POE et al., 2013). Nossos resultados estão de acordo com estudos que demonstram a capacidade de atorvastatina em diminuir o influxo celular (BARSANTE et al., 2005; HOTERSALL et al., 2006). Assim, pelo menos em parte, o efeito protetor de atorvastatina pode ser secundário à inibição do recrutamento celular.

O menor influxo de células foi associado com um menor dano pulmonar. Muitos trabalhos demonstram que o acúmulo de neutrófilos/macrófagos estão associados a produção de citocinas, radicais livres e enzimas proteolíticas capazes de induzir o maior dano tecidual (VAN DER WINDT et al., 2010; CAI et al., 2010; BRATCHER et al., 2012; POE et al., 2013).

Ainda neste contexto, a diminuição do acúmulo de células também está relacionado ao declínio na produção de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar. Estes mediadores, incluindo as citocinas TNF α e IL-6, dinamizam e amplificam a resposta inflamatória. A deficiência na produção de quimiocina

CXCL-1 está correlacionada a uma maior letalidade apesar do menor dano tecidual diante da infecção pulmonar por *K. pneumoniae* em camundongos (CAI et al., 2010). Isto demonstra sua importância no equilíbrio do eixo neutrófilo/CXCL-1. Ao se diminuir os mediadores inflamatórios, ocorre um sinal de parada do processo lesivo, um sinal de “stop” que, por sua vez, liga o sinal de resolução. Isto vem seguido por alteração no perfil de produção de mediadores, ou seja, para a produção de leucotrienos e induz a produção de lipoxina.

Além disso, não verificamos no momento avaliado um aumento de IL-10. Dados bem recentes também confirmam e citam a molécula IL-10 como indutora da resolução da infecção induzida por *K. pneumoniae* em camundongos C57/BL6 e imprescindível na fase tardia da infecção pulmonar induzida. Neste contexto, a produção tardia de IL-10 provém especialmente de macrófagos residentes de origem mielóide (POE et al., 2013), sendo inclusive, sua expressão prejudicial nas fases iniciais da infecção. Dessa forma, é possível que em momentos mais tardios da infecção a atorvastatina modifique o perfil da resposta para anti-inflamatório ou pró-resolutivo, esse tem sido objeto de interesses futuros.

Como avaliado, não se pode detectar qualquer diferença na expressão de outras citocinas importantes como IL-1 β em camundongos infectados tratados ou não com atorvastatina, neste mesmo período. O papel de IL1 β e do inflamassoma, bem como o potencial da atorvastatina sobre a modulação na produção desta molécula poderá também ser alvo de investigação futura, já que estudos demonstram sua produção considerável no tecido pulmonar de

camundongos infectados pelo patógeno (VAN DER WINDT, et al., 2010; LEE et al., 2012) .

Apesar da significativa inibição na letalidade o tratamento com atorvastatina, esta não foi capaz de reduzir a carga bacteriana em animais infectados por *K. pneumoniae*. Esses dados demonstram que a atorvastatina não possui propriedades anti-bacterianas nesta fase inicial da infecção ou *in vitro*. Por outro lado, FESSLER et al., 2004, demonstraram efeito antimicrobiano da lovastatina em camundongos pré-tratados com a associação de lovastatina e mevalonato, na infecção pulmonar por *K. pneumoniae*. Neste contexto, um estudo recente (BERGMAN et al., 2011); demonstrou claramente que algumas estatinas como a fluvastatina e sinvastatina podem exercer efeitos antimicrobianos contra *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenza*, mas no entanto, estes autores mencionam que tais efeitos antimicrobianos só poderiam ser observados em concentrações muito elevadas, bem diferentes dos níveis expressos no plasma (TLEYJEH et al., 2009; BERGMAN et al., 2011).

Nosso modelo demonstrou um aumento no número de bactérias fagocitadas tanto em neutrófilos do fluido de BAL *in vivo* como em macrófagos peritoneais infectados *in vitro*. Isso pode ser uma de suas possíveis ações sobre os fagócitos, primariamente recrutados para o pulmão. Resta saber a dimensão de atuação deste fármaco sobre as membranas celulares destes fagócitos ou em *rafts* lipídicos contendo receptores, gerando possível modulação, ou até mesmo inativação de muitas rotas de sinalização ligada aos mesmos receptores expressos. De fato, a associação das estatinas, em específico a atorvastatina, inibe a produção de colesterol e pode, dessa forma,

modificar o comportamento das membranas de leucócitos, com consequente aumento da fosforilação em modulação de vias de sinalização. Resta saber como isso pode estar associado ao perfil de fagocitose de bactérias gram negativo. Além disso, ainda há possibilidade de algumas estatinas alterarem a secreção de vesículas pelo patógeno *K. pneumoniae* (como as OMVs), e por sua vez, modificar o perfil da infecção. Estes pontos também são relevantes como alvos futuros de estudos (MARKHART et al., 2004; LEE et al,2012).

