

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Felipe Silva Carvalho

ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA GILZ (*GLUCOCORTICOID-INDUCED
LEUCINE ZIPPER*) EM MODELOS DE PNEUMONIA EXPERIMENTAL

Belo Horizonte

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Felipe Silva Carvalho

ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA GILZ (*GLUCOCORTICOID-INDUCED
LEUCINE ZIPPER*) EM MODELOS DE PNEUMONIA EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

Coorientadora: Dra. Jéssica Amanda Marques Souza

Belo Horizonte

2022

C331e Carvalho, Antônio Felipe Silva.
Estudo do papel da proteína GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine zipper*) em modelos de pneumonia experimental [recurso eletrônico] / Antônio Felipe Silva Carvalho. – 2022.
1 recurso eletrônico (70 f. : il.) : pdf.

Orientadora: Lirlândia Pires de Sousa.
Coorientadora: Jéssica Amanda Marques Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader

1. Inflamação – Teses. 2. Mediadores da inflamação – Teses. 3. *Streptococcus pneumoniae* – Teses. 4. Lesão pulmonar aguda – Teses. 5. Pneumonia – Teses. I. Sousa, Lirlândia Pires de. II. Souza, Jéssica Amanda Marques. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.24



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO ANTÔNIO FELIPE SILVA CARVALHO

Realizou-se, no dia 10 de fevereiro de 2022, às 13:30 horas, por videoconferência, a 366ª defesa de dissertação, intitulada *ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA GILZ (GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER) EM MODELOS DE PNEUMONIA EXPERIMENTAL*, apresentada por ANTÔNIO FELIPE SILVA CARVALHO, número de registro 2020658865, graduado no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Lirlândia Pires de Sousa - Orientadora, Dr(a). Jéssica Amanda Marques Souza - Coordenadora (UFMG). Prof(a). Flávio Almeida Amaral (UFMG), Prof(a). Caio Tavares Fagundes (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2022, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lirlandia Pires de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 10/02/2022, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2022, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jéssica Amanda Marques Souza, Usuária Externa**, em 10/02/2022, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1234328** e o código CRC **8A17A970**.

DEDICATÓRIAS

A Deus pela benção de chegar até o fim dessa jornada, pelo amor e proteção.

À minha mãe Antônia Edith Silva Carvalho e à minha avó Francisca Vieira de Melo Silva por sonharem comigo, pelo incentivo e amor incondicionais, por vibrarem a cada conquista e por estarem comigo nos momentos felizes e nos mais difíceis.

Ao meu irmão Antônio Guilherme Silva Carvalho (*in memoriam*) com quem compartilhei os melhores momentos de minha vida.

Aos meus irmãos Lucas Carvalho, Brenda Janaína e Caio Igor.

Às minhas sobrinhas Maria Sofia e Anabela.

Ao meu padrasto Francisco Menezes, meu pai Carlos Augusto e minha madrastra Givanilde Vieira.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ao Laboratório de Sinalização da Inflamação e Neoplasia (Faculdade de Farmácia) e ao Laboratório de Imunofarmacologia (Instituto de Ciências Biológicas) pelo apoio para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa pelo apoio constante desde o início da minha jornada, pela paciência e pelo conhecimento transmitido da melhor forma possível.

À Jéssica Amanda Marques Souza e Luciana Pádua Tavares por terem aceitado me coorientar e por estarem presentes em cada etapa.

Aos Professores Dr. Flávio Almeida Amaral e Dr. Caio Tavares Fagundes e à Dra. Juliana Priscila Vago da Silva pela disponibilidade, atenção e carinho ao aceitar fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Ao Professor Dr. Mauro Martins Teixeira pela colaboração científica.

Aos amigos que fiz durante o curso de mestrado, Isabella Zaidan, Josiane Cristina, Laís Cunha, Camilla Cardoso, Celso Queiroz, pela amizade e apoio nos inúmeros experimentos que realizamos juntos.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Aos amigos Adriano Jardel, Alzirene Sales, Anne Alyne, Felipe Fonteles, Franklin Muniz, Helenice Araújo, Jeferson Pereira, Jéssica Evelyn, Leandra Sodré, Luciene Sousa, Karollayne Alves, Marcus Vinícius, Marllen Santos, Pedro Rocha, Rayssa Lopes, Rômulo Araújo, Roseane Ribeiro, Solange Mendes, Suelen Serra, que foram meu alicerce durante esses anos longe de casa.

A Marco Túlio pelos momentos ímpares.

Às minhas madrinhas Maria Oliveira e Ana Maria pelo amor e ensinamentos.

Aos animais utilizados durante a pesquisa, o meu respeito.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

RESUMO

A pneumonia é uma das principais causas de morbiletalidade na população mundial. Embora a inflamação seja uma resposta protetora do hospedeiro que possibilita a eliminação bacteriana, uma resposta finamente regulada é necessária para evitar danos secundários aos tecidos. A proteína induzida por glicocorticoides GILZ (*Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper*) possui ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas caracterizadas em modelos pré-clínicos de inflamação aguda. No entanto, o papel terapêutico de GILZ em doenças infecciosas ainda é pouco explorado. Aqui, investigamos o papel e os efeitos de GILZ durante a lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS e na pneumonia induzida por *Streptococcus pneumoniae*. Camundongos com deficiência de GILZ (GILZ^{-/-}) apresentaram LPA mais grave, caracterizada por aumento da inflamação neutrofílica no lavado broncoalveolar (BAL), diminuição da eferocitose por macrófagos e maior dano pulmonar, quando comparado aos animais WT. De forma interessante, a inflamação neutrofílica e o dano pulmonar foram atenuados em camundongos WT tratados com proteína de fusão TAT-GILZ. Durante a pneumonia pneumocócica, o tratamento com TAT-GILZ reduziu a inflamação neutrofílica e aumentou a porcentagem de eferocitose no BAL, além de diminuir o dano pulmonar associado à infecção bacteriana. *In vitro*, TAT-GILZ aumenta a fagocitose de pneumococos em linhagem de macrófagos alveolares e em macrófagos obtidos da medula óssea (BMDMs) de animais WT, sendo a porcentagem de fagocitose menor em BMDMs de animais deficientes em GILZ. De maneira importante, o tratamento precoce com TAT-GILZ protegeu 30% dos camundongos infectados com *S. pneumoniae* da pneumonia letal. Em resumo, apresentamos neste estudo evidências de que TAT-GILZ aumenta a resiliência e resistência do hospedeiro durante a pneumonia pneumocócica, controlando a inflamação pulmonar, favorecendo a eferocitose e reduzindo a carga bacteriana, mecanismos que somados culminam na redução da letalidade dos animais. De acordo com os dados pré-clínicos obtidos neste estudo, sugere-se que terapias farmacológicas baseadas em GILZ possam ser promissoras para o tratamento de infecções respiratórias graves.