Portanto, o efeito protetor da atorvastatina sem diminuição da carga bacteriana pode estar relacionado a sua atividade fagocítica como observado em nossos resultados. Certas evidências demonstram que algumas estatinas são capazes de alterar o perfil funcional de fagócitos, conferindo caráter protetor diante de infecções bacterianas (FESSLER et al., 2005; CHOW et al., 2010). Estes resultados também reforçam os efeitos observados através do tratamento com atorvastatina no controle inicial de mediadores inflamatórios expressos de forma exacerbada, durante a fase inicial da pneumonia por bactéria Gram negativo e aponta a importância da utilização de associação entre um antimicrobiano e um anti-inflamatório, como mais eficiente em induzir melhora. Neste contexto, esta hipótese aponta o uso da associação de drogas com efeitos diferentes: uma droga com potencial anti-inflamatório, conferindo proteção parcial e, se associado ao uso de imipenem garante maior proteção diante da infecção por *K. pneumoniae*.

Convém ressaltar que não foi observada diminuição do número de células produzidas na medula óssea de camundongos, sugerindo que a atorvastatina possa atuar basicamente no fenômeno do recrutamento de células circulantes para os pulmões e na manutenção da fagocitose. Nossos

resultados *in vitro* também reforçam nossa hipótese sobre o potencial conferido à atorvastatina. Diante destas evidências, vale ressaltar que a atividade fagocítica foi cerca de duas vezes maior no grupo tratado com atorvastatina. Entretanto, o número de células recrutadas foi menor, o que justifica o fato de atorvastatina não diminuir a carga bacteriana.

Assim, nosso trabalho, demonstrou também que a infecção de macrófagos *in vitro* com *K. pneumoniae* aumentou os níveis de ROS e NO principalmente 2h após a infecção. Entretanto, não observamos diferenças na expressão destas moléculas, entre as células pré-tratadas com atorvastatina ou células infectadas, tratadas com DMSO (Tabela 2). Esta evidência vai contra alguns dados da literatura que demonstram que a produção de ROS é intimamente relacionada à farnesilação de RacGTPase (FESSLER et al., 2005; KANEYUKI et al., 2007), que por sua vez são imprescindíveis para a manutenção do complexo NADPH oxidase. Assim, apontamos que embora ocorram mecanismos inibitórios das estatinas sobre o complexo NADPH oxidase por intermédio de RacGTPases, estes não foram capazes de inibir a produção de ROS durante este tempo estabelecido de infecção pelo patógeno. De fato, a geranilação de radicais também é um dos passos mais importantes na ativação dos complexos da NADPH oxidase e manutenção de gp91phox com consequente produção de ROS. Sabe-se que, algumas estatinas inibem a conversão do mevalonato prejudicando a conformação de RacGTPases correlacionado à produção de ROS (via NADPH oxidase), NO e também nas vias de sinalização de PI3K, Akt e MAPK; como anteriormente analisado (SHUTES et al., 2007).

Alguns experimentos paralelos foram realizados utilizando-se a droga EHT1864 (inibidor específico de RacGTPases 1 e Rac2b) como controle positivo na confirmação do efeito inibitório da atorvastatina (Figura 1, ANEXO 1). Como demonstrado, os índices de ROS e NO são equivalentes 2 horas após infecção de macrófagos *in vitro*, reforçando esta hipótese.

Como já mencionado, o tratamento com imipenem é usualmente prescrito na clínica para o tratamento de infecções nosocomiais por *K. pneumonia* e multi-resistentes (NORDMANN et al., 2009; MIMOZ et al., 2007; LEE et al., 2007; CHEN et al., 2012). Muitos autores confirmam a necessidade de investigação experimental sobre possíveis adjuvantes da antibioticoterapia devido ao seu uso abusivo e a relação com cepas de *K. pneumoniae* multiresistentes (KALAN , WRIGHT, 2011). Estes autores confirmam a necessidade da descoberta de associação de drogas que podem por sua vez, representar uma alternativa promissora diante deste uso abusivo.

Neste contexto, nossos resultados demonstraram de maneira interessante, uma inibição total de letalidade em camundongos infectados tratados com a associação entre a atorvastatina e o antibiótico imipenem; em comparação a camundongos infectados não tratados ou tratados com os dois fármacos em separado. Estes resultados reforçam a hipótese anterior , sobre um possível potencial envolvendo a associação destes dois fármacos na melhora da infecção pulmonar causada por microrganismos Gram negativo. A atorvastatina merece atenção, como alvo de estudos futuros, já que apresentou importante modulação de respostas inflamatórias e do menor dano tecidual nos pulmões de camundongos infectados, submetidos ou não ao tratamento com antimicrobianos carbapenêmicos. Isso confirma sua provável função

pleiotrópica na lesão pulmonar induzida por *K. pneumoniae*, amenizando respostas inflamatórias exacerbadas. Como já exposto, os resultados obtidos até aqui demonstram um efeito importante da atorvastatina na prevenção da letalidade induzida por *K. pneumoniae*, e está associada à diminuição da resposta inflamatória, sem, contudo inibir a habilidade do hospedeiro em lidar com a infecção. Dessa forma, acreditamos que a atorvastatina é capaz de frear a resposta inflamatória exacerbada; e de forma importante, que a exacerbação da resposta está associada a dano tecidual e consequente morte do hospedeiro.

6) CONCLUSÃO:

Concluimos que, o pré-tratamento de camundongos C57/BL/6 com a atorvastatina, exerce importante efeito anti-inflamatório durante a pneumonia experimental induzida por *K. pneumoniae*. Este tratamento mostrou-se correlacionado ao aumento da sobrevivência e diminuição da inflamação pulmonar. A associação de atorvastatina e o antimicrobiano imipenem pode representar grande potencial em garantir a sobrevivência dos camundongos infectados.