Palavras-chave: resolução da inflamação; mediadores pró-resolutivos; *Streptococcus pneumoniae*; lesão pulmonar aguda.

ABSTRACT

Pneumonia is a leading cause of morbidity and mortality. While inflammation is a host protective response that ensures bacterial clearance, a finely regulated response is necessary to prevent bystander tissue damage. Glucocorticoid (GC)-induced leucine zipper (GILZ) is a GC-induced protein with anti-inflammatory and proresolving bioactions, yet the therapeutical role of GILZ in infectious diseases remains unexplored. Herein, we investigate the role and effects of GILZ during acute lung injury (ALI) induced by LPS and *Streptococcus pneumoniae* infection. GILZ deficient mice (GILZ^{-/-}) presented more severe ALI, characterized by increased inflammation, decreased macrophage efferocytosis and pronounced lung damage. In keep with that, pulmonary inflammation, and damage were attenuated in WT mice treated with TAT-GILZ fusion protein. During pneumococcal pneumonia, TAT-GILZ reduced neutrophilic inflammation and prevented the associated lung damage. There was also enhanced macrophage efferocytosis and bacterial clearance in TAT-GILZ-treated mice. Mechanistically, TAT-GILZ enhanced macrophage phagocytosis of pneumococcus, which was lower in GILZ^{-/-} macrophages. Noteworthy, early treatment with TAT-GILZ rescued 30% of *S. pneumoniae*-infected mice from lethal pneumonia. Altogether, we present evidence that TAT-GILZ enhances host resilience and resistance to pneumococcal pneumonia by controlling pulmonary inflammation and bacterial loads leading to decreased lethality. Exploiting GILZ pathways holds promise for the treatment of severe respiratory infections.

Keywords: inflammation resolution; proresolving mediators; *Streptococcus pneumoniae*; acute lung injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> - Coloração de Gram e crescimento em agar sangue.....	16
Figura 2. Fatores de virulência de <i>S. pneumoniae</i>	17
Figura 3. Sinais cardinais da inflamação.....	21
Figura 4. Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo.....	22
Figura 5. Mecanismo de ação de GILZ.....	25
Figura 6. Representação esquemática dos mecanismos de transativação e transrepressão de GCs e o efeito de GILZ.....	27
Figura 7. A deficiência de GILZ leva a uma resposta inflamatória mais intensa durante a Lesão Pulmonar Aguda induzida por LPS.....	39
Figura 8. Camundongos com deficiência de GILZ apresentam exacerbação da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	40
Figura 9. O tratamento com TAT-GILZ durante a LPA induzida por LPS modula a inflamação neutrofílica e aumenta os índices de eferocitose.....	42
Figura 10. Efeito do tratamento com TAT-GILZ no curso da pneumonia pneumocócica.....	44
Figura 11. Efeito do tratamento com TAT-GILZ no dano pulmonar associado à infecção pneumocócica.....	46
Figura 12. TAT-GILZ aumenta a fagocitose de <i>Streptococcus pneumoniae</i> por macrófagos.....	48
Figura 13. O tratamento com TAT-GILZ protegeu 30% dos camundongos da pneumonia pneumocócica letal.....	51
Figura 14. Efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos do tratamento com TAT-GILZ na inflamação pulmonar infecciosa.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

AnxA1: anexina A1

AP-1: proteína ativadora-1

ATCC 6303: *American Type Culture Collection* 6303 – cepa da bactéria *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 3 adquirida da coleção de microrganismos Norte Americana

ATP: adenosina trifosfato

BAL: *Bronchoalveolar Lavage* – lavado broncoalveolar

BALB/c: linhagem de camundongos albinos

BSA: *bovine serum albumin* – albumina de soro bovino

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

CEUA: Comitê de Ética para Uso de Animais

CFU: *Colony forming unit* – unidade formadora de colônia

CO₂: Dióxido de carbono

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

DAMP: *damage-associated molecular patterns* – padrões moleculares associados ao dano

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPI: Doença pneumocócica invasiva

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ERK1/2: *Extracellular signal-regulated kinase* – cinase regulada por sinal extracelular

GC: glicocorticoide

GR: *glucocorticoid receptor* – receptor de glicocorticóide

GILZ: *glucocorticoid-induced leucine zipper* – proteína induzida por glicocorticoide que possui zipper de leucina

GRE: *glucocorticoid responsive elements* – elementos responsivos aos glicocorticóides

IL- (): interleucina- ()

i.n.: intranasal

i.p.: intraperitoneal

LPA: lesão pulmonar aguda

LPS: Lipopolissacarídeo

M: molar

mg: miligrama

mg/kg: miligramas por quilograma

mg/mL: miligramas por mililitro

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

Mock: grupo não infectado

MOI: multiplicidade de infecção

Nan (): Neuraminidase ()

NaCl: Cloreto de sódio

NFκB: *Nuclear Factor kappa B* (Fator nuclear kappa B)

nm: nanômetro

NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain*

OD: *Optical Density* – densidade óptica

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPD: *o-phenylenediamine dihydrochloride*