Assim, a atorvastatina pode ser reposicionada e servir como adjuvante à terapia antimicrobiana durante a pneumonia experimental por *K. pneumoniae* em camundongos.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRAMSON, J. S.; LYLES, D. S. ; HELLER, K. A. ; BASS, D.A. Influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Infect Immun* 37(2): 794-9; 1982.

ALLEN, I.C.; SCULL, M.A.; MOORE, C.B.; HOLL, E.K.; MCELVANIA-TEKIPPE E.; TAXMAN D.J.; GUTHRIE E.H.; PICKLES R.J.;, TING JP. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30(4): 556-65; 2009.

ASHBURN TT, THOR KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.*; 3(8):673-83; 2004.

BAILIE MB, STANDIFORD TJ, LAICHALK LL, COFFEY MJ, STRIETER R, PETERS-GOLDEN M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumonia* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol.*;157(12):5221-4; 1996.

BARSANTE M.M.; ROFFÊ E.; YOKORO C.M.; TAFURI W.L.; SOUZA D.G.; PINHO V.; CASTRO M.S.; TEIXEIRA M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 516(3):282-9; 2005.

BARTEN, G.; SCHUTTE, H.; BALS, R.; PLETZ, M.; ROHDE, G. Symposium: Pneumonia. *Pneumologie*, 65(4): 223-228; 2010.

BEIGEL J.; BRAY, M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res.* 78(1):91-102; 2008.

BERGMAN P.; LINDE C.; PÜTSEP K.; POHANKA A.; NORMARK S.; HENRIQUES-NORMARK B.; ANDERSSON J.; BJÖRKHEM-BERGMAN L. Studies on the antibacterial effects of statins- in vitro and in vivo. *PLoS One.* 6(8); 2011.

BJÖRKHEM-BERGMAN L.; BERGMAN P.; ANDERSSON J.; LINDH JD. Statin treatment and mortality in bacterial infections--a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 19;5(5); 2010.

BOSNAR, M.; BOSNAK, B.; CUZIC-HRVACIC, B.; MJANOVIC, N.; GLONARIC, i.; CULIC, O.; PARHAM, M.J.; HABER, V.V. Azithromycin and Clarithromycin LPS-induced murine pulmonary neutrophilia mainly through effects on macrophage-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating IL1 β . *Journ. Pharm. And Exp. Ther.*, 331(1): 104-113; 2009.

BOUVIER, N.M.; PALESE, P. "The biology of influenza viruses". *Vaccine* 26 Supl4:D49-53; 2008.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. The SREBP pathway:regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of membrane bound transcription factor. *Cell.*, v.89(3):331-340; 1997.

BRATCHER, P.E.; WEATHINGTON, N.M.; NICK, H.J; JACKSON, P.L.; SNELGROVE, R.J.; GAGGAR, A. MMP-9 Cleaves SP-D and Abrogates Its Innate Immune Functions *In Vitro*. *PLoS One*. 7(7); 2012.

CAI S.; BATRA S.; LIRA S.A.; KOLLS J.K.; JEYASEELAN S. CXCL1 regulates pulmonary host defense to *Klebsiella* Infection via CXCL2, CXCL5, NF-kappaB, and MAPKs. *J Immunol.* 185(10):6214-25; 2010.

CANO V.; MORANTA D.; LLOBET-BROSSA E.; BENGOCHEA J.A.; GARMENDIA J. *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. *BMC Microbiol.* 3;9:156; 2009.

CORTÉS G.; DE ASTORZA B.; BENEDÍ V.J; ALBERTÍ S. Role of the htrA gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect Immun.* 70(9):4772-6; 2002.

CHEN, J.; DENG Y.M. "Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics." *Virology* 6: 30, 2009.

CHEUNG, T. K.; POON, L. Biology of influenza a virus. *Ann N Y Acad Sci* 1102: 1-25; 2007.

CHOI.; H.S; PARK. M.J.; KANG, H.M.; KIM, I.H.; CHOI, C.W.; YOU, J.H.
Statins use and mortality in sepsis due to pneumonia. *Crit. Care Med.*, 35 (supl.
12): A15; 2007.

CHOW O.A; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE M.; BRIGHT A.T.; HENSLER M.E.;
ZINKERNAGEL A.S.; COGEN A.L.; GALLO R.L; MONESTIER M.; WANG Y.;
GLASS C.K.; NIZET V. Statins enhance formation of phagocyte extracellular
traps. *Cell Host Microbe*. 18:8(5):445-54; 2010.

COGEN A.L.; MOORE T.A. Beta2-microglobulin-dependent bacterial clearance
and survival during murine *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect
Immun*. 77(1):360-6; 2009.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. "Influenza." *Lancet* 354(9186): 1277-82, 1999.

CROWE, C.R.; CHEN, K.; POCIASK, D.A.; ALCORN, J.F.; KRIVICH, C.;
ENELOW, R.I; ROSS, T.M.; WITZTUM, J.L; KOLLS, J.K. Critical role of IL-
17RA in immunopathology of influenza infection. *J Immunol*.183(8):5301-10;
2009.