PAC: Pneumonia Adquirida na Comunidade

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PBS: *Phosphate-Buffered Saline* (tampão salina fosfato)

PCV: Vacina Conjugada de Polissacarídeos

PDE: Fosfodiesterase

PH: pneumonia hospitalar

pH: potencial hidrogeniônico

Ply: pneumolisina

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrão

PsaA: Adesina de superfície de pneumococo A

PspA/C: proteína A ou C de superfície pneumocócica

ROL: Rolipram

ROS: espécies reativas de oxigênio

RPM: rotações por minuto

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo

SEM: *Standard error of mean* - erro padrão da média

THY: meio de cultura Todd Hewitt acrescido de 0,5% de extrato de levedura

TLR: *Toll like receptor* – receptores do tipo Toll

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> e fatores de virulência	15
1.2	Resposta inflamatória na pneumonia pneumocócica	18
1.3	Profilaxia e tratamento da doença pneumocócica	18
1.4	A Resposta inflamatória e sua resolução	20
1.5	Mecanismo de ação dos glicocorticoides e de GILZ	24
1.6	O efeito de GILZ em modelos pré-clínicos de infecção	26
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVO	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Animais	31
4.2	Bactéria	31
4.3	Modelos de lesão pulmonar aguda (LPA) e protocolos de tratamento	32
4.4	Acompanhamento da letalidade	32
4.5	Eutanásia e coleta das amostras para análise	33
4.6	Contagem de células e bactérias	33
4.6.1	Contagem de bactérias no lavado broncoalveolar (BAL)	33
4.6.2	Contagem de bactérias no sangue	33
4.6.3	Contagem total e diferencial de células	33
4.7	Dosagem de proteínas no BAL	34
4.8	Dosagem de citocinas por ELISA	34
4.9	Análise histológica	35
4.10	Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)	35
4.11	Ensaio de fagocitose	35
4.12	Avaliação da eferocitose	36

4.13	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i>	36
4.14	Análise estatística.....	36
5	RESULTADOS	38
5.1	<i>GILZ é crucial para o controle da inflamação durante a lesão pulmonar aguda induzida por LPS</i>	38
5.2	<i>O tratamento TAT-GILZ modula a resposta inflamatória, aumenta a eferocitose e a depuração bacteriana durante a pneumonia pneumocócica</i>	43
5.3	<i>O tratamento com TAT-GILZ diminui o dano pulmonar causado durante a pneumonia pneumocócica</i>	45
5.4	<i>GILZ estimula macrófagos alveolares e macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) a fagocitarem pneumococos</i>	47
5.5	<i>O tratamento TAT-GILZ previne 30% da letalidade induzida pela pneumonia pneumocócica</i>	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A	70

1 INTRODUÇÃO

Os pulmões são os órgãos internos mais vulneráveis às infecções e lesões do ambiente externo devido a constante exposição deste órgão à partículas, produtos químicos e organismos infecciosos do ar ambiente (FIRS, 2017). As doenças ou infecções que acometem o trato respiratório superior ou inferior e que levam a obstrução da passagem de ar, tanto no nível nasal como no nível bronquiolar, são definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doenças respiratórias (WHO, 2020).

As infecções das vias respiratórias superiores (IVRS) são muito frequentes e raramente oferecem risco de morte. Por outro lado, as infecções das vias respiratórias inferiores (IVRI) são responsáveis por doenças mais graves, tais como gripe, tuberculose, bronquiolite e pneumonias, as quais são consideradas como as principais causas de mortalidade por infecções respiratórias agudas (IRAs) (AZEVEDO *et al.*, 2015).

Em todo o mundo a pneumonia foi a maior causa de mortalidade de origem infecciosa em adultos e crianças em 2019 totalizando 2,5 milhões, incluindo 672.000 crianças (UNICEF, 2020). Segundo o DATASUS (2022), as doenças do aparelho respiratório representaram a terceira causa de óbitos no Brasil em 2019 e, dentre essas, a pneumonia foi a mais frequente com 83.080 (51,28%) de mortes, sendo 2% em menores de 5 anos e 72% em pessoas com 70 anos ou mais. A pneumonia é definida como uma inflamação do parênquima pulmonar produzida por bactérias, vírus, fungos ou outras etiologias, e são classificadas como pneumonia adquirida na comunidade (PAC) ou pneumonia hospitalar (PH), de acordo com o local onde infecção foi adquirida (FONSECA *et al.*, 2017; ASSUNÇÃO *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2019).

Dentre os principais agentes etiológicos causadores de infecções do trato respiratório inferior, pode-se citar leveduras do gênero *Candida* (XU *et al.*, 2019), os vírus da influenza A e B, o vírus sincicial respiratório e adenovírus (NASCIMENTO-CARVALHO, 2020), coronavírus (SARS-CoV, MERS e SARS-CoV-2) (WHO, 2020a), e bactérias como *Streptococcus pneumoniae* (ANDRADE, 2018), *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (BRENTINI, 2019), sendo que esta última apresenta maior incidência em pacientes hospitalizados e em uso de ventilação mecânica (WU *et al.*, 2019).

Recentemente uma nova doença respiratória infecciosa assola o mundo inteiro, a *Coronavirus Disease – 19* (COVID-19), causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, declarada como pandemia pela OMS em 11 de março de 2020. Em todo o mundo o SARS-CoV-2 já infectou mais de 346 milhões de pessoas, com mais de 5,58 milhões mortes (WHO, 2022). As infecções virais têm a capacidade alterar a imunidade do hospedeiro, facilitando o desenvolvimento da coinfeção viral-bacteriana. Nas formas graves de SARS-CoV-2 foi observado que a maioria dos pacientes adquiriu infecção bacteriana secundária (SMITH; SWEET, 2002; ALMAND; MOORE; JAYKUS, 2017; TETRO, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). As infecções pneumocócicas secundárias que ocorrem durante ou após uma infecção viral são frequentemente associadas ao aumento das taxas de mortalidade (SHORT *et al.*, 2012). Coinfecções bacterianas no contexto de pandemias e epidemias virais têm consequências importantes sobre o sistema de saúde, especialmente em grupos de alto risco, como aqueles com imunodeficiência ou imunossupressão (MACINTYRE; BUI, 2017). Nesse cenário, ficou evidente que a inserção de um novo microrganismo no ambiente pode alterar a prevalência das pneumonias adquiridas na comunidade (PACs) (SENDER; HENTRICH; HENRIQUES-NORMARK, 2021).