DAIGNEAULT, D. E.; HARTSHORN, K.L.; LIOU, L.S.; ABBRUZZI, G.M.; WHITE, M.R.; OH, S.K.; TAUBER, A.I. "Influenza A virus binding to human neutrophils and cross-linking requirements for activation." *Blood* 80(12): 3227-34; 1992.

DOYLE, R. U.S Deaths from pneumonia. *Sci. Am.*, 276: 29-33; 1997.

EICHBORN, J.; MURGUEITIO, M.S.; DUNKEL, M.; KOERNER, S.; BOURNE, P.E.; PREISSNER, R. PROMISCUOUS: a database for network-based drug-repositioning. *Nucleic Acids Res.* 39:1060-1066; 2009.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid. Res.* v.33(11):1569-1582; 1992.

FAGUNDES, C.T.; VIEIRA, A.T.; SOARES, A.C.; PINHO, V.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G. Transient TLR Activation Restores Inflammatory Response and Ability To Control Pulmonary Bacterial Infection in Germfree Mice. *J Immunol.* 188(3):1411-20; 2012.

FESSLER, M.B.; YOUNG, S.K.; JEYASEELAN, S.; LIEBER, J.G.; ARNDT, P.G.; NICK, J.A.; WORTHEN, G.S. A role for hydroxy-methylglutaryl coenzyme a reductase in pulmonary inflammation and host defense. *Am J Respir Crit Care Med.* 15;171(6):606-15; 2005.

FEDSON, D.S. Confronting an influenza pandemic with inexpensive generic agents: can it be done? *Lancet Infect Dis.*8(9):571-6; 2008.

FILE, T.M.J.; MARRIE T.J. Burden of community-acquired pneumonia in North American adults. *Postgrad.Med.* 122(2):130-141; 2010.

FUJISAWA, H. 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(6): 2772-83; 2008.

FUKUYAMA, S.; KAWAOKA, Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol.* 23(4):481-6; 2011.

GIGUERE J.F.; TREMBLAY, M.J. Statin compounds reduce human immunodeficiency virus type 1 replication by preventing the interaction between virion-associated host intercellular adhesion molecule 1 and its natural cell surface ligand LFA-1. *J Virol.* 78:12062–5; 2004.

HALASA, N.B. Update on the 2009 pandemic influenza A H1N1 in children. *Curr Opin Pediatr.* 22(1):83-7; 2010.

HAMPSON, A. W.; MACKENZIE, J.S. The influenza viruses. *Med J Aust.* 185(10 Suppl): S3943; 2006.

HARTSHORN, K. L.; COLLAMER, M.; WHITE, M.R.; SCHWARTZ, J.H.; TAUBER, A.I. Characterization of influenza A virus activation of the human neutrophil. *Blood*, 75(1): 218-26; 1990.

HARTSHORN, K. L.; WHITE, M.R. Influenza A virus up-regulates neutrophil adhesion molecules and adhesion to biological surfaces. *J. Leukoc. Biol.* 65(5): 614-22; 1990.

HORTON, J.D.; SHIMOMURA, I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol.* 10(2):143-50; 1999.

HOTHERSALL, E.; McSHARRY, C.; THOMSON, N.C. Potential therapeutic role for statins in respiratory disease. *Thorax*, 61:729-734; 2006.

IORIO, F.; BOSOTTI, R.; SCACHERI, E.; BELCASTRO, V.; MITHBAOKAR, P.; FERRIERO, R.; MURINO, L.; TAGLIAFERRI, R.; BRUNETTI-PIERRI, N.; ISACCHI, A.; DI BERNARDO, D. Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,17;107(33):14621-1466; 2010.

ISTURIZ, R.E.; LUNA, C.M.; RAMIREZ, J. Clinical and economic burden of pneumonia among adults in Latin America. *Intern. Journ. Infec. Disease*, 14:e852-e856; 2010.

JAIN, M.K.; RIDKER, P.M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and base mechanism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4(12): 977-87; 2005.

JULKUNEN, I. K.; MELEN, L. Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine* 19 Suppl 1: S32-7; 2001.

KARNARD, A.; ALVAREZ, S.; BERK, S.L. Pneumonia caused by Gram negative bacilli. *Am. J. Med.* 79:61-67; 1985.

KALAN, L.; WRIGHT, G.D. Antibiotics adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. *Expert reviews in Molecular Medicine*, 13:1-17; 2011.

KANEYUKI, U.; UEDA, S.; YAMAGISHI, S.; KATO, S.; FUJIMURA, T.; SHIBATA, R.; HAYASHIDA, A.; YOSHIMURA, J.; KOJIRO, M.; OSHIMA, K.; OKUDA, S. Pitavastatin inhibits lysophosphatidic acid-induced proliferation and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic smooth muscle cells by suppressing Rac-1-mediated reactive oxygen species generation. *Vascul Pharmacol.* 46(4):286-92; 2007.

KAWAOKA, Y., COX, N.J. Family Orthomyxoviridae.” Virus Taxonomy. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p.681-693. Editado por Fauquet *et. al.*, San Diego: Elsevier Academic Press. Disponível em <http://elsevier.insidethecover.com/serchbook.jsp?isbn=9780122499517>.