A PAC constitui uma das principais causas de morte no mundo, com significativo impacto nas taxas de morbidade (WELTE; TORRES; NATHWANI, 2012). O principal agente etiológico de PAC é a bactéria *S. pneumoniae* (ANDRADE, 2018). O estudo das pneumonias causadas por esse microrganismo é essencial para descobertas de novas alternativas terapêuticas necessárias para a redução da mortalidade causada por essa doença.

1.1 ***Streptococcus pneumoniae* e fatores de virulência**

A bactéria *S. pneumoniae*, também conhecida como pneumococo, é caracterizada por se apresentarem morfológicamente como cocos Gram-positivos com 0,5 a 1,2 µm de diâmetro, ovais, dispostos aos pares (diplococos) ou em cadeias curtas (Figura 1A). As colônias apresentam α-hemólise em agar sangue e aquelas de sorotipos encapsulados são geralmente grandes (1 a 3 µm de diâmetro em ágar-sangue e menores em ágar-chocolate), translúcidas, redondas e mucoides (Figura 1B). Já as colônias de sorotipos não encapsulados são menores e planas. Para seu cultivo em laboratório é necessário o uso de meios enriquecidos, suplementados com sangue

(como os meios de Mueller Hinton, infusão de cérebro e coração ou Columbia) ou o caldo Todd Hewitt, que devem ser incubados em atmosfera de CO₂ a 5% (capnofilia).

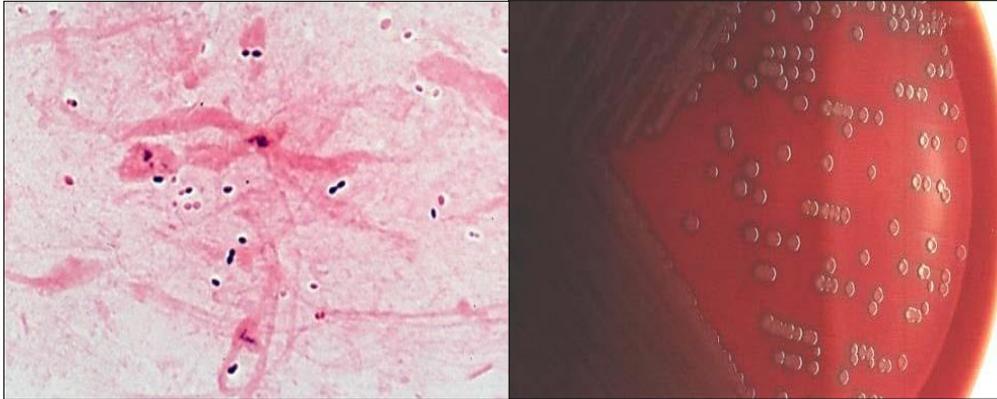


Figura 1. *Streptococcus pneumoniae* - Coloração de Gram e crescimento em agar sangue. Gram de amostra clínica (lavado broncoalveolar) de *S. pneumoniae* apresentando morfologia clássica de diplococos Gram positivos lanceolados (alguns apresentam labilidade ao Gram) (lado esquerdo). No lado direito, a figura mostra morfologia das colônias após cultura em agar sangue. Após 18-24h as colônias começam a apresentar aspecto achatadas e umbilicado devido a autólise das bactérias (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

S. pneumoniae pode colonizar o trato respiratório superior de forma assintomática podendo se disseminar e permanecer na comunidade, estando determinados sorotipos mais adaptados a causar doenças invasivas (MALFROOT *et al.*, 2004; SA-LEAO *et al.*, 2011). Em média, a taxa de colonização é de 30 - 50% em crianças pequenas e de 10 - 20% em adultos, podendo variar de uma população para outra e de acordo com a estação do ano (EKDAHL *et al.*, 1997; FERREIRA *et al.*, 2001; REY *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 2019). No entanto, a invasão do pneumococo em outros locais normalmente estéreis, como o trato respiratório inferior, as meninges e o sangue, pode causar doenças graves (DONKOR, 2013). Os sorotipos virulentos de *S. pneumoniae* são envolvidos com uma complexa cápsula de natureza polissacarídica (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014), que se constitui em um fator de virulência essencial e permite a distinção de pelo menos 100 sorotipos (GANAIE *et al.*, 2020).

O pneumococo produz enzimas importantes no processo de infecção (MASSAIA, 2010). Os fatores de virulência do pneumococo contribuem para a sua transmissão, colonização, evasão imunológica e invasão tecidual, os quais são fatores-chave na patogênese da infecção. A função principal da cápsula

polissacarídica é impedir a opsonização e fagocitose bacteriana, constituindo um importante mecanismo de escape do sistema imune (WEISER; FERREIRA, 2018; BROOKS; MIAS, 2018). Além disso, *S. pneumoniae* possui vários de fatores de virulência (Figura 2) como: neuraminidase A (NanA), proteína A da superfície pneumocócica (PspA), proteína C da superfície pneumocócica (PspC), antígeno A da superfície pneumocócica (PsaA), autolisina (LytA) e pneumolisina (Ply). A toxicidade da Ply está associada à sua capacidade de induzir poros em forma de anel em membranas causando a morte celular. Já a LytA é responsável pelo comportamento autolítico característico dos pneumococos (TILLEY *et al.*, 2005). As proteínas de *S. pneumoniae* liberadas durante a autólise possuem atividade pró-inflamatória. Esse mecanismo contribui para a patogênese da doença pneumocócica grave por meio da exacerbação do dano tecidual associado à resposta inflamatória (NAGAI *et al.*, 2018).