KAWAY, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11(5): 373-84; 2010.

KELLY, J.; HUNT, B.J.; RUDD, A.; LEWIS R.R. Pulmonary embolism and pneumonia may be confounded after acute stroke and may co-exist. *Age and Ageing*, 31:235-239; 2002.

KUMAR, V.L.; GURUPRASAD, B.; WAHANE, V.D. Atorvastatin exhibits anti-inflammatory and anti-oxidant properties in adjuvant-induced monoarthritis. *Inflammopharmacology*. 18(6):303-8; 2010.

KIENER, P.A.; DAVIS, P.M.; MURRAY, J.L.; YOUSSEF, S.; RANKIN, B.M.; KOWALA, M. Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by

lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *Int Immunopharmacol.* (1):105-18; 2001.

KOHLMEIER, J. E.; WOODLAND, D.L. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol.* 27:61-82; 2009.

KOHLMEIER, J.E.; REILEY, W.W.; PERONA-WRIGHT, G.; FREEMAN, M.L.; YAGER, E.J.; CONNOR, L.M.; BRINCKS, E.L.; COOKENHAM, T.; ROBERTS, A.D.; BURKUM, C.E.; SELL, S.; WINSLOW, G.M.; BLACKMAN, M.A.; MOHRS, M.; WOODLAND, D.L. Atorvastatin inhibits autoreactive B cell activation and delays lupus development in New Zealand black/white F1 mice. *J. Immunol.*173(12):7641-6; 2004.

KULP, A.; KUEHN, M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol.* 64:163-84; 2010.

LANDSBERGER, M.; JANTZEN, F.; KÖNEMANN, S.; FELIX, S.B. Blockade of geranylgeranylation by rosuvastatin upregulates eNOS expression in human venous endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4;336(4):1005-9; 2005.

LAWLOR, M.S.; HSU, J.; RICK, P.D.; MILLER, V.L. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol. Microbiol.* 58(4):1054-73 ; 2005.

LAWMAN, S. ; MAURI, C. ; JURY, E.C. Atorvastatin inhibits autoreactive B cell activation and delays lupus development in New Zealand black/white F1 mice. *J. Immunol.*173:7641–6 ; 2004.

LE GOFFIC, R., J. POTHLICHT, R.J.; VITOUR, D.; FUJITA, T.; MEURS, E.; CHIGNARD, M.; SI-TAHAR, M. Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J.Immunol.* 178(6): 3368-72; 2007.

LIAO, J.K.; Clinical implications for statin pleiotropy. *Curr Opin Lipidol.*16(6):624-9; 2005.

LIAU, J.K. Isoprenoids as mediators of biological effects of statins. *J. Clin. Inv.* 110(3): 285-288; 2002.

LAWLOR, M.S.; HSU, J.; RICK, P.D.; MILLER, V L. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol.*58(4):1054-73; 2005.

LEE, J.C.; LEE, E.J.; LEE, J.H.; JUN, S.H.; CHOI, C.W.; KIM, S.I.; KANG, S.S.; HYUN, S. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol Lett.* 331(1):17-24; 2012.

LEAL, N.A.; OLTEANU, H.; BANERJEE, R.; BOBIK, T. A. Human ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase and its interaction with methionine synthase reductase. *J Biol Chem.* 279(46):47536-42; 2004.

LIESHOUT, M.H.; BLOK, D.C.; WIELAND, C.W.; DE VOS, A.F.; VAN 'T VEER, C.; VAN DER POLL, T. Differential roles of MyD88 and TRIF in hematopoietic and resident cells during murine gram-negative pneumonia. *J Infect Dis.* 206(9):1415-23; 2012.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420: 868-874; 2002.

LIU, X.H.; LI, Y.F.; LAI, C.L.; JI, Y.R.; ZHAO, J.Q. Plasma endothelin level in hypertensive patients receiving standard anti-hypertensive therapy with or without statins. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* (9):800-3; 2009.

MANCUSO, P.; STANDIFORD, T.J.; MARSHALL, T.; PETERS-GOLDENS, M. 5-lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infec. Immun.* v.6 (11):5140-5146; 1998.

MANCUSO, P.; PETERS-GOLDEN, M. Modulation of alveolar macrophage phagocytosis by leukotrienes is Fc receptor-mediated and protein kinase C-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23(6):727-33; 2000.

MCCULLERS, J.A.; ENGLISH, B.K. Improving therapeutic strategies for secondary bacterial pneumonia following influenza. *Future Microbiol.* 3(4):397-404; 2008.

MEDINA, R. A.; GARCIA-SASTRE, A. Influenza A viruses: new researches developments. *Nature Rev.* 590-603; 2011.

MEDZHITOV, R.; SCHNEIDER, D.S.; SOARES, M.P. Disease tolerance as a defense strategy. *Science*. 24;335(6071):936-41; 2011.

MIZGERD, J.P. Lung Infection - A Public Health Priority. *PLoS Med* 3(2): 76; 2006.

MIZGERD, J.P. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*. 358 (7):716-27; 2008.

MIMOZ, O.; DAHYOT-FIZELIER, C. Prevention of ventilator-associated pneumonia: do not forget to disinfect the mouth. *Crit Care Med*. 35(2):668-9; 2007.