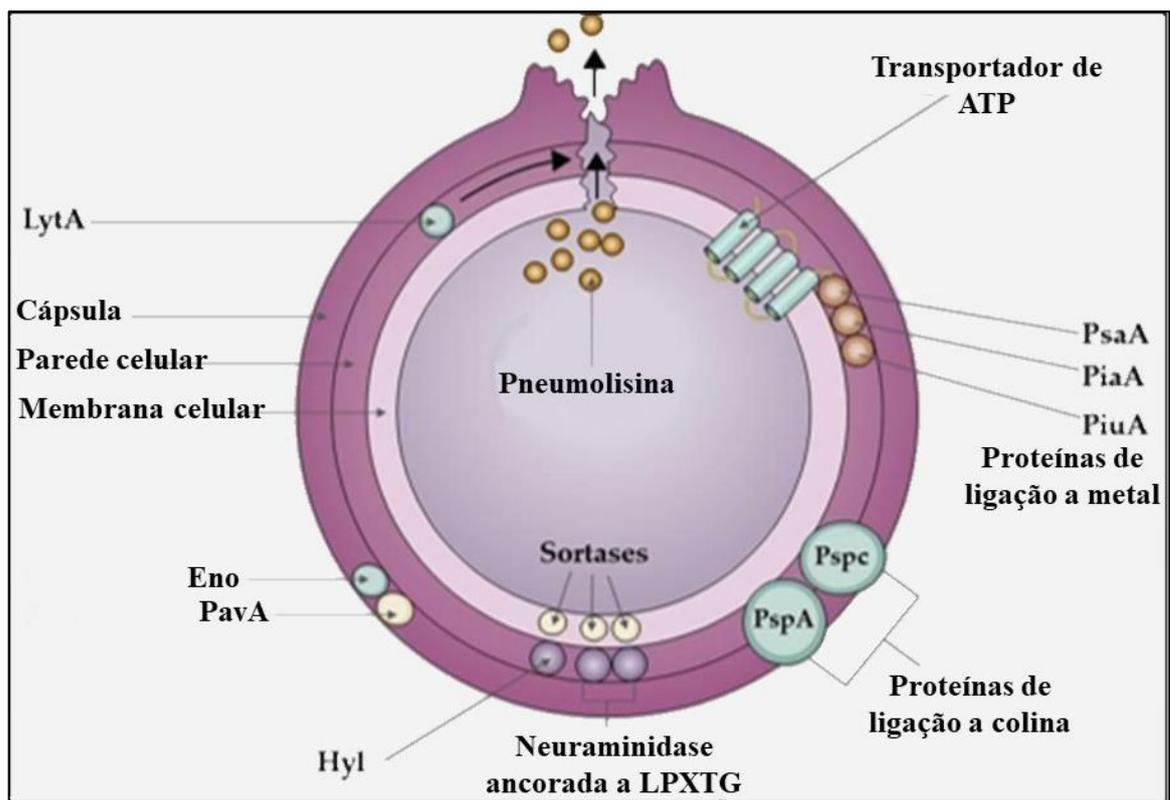


Figura 2. Fatores de virulência de *S. pneumoniae*. Cápsula, proteínas de superfície A e C (PspA e PspC), neuroaminidase ancorada a LPXTG, hialuronato liase, adesão e virulência pneumocócica A (PavA), enolase (Eno), pneumolisina, autolisina (LytA) e proteínas pneumocócicas de ligação a metal – antígeno de superfície A (PsaA), aquisição de ferro A (PiaA) e captação de ferro A (PiuA). Adaptado de KADIOGLU *et al.*, 2008.

1.2 Resposta inflamatória na pneumonia pneumocócica

A doença pneumocócica inclui diferentes tipos de infecções. Os sintomas dependem da parte do corpo que está infectada. Os principais sintomas da infecção pulmonar estão relacionados com a resposta imune e incluem febre, calafrios, tosse, dispneia e dor no peito (CDC, 2020). A resposta imune inata desempenha um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra o pneumococo nos estágios iniciais da infecção (TAVARES; GALVÃO; FERRERO, 2021). *S. pneumoniae* é uma das principais causas de otite média, meningite, bacteremia e pneumonia. A transmissão ocorre através de gotículas no ar contendo bactérias viáveis (CDC, 2020). Uma vez que um indivíduo tenha sido colonizado ou infectado por *S. pneumoniae*, uma resposta imune contra diferentes estruturas dessa bactéria será desencadeada (SNIPPE *et al.*, 1995; TAVARES; GALVÃO; FERRERO, 2021). Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como os do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo NOD (NLRs), receptores do tipo RIG-I (RLRs) são capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) tecidual induzido pelo patógeno (MEDZHITOV, 2008). O reconhecimento da bactéria por PRRs localizados na superfície celular do epitélio pulmonar e macrófagos alveolares ativa a indução de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e quimiocinas (CXCL1, CXCL2) pró-inflamatórias, levando à rápida e intensa infiltração de neutrófilos nos pulmões infectados (KAFKA *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2015, ZHANG *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2019). O sistema complemento é ativado através de uma cascata dependente de C3 em resposta à infecção por *S. pneumoniae* (KERR *et al.*, 2005; TAVARES; GALVÃO; FERRERO, 2021).

1.3 Profilaxia e tratamento da doença pneumocócica

As infecções pneumocócicas continuam sendo importante causa global de morbimortalidade, principalmente em crianças e idosos (KASPER & FAUCI, 2015). Dentre as medidas para prevenção da doença pneumocócica podemos citar a vacinação contra *S. pneumoniae* e vírus da influenza e a prevenção do uso inadequado de antimicrobianos, o que aumenta a resistência dos pneumococos (GOMES, 2001).