MORTENSEN, E.M.; PUGH, M.J.; COPELAND, A. Impact of statins and ACE inhibitors on mortality for subjects hospitalized with pneumonia. *Eur. Resp. J*; 32:611-617; 2008.

MOORE, T.A.; LAU, H.Y.; COGEN, A.L.; MONTELEON, C.L.; STANDIFORD, T.J. Anti-tumor necrosis factor alfa therapy during murine *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: increased mortality in the absence of liver injury. *Shock*, 20:309-315; 2003.

MOORE, T.A.; PERRY, M.L.; GETSOIAN, A.G.; MONTELEON, C.L.; COGEN, A.L.; STANDIFORD, T.J. Increased mortality dysregulated cytokine production in tumor necrosis factorreceptor-1 deficient mice following systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect. Immun.*, 71:4891-4900; 2003b.

MUENZER, J.T.; DAVIS, C.G.; CHANG, K.; SCHMIDT, R.E.; DUNNE, W.M.; COOPERSMITH, C.M.; HOTCHKISS, R.S. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis *Infect Immun.* 78(4):1582-92; 2010.

MUENZER, J.T.; DAVIS, C.G.; DUNNE, B.S.; UNSINGER, J.; DUNNE, W.M.; HOTCHKISS, R.S. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock.* 26(6):565-70; 2006.

MÜLLER,H.C.; HELLWIG, K.; ROSSEAU, S.; TSCHERNIG, T.; SCHMIEDL, A.; GUTBIER, B.; SCHMECK B.; HIPPENSTIEL, S.; PETERS, H.; MORAWIETZ, L.; SUTTORP, N.; WITZENRATH, M. Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Critic. Care* 14(4):225-30; 2010.

NAKAMURA, S.; DAVIS, K.M.; WEISER, J.N. Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest.*121(9):3657-65; 2011.

NICOLAU, D.P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother.* 9(1):23-37; 2008.

NORDMAN, P; CASON, C.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet inf. Disease* 9:228-236; 2009.

PAPP-WALLACE, K.M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M.A.; BONOMO, R.A. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(11):4943-60; 2011.

PATEL, G.; HUPRICAR, S.; FACTOR, S.H.; JENKINS, S.G.; CALFEE, D.P. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 29: 1099-1106; 2008.

PATERSON, D.L. Impact of antibiotic resistance in gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. *Clin Infect Dis.* 15;47 Suppl 1:S14-20, 2008.

PILLÉ, J.Y.; DENOYELLE, C.; VARET, J.; BERTRAND, J.R.; SORIA, J.; OPOLON, P.; LU, H.; PRITCHARD, L.L.; VANNIER, J.P.; MALVY, C.; SORIA, C.; LI, H. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Ther.*11(2):267-74; 2005.

PINNER, R.S.; TEUTSCH, S.; SIMONSEN, L. KLUG, L. GRABER, J.; CLARKE, M. & BERKELMAN, R. Trends in infectious diseases mortality in the United States. *JAMA.* 275:189;1996.

POE, S.L.; ARORA, M.; YARLAGADDA, M; KHARE, A.; LEVY, D.E.; LEE, R.K.; MALLAMPALLI, R.K.; CHAN Y.R.; RAY, A.; RAY, P. STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. *Nat. Immunol.* v:6 (1) p.189-199; 2013.

PODSCHUN, R., ULLMANN, R. U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol. Rev.* 11(4): 589–603; 1998.

RASHID, M.; TAWARA, S.; FUKUMOTO, Y.; SETO, M.; YANO, K.; SHIMOKAWA, H. Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Circ. J.* 73(2):361-70; 2008.

REYSS, I.; PUGSLEY, A.P. Five additional genes in the pulC-O operon of the gram-negative bacterium *Klebsiella oxytoca* UNF5023 which are required for pullulanase secretion. *Mol Gen Genet.* 222(2-3):176-84; 1990.

REGUEIRO, V.; MORANTA, D.; CAMPOS, M.A.; MARGARETO, J.; GARMENDIA, J.; BENGOCHEA, J.A. *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect Immun.* 77(2):714-24; 2008.

RIKITAKE, Y.; KAWASHIMA, S.; TAKESHITA, S.; YAMASHITA, T.; AZUMI, H.; YASUHARA, M.; NISHI, H.; INOUE, N.; YOKOYAMA, M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 154(1):87-96; 2001.

RUIZ, M.; AROSIO, C.; SALMAN, P.; BAUER, T.T. Diagnosis of pneumonia and monitoring of infection. *Drugs*, 60:1289-1302; 2000.

RUSSO, R.C.; GUABIRABA, R.; GARCIA, C.C.; BARCELOS, L.S.; ROFFE, E. The chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40: 410–421; 2009.

RUUSKANEN, O.; LAHTI, E.; JENNINGS, L.C.; MURDOCH, D.R.; Viral pneumonia. *Lancet.* 377 (9773):1264-75; 2011.

SAADIA, R.; SCHEIN, M. Multiple organ failure. How valid is the "two hit" model? *J. Accid. Emerg Med.* 16(3):163-6; 1999.

SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; CUNHA, T.M.; VERRI, W.A.; VALÉRIO DA, PARADA, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F, Q.

Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. *Br J. Pharmacol.* 149(1):14-22; 2006.