Esforços para prevenção e controle da doença pneumocócica têm focado no desenvolvimento de vacinas anticapsulares eficazes. A incorporação das vacinas polissacarídicas conjugadas em programas de imunização reduziram

consideravelmente os casos da doença em todo o mundo. No entanto, sorotipos não cobertos pelas vacinas conjugadas tornaram-se mais prevalentes (ALMEIDA, 2014). As vacinas anti-pneumocócicas disponíveis são baseadas nos polissacarídeos capsulares que podem estar conjugados ou não a uma proteína carreadora imunogênica (TAVARES, 2015). No Brasil, o Ministério da Saúde disponibiliza três vacinas contra *S. pneumoniae*: vacina Pneumocócica Polissacarídica 23-Valente (VPP23), a vacina conjugada 10-valente (VPC10) e a vacina conjugada 13-valente (VPC13) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; SBPT, 2019).

A OMS recomenda o uso da VPP23 que contém antígenos dos sorotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, por serem as cepas presentes entre 85 e 90% dos casos de doença pulmonar invasiva (DPI), principalmente em adultos (WHO, 2018). A resposta imune provocada pela VPP23 envolve a produção de anticorpos do tipo IgM. Nas situações em que o antígeno não estimula as células de memória (antígeno T-independente), a persistência dos anticorpos é limitada. As vacinas constituídas apenas de polissacarídeo apresentam uma boa proteção, mas com duração limitada (BAKER, 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

As vacinas conjugadas são capazes de desencadear uma produção satisfatória de anticorpos específicos. A VPC10 (com antígenos dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), indicada para criança com menos de 2 anos, é conjugada com a proteína D de *Haemophilus influenzae* e carreadores de toxoides diftérico e tetânico (FARKOUH *et al.*, 2012). Além da VPC10, a vacina pneumocócica conjugada 13-valente (VPC13) está licenciada no Brasil para o uso em crianças. A VPC13 contém os antígenos dos sorotipos 3, 6A e 19A juntamente com os antígenos presentes na VPC10, e é conjugada ao toxoide diftérico. A conjugação dos polissacarídeos do capsulares do pneumococo à uma proteína transportadora (vacina conjugada) resulta em antígeno indutor de resposta imune T dependente sendo, portanto, mais robusta e capaz de eliminar o patógeno de maneira mais eficaz (FARKOUH *et al.*, 2012; SBIM, 2018). A VPC13 passou a ser oferecida na rede pública de saúde para pacientes oncológicos, pacientes vivendo com HIV/AIDS, indivíduos submetidos a transplante de medula óssea ou de órgãos sólidos, a partir dos 5 anos de idade (SBPT, 2019).

A vacinação é uma ferramenta importante para diminuir a disseminação e a gravidade de doenças causadas por *S. pneumoniae*. No entanto, as vacinas atuais

têm como alvo apenas um subconjunto de sorotipos pneumocócicos, e os tipos não vacinais permanecem em altas frequências após a vacinação. Em alguns casos, os tipos não vacinais exibem um aumento nas frequências de resistência aos antimicrobianos após a vacinação de uma população (OBOLSKI *et al.*, 2018).

A penicilina era o tratamento de escolha para as doenças pneumocócicas. No entanto, hoje existem cepas de *S. pneumoniae* que apresentam níveis de susceptibilidade distintas em vários países. Isso ocorre devido a capacidade de evolução e adaptação dos microrganismos, com resultante diminuição da sensibilidade a diversos fármacos (OLIVEIRA *et al.*, 2021). A resistência à penicilina está associada à redução da afinidade do antimicrobiano com as proteínas ligadoras de penicilina, presentes na parede celular bacteriana. Os pacientes infectados com sorotipos resistentes possuem risco aumentado de desfecho desfavorável. Adicionalmente, resistência aos macrolídeos (p. ex., eritromicina), tetraciclina, e cefalosporinas de terceira geração (p. ex., ceftriaxona) também se tornou comum. Assim, para as infecções pneumocócicas graves, é recomendado o tratamento com uma combinação de antimicrobianos, até que os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* estejam disponíveis. A combinação de vancomicina com ceftriaxona é frequentemente utilizada no ambiente hospitalar para o tratamento empírico, seguida de monoterapia com uma cefalosporina, fluoroquinolona ou vancomicina (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

1.4 A Resposta inflamatória e sua resolução

A resposta inflamatória é um evento da imunidade inata, orquestrado espacial e temporalmente, no qual células e mediadores colaboram para neutralizar e/ou eliminar os estímulos nocivos, seja de natureza infecciosa ou não; e quando autolimitada evolui para resolução e restauração da homeostase (MEDZHITOV, 2010). Os mediadores pró-inflamatórios liberados durante a resposta são responsáveis pelo aparecimento dos sinais cardinais da inflamação (Figura 3): calor, rubor, edema, dor e perda de função (revisto por WALLACH; KANG; KOVALENKO, 2014). No contexto das infecções, a resposta inflamatória tem o propósito de proteger o hospedeiro eliminando o agente infeccioso e se eficiente e autolimitada, tende a progredir para a resolução completa (DUFFIN *et al.*, 2010). No entanto, a inflamação descontrolada ou

uma resolução ineficiente pode causar danos nos tecidos e contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (revisto por SOUSA *et al.*, 2013).