SARRIS, P.F.; ZOUMADAKIS, C.; PANOPOULOS, N.J.; SCOULICA, E.V. Distribution of the putative type VI secretion system core genes in *Klebsiella* spp. *Infect. Genet. Evol.* 11(1):157-66; 2011.

SEREZANI, C.H., ARONOFF, D.M.; JANCAR, S.; MANCUSO, P.; PETERS-GOLDEN, M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood.* 106(3):1067-75; 2005.

SCHIELIENGER P.C.; FEDSON, D. S.; JICK, S.S.; JICK, H.; MEIER, C.R. Statin and risk of pneumonia a nested case-control study. *Pharmacotherapy* 27:525-532; 2006.

SHAHANGIAN, A.; CHOW, E.K.; TIAN, X.; KANG, J.R.; GHAFARI, A.; LIU, S.Y.; BELPERIO, J.A.; CHENG, G.; DENG, J.C. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J Clin Invest.* 119(7):1910-20; 2009.

SHUTES, A.; ONESTO, C.; PICARD, V.; LEBLOND, B.; SCHWEIGHOFFER, F.; DER, C.J. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem.* 282(49):35666-78; 2007.

SHANKAR-SINHA, S.; VALENCIA, G.A.; JANES, B.K.; ROSENBERG, J.K.; WHITFIELD, C.; BENDER, R.A.; STANDIFORD, T.J.; YOUNGER, J.G. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect Immun.* 72(3):1423-30; 2004.

SHISHEHBOR, M.H.; BRENNAN, M.L.; AVILES, R.J.; FU, X.; PENN, M.S.; SPRECHER, D.L.; HAZEN, S. L. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*, 108(4):426-31; 2003.

SHISHEHBOR, M.H.; AVILES, R.J.; BRENNAN, M.L.; FU, X.; GOORMASTIC, M.; PEARCE, G.L.; GOKCE, N.; KEANEY, J.F.J.R; PENN, M.S.; SPRECHER, D.L.; VITA, J.A.; HAZEN, S.L. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA*, 289(13):1675-80; 2003.

SHUTES, A.; ONESTO, C.; PICARD, V.; LEBLOND, B.; SCHWEIGHOFFER, F.; DER, C.J. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J. Biol. Chem.* 282(49):35666-35678; 2007.

SILVA, R.C.; LANDGRAF, G.; HIYANE, M.I.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N.O.; LANDGRAF, R.G. Leukotrienes Produced in Allergic Lung Inflammation activate alveolar macrophages. *Cell Physiol. Biochem.* 26:319-326; 2010.

SOARES, A.C.; PINHO, V.; SOUZA, D.G.; SHIMIZU, T.; ISHII, S.; NICOLI, J.R.; TEIXEIRA, M.M. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 137(5):621-8; 2002.

SOARES, A.C.; SOUZA, D.G.; PINHO, V.; VIEIRA, A.T.; BARSANTE, M.M.; NICOLI, J.R.; TEIXEIRA, M.M. Impaired host defense to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice treated with the PDE4 inhibitor rolipram. *Br. J. Pharmacol.* 140(5):855-62; 2003.

SOARES, A.C.; SOUZA, D.G.; PINHO, V.; VIEIRA, A.T.; NICOLI, J.R.; CUNHA, F.Q.; MANTOVANI, A.; REIS, L.F.; DIAS, A.A.; TEIXEIRA, M.M. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. *Microbes Infect.* 8(5):1321-9; 2006.

STOCKMAN, L.J.; CURNS, A.T., ANDRESON, L.J., FISHER-LANGLAY, G. Respiratory Syncytial Virus-associated Hospitalizations Among Infants and Young Children in the United States, 1997-2006. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; 2011.

SUTHERLAND, R.E.; OLSEN, J.S.; MCKINSTRY, A.; VILLALTA, S.A.; WOLTERS, P.J. Mast cell IL-6 improves survival from *Klebsiella pneumoniae* and sepsis by enhancing neutrophil killing. *J. Immunol.* 15,181(8):5598-605; 2008.

TAKEMOTO, M.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21(11):1712-9; 2001.

TERBLANCHE, M.; ALMOG, I.; ROSENSON, R.S.; SMITH, T.S; HACKAM, D.G. Statin and sepsis:multiple modifications at multiple levels. *Lancet Infect Dis.*7:358-368; 2007.

TSAI, W.C.; STRIETER, R.M.; WILKOWSKI, J.M.; BUCKNELL, K.A.; BURDICK, M.D.; LIRA, S.A.; STANDIFORD, T.J. Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* in mice. *J. Immunol.* 1;161(5):2435-40; 1998.

TEIXEIRA, M.M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. Editorial. Response to na infecious insult. *Braz. J. Med. Biol.Res.*34:1p preceding 555; 2001.

TLEYJEH, I.M.; KASHOUR, T.; HAKIM, F.A.; ZIMMERMAN, V.A.; ERWIN, P.J.; SUTTON, A.J.; IBRAHIM, T. Statins for the prevention and treatment of infections: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* 12; 169(18):1658-67; 2009.