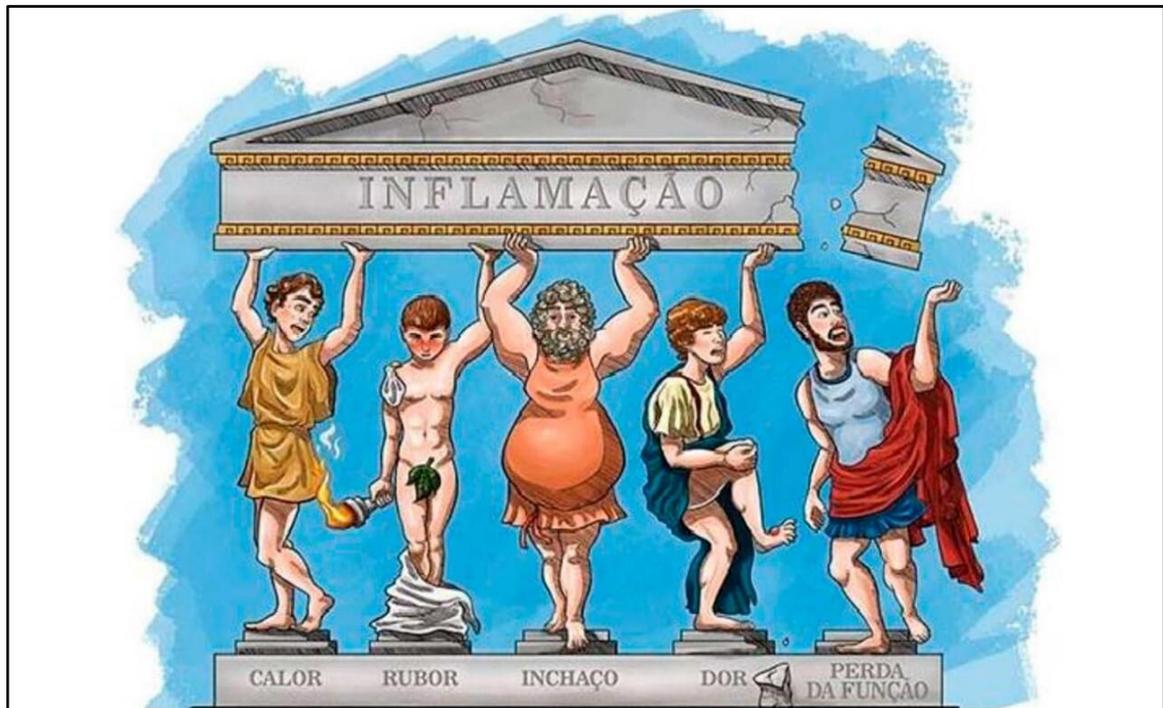


Figura 3. Sinais cardinais da inflamação. Cornelius Celsus, no século I D.C., descreveu os sintomas clínicos da inflamação, reconhecidos atualmente como os quatro sinais cardinais da inflamação: o rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), tumor (edema, causado por aumento da permeabilidade microvascular e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), calor (associado com o aumento do fluxo sanguíneo e hipertermia - aumento da temperatura corporal), e dor (em parte devido a alterações nas terminações nervosas). Um quinto sinal foi adicionado posteriormente por Rudolf Virchow em 1858, a perda da função, associada à disfunção dos órgãos envolvidos neste processo (MEDZHITOV, 2010) (Fonte: ETIENNE; VIEGAS; VIEGAS, 2021).

A resolução da inflamação (Figura 4) é um processo ativo que envolve a produção e ativação de mediadores bioquímicos e vias de sinalização para garantir a restauração da homeostase tecidual (revisto por SOUSA *et al.*, 2013; SUGIMOTO *et al.*, 2019). Dentre os mediadores pró-resolutivos, podemos citar moléculas de natureza lipídica como lipoxinas, maresinas, resolvinas, protectinas e as de natureza proteica como as proteínas induzidas por glicocorticoides anexina A1 (AnxA1) e GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine zipper*), dentre vários outros. Estes mediadores agem via receptores específicos e inibem vias de sobrevivência de leucócitos, estimulam a apoptose de neutrófilos, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulam a transmigração de monócitos de forma não inflamatória e aumentam a capacidade dos macrófagos em fagocitar debris e células apoptóticas (revisto por: ALESSANDRI

et al., 2013; SUGIMOTO *et al.*, 2016). Mais recentemente, alguns mediadores pró-resolutivos começaram a serem estudados em modelos pré-clínicos de doenças infecciosas (revisto por: BASIL & LEVY, 2016; DALLI, 2017; SOUSA; PINHO; TEIXEIRA, 2020; VAGO *et al.*, 2021), mostrando que também podem promover o *clearance* bacteriano (TAVARES *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2021) e viral (WALKER *et al.*, 2021), por meio dos mecanismos já previamente descritos (Figura 4), além do aumento da fagocitose de bactérias (MACHADO *et al.*, 2019; ZAIDAN *et al.*, 2022) e a indução de peptídeos antimicrobianos (SERHAN, 2014; BASIL & LEVY, 2016) Essas ações dos mediadores pró-resolutivos levam à resolução do processo inflamatório e restauração da homeostase tecidual.

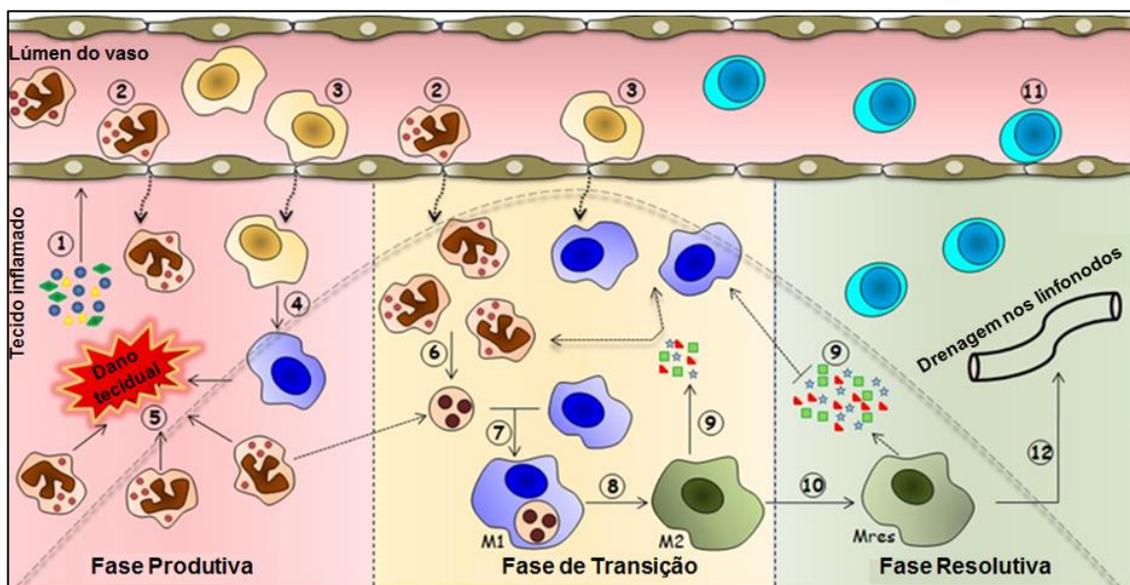


Figura 4. Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo.