TU, W.; MAO, H.; ZHENG, J.; LIU, Y.; CHIU, S.S.; QIN, G.; CHAN, P.L.; LAM, K.T.; GUAN, J.; ZHANG, L.; GUAN, Y.; YUEN, K.Y.; PEIRIS, J. S.; LAU, Y.L. Cytotoxic T Lymphocytes Established by against 2009 Pandemic H1N1 Influenza Seasonal Human Influenza Cross-React. *J. Virol.*, 84(13):6527; 2010.

TUĐOSE, C.; MOISOIU, A.; BOGDAN, M. Mortality Risk and Etiologic Spectrum of Community-acquired Pneumonia in Hospitalized Adult Patients. *Maedica Buchar.* (4):258-64; 2010.

.

VAN DE GARD, E.M.; HAK, E.; SOUVEREIN, P.C.; HOES, A.W.; VAN DEN BOSCH, J.M.; LEUKFENS, H.G. Statins therapy and reduced risk of pneumoniae in patients with diabetes. *Thorax*, 61: 957-61; 2006.

VAN DER WINDT, G.J.; FLORQUIN, S.; DE VOS, A.F.; VAN'T VEER, C.; QUEIROZ, K.C.; LIANG, J.; JIANG, D.; NOBLE, P.W.; VAN DER POLL, T. CD44 deficiency is associated with increased bacterial clearance but enhanced lung inflammation during Gram-negative pneumonia. *Am. J. Pathol.* 177(5):2483-94; 2010.

VILCEK, J.; FELDMAN, M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* 25(4):201-9; 2004.

YOSHIDA, K.; MATSUMOTO, T.; TATEDA, K.; UCHIDA, K.; TSUJIMOTO, S.; IWAKURAI, Y.; YAMAGUCHI, K. Protection against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in mice by interferon-gamma through activation of phagocytic cells and stimulation of production of other cytokines. *J. Med. Microbiol.* 50(11):959-64; 2001.

WAHANE, V.D.; KUMAR, V.L. Atorvastatin ameliorates inflammatory hyperalgesia in rat model of monoarticular arthritis. *Pharmacol. Res.* (4):329-33; 2010.

WANG, J. P.; BOWEN, G.N. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils. by influenza A virus. *Blood*, 112(5): 2028-34; 2008.

WANG, C.Y.; LIU, P.Y.; LIAO, J.K. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol. Med.*14(1):37-44; 2008.

WAREING, M. D.,SHEA, A.L.; INGLIS, C.A.; DIAS, P.B.; SARAWAR, S.R. CXCR2 is required for neutrophil recruitment to the lung during influenza virus infection, but is not essential for viral clearance. *Viral Immunol.* 20(3): 369-78; 2009.

WIERZBICKI, A.S., MIKHAILIDIS, D.P. Dose-response effects of atorvastatin and simvastatin on high-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolaemic patients: a review of five comparative studies. *Int.J. Cardiol.*84(1):53-7; 2002.

WELTE, T., KOHNLEIN, T. Global and Local epidemiology of Community-Acquired pneumonia: The experience of the CAPNETZ Network, *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 30(2):127-135; 2009.

WEINER, H.L.; SELKOE, D.J. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature*, 19-26 ;420(6917): 879-84; 2002.

ZHAO, X.Y.; LI, L.; ZHANG, J.Y.; LIU, G.Q.; CHEN, Y.L.; YANG, P.L.; LIU, R.Y. Atorvastatin prevents left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 30(12):2646-8; 2010.

ANEXO 1:

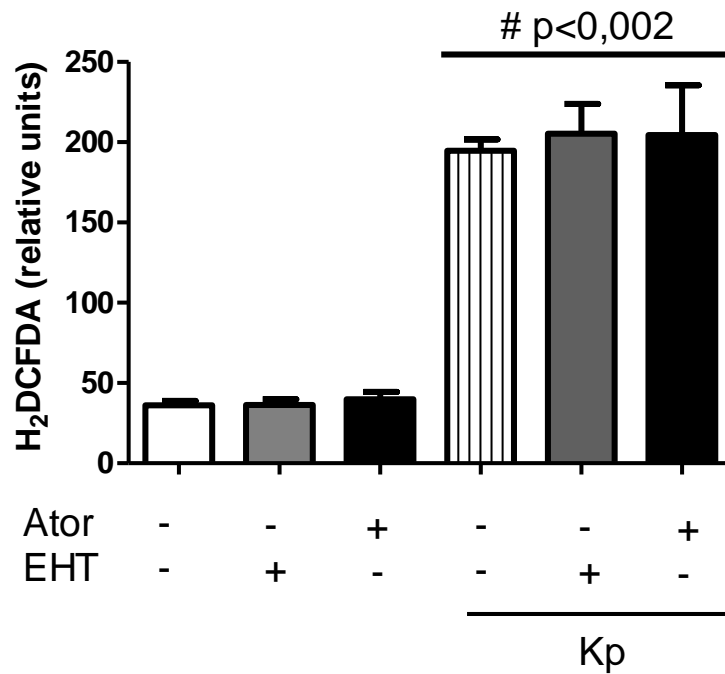


FIGURA 1: Produção de ROS em macrófagos peritoneais infectados e tratados com atorvastatina ou inibidor de Rac GTPases 1 e 2b (EHT 1864) meia hora antes da infecção com *K. pneumoniae*. (M.O.I. 30:1) .Teste estatístico One Way ANOVA.