A lesão tecidual (estéril ou infecciosa) leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou PAMPs) pelas células residentes (macrófagos teciduais, células dendríticas e células epiteliais), as quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios (1). Leucócitos polimorfonucleares (sobretudo neutrófilos) são as primeiras células que extravasam para os tecidos inflamados (2), seguidos por células mononucleares (3). Com a progressão da resposta inflamatória, há intenso influxo de leucócitos para o tecido inflamado. Na fase de transição da inflamação, apesar do intenso acúmulo de leucócitos PMNs, sob a ação de sinais pró-resolutivos, inicia-se a apoptose (6), seguido de fagocitose por macrófagos teciduais (eferocitose) (7). Durante a eferocitose, macrófagos mudam seu fenótipo de M1 para M2 (8). Macrófagos M2 - (ou M2 like) são altamente eferocíticos e produzem moléculas anti-inflamatórias (tais como a IL-10 e TGF-β) e mediadores pró-resolutivos (9). Tais mediadores têm o potencial para inibir o recrutamento adicional de PMN, intensificar a migração de monócitos e amplificar a eferocitose. Macrófagos M2 se modificam para macrófagos resolutivos (Mres) (10), os quais apresentam capacidade fagocítica reduzida, mas, no entanto, produzem proteínas anti-fibróticas e antioxidantes que limitam o dano tecidual e fibrose. O aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, de mediadores pró-resolutivos e anti-fibróticos por macrófagos resolutivos (Mres), a repovoação por linfócitos (11) e apoptose de macrófagos ou drenagem destas células para o linfonodo local (12) encerram o processo inflamatório e restauram a homeostase do tecido. Fonte: Adaptado de Alessandri *et al.* (2013).

A AnxA1 é uma proteína pró-resolutiva endógena, que também pode ser induzida por glicocorticoides, capaz de regular a inflamação sem bloquear a fase pró-inflamatória (DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012). Este conceito é muito importante visto que a regulação da inflamação exacerbada é essencial para restabelecer a homeostase e, por outro lado, o bloqueio do processo inflamatório pode prejudicar a eliminação do patógeno em questão (TAVARES; TEIXEIRA; GARCIA, 2017). Dentre seus efeitos pró-resolutivos, AnxA1 inibe a transmigração de neutrófilos, induz a apoptose de neutrófilos e promove a fagocitose desses neutrófilos apoptóticos pelo processo de eferocitose (revisto por: SUGIMOTO *et al.*, 2016; SUGIMOTO *et al.*, 2019, VAGO *et al.*, 2020). Além disso, AnxA1 tem sido associada ao recrutamento não flogístico de monócitos, ao reparo tecidual e à fagocitose de bactérias e de partículas (LEONI *et al.*, 2015; PATEL, DEVANG M *et al.*, 2011; YONA *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2019).

Tavares e colaboradores (2015) demonstraram que a administração de rolipram, um inibidor da fosfodiesterase-4 (PDE4), diminuiu a inflamação neutrofílica e o dano pulmonar durante a pneumonia pneumocócica, associada à queda dos níveis das citocinas TNF- α e IL-6 e das quimiocinas CXCL2 e CCL2, parâmetros importantes da resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *S. pneumoniae*. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que a associação entre rolipram e o antimicrobiano ceftriaxona aumentou a eliminação de bactérias nas vias aéreas, diminuiu o dano pulmonar e vários parâmetros inflamatórios, sugerindo que os inibidores de PDE4 podem ser úteis como terapia adjuvante contra a pneumonia pneumocócica. Ainda foi observado que o tratamento com rolipram promoveu o aumento da expressão de AnxA1, especificamente quando combinado com o antibiótico ceftriaxona, o que contribuiu para o aumento da fagocitose dos pneumococos. Em um estudo seguinte, Machado e colaboradores (2019) mostraram que a ausência de AnxA1 resulta em aumento da letalidade dos animais frente a pneumonia pneumocócica, a qual foi associada à resposta inflamatória exacerbada, ao aumento da ativação dos neutrófilos, perda da integridade do epitélio pulmonar e disseminação bacteriana para o sangue. De forma interessante, o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1, Ac2-26, diminuiu a inflamação, o dano pulmonar e a carga bacteriana nas vias aéreas, aumentando a fagocitose de bactérias por macrófagos. Além disso, dados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram a importância do peptídeo Ac2-26 e da

AnxA1 em promover a resolução da inflamação em modelo não infeccioso (pleurisia induzida por LPS) e na resolução induzida pelo glicocorticoide (GC) dexametasona (VAGO *et al.*, 2012). No mesmo modelo de pleurisia foi demonstrado que GILZ induz a resolução da inflamação por induzir a apoptose de neutrófilos (VAGO *et al.*, 2015).

1.5 Mecanismo de ação dos glicocorticoides e de GILZ

Os GCs são capazes de transpor a membrana citoplasmática devido a sua elevada lipossolubilidade se ligando no citoplasma aos receptores pertencentes à classe de receptores nucleares, os GR clássicos (DUQUE, 2013). No núcleo, o complexo GC-GR se liga a sítios específicos no DNA chamados elementos responsivos aos glicocorticoides (GREs) e, por meio do mecanismo de transativação, atua como fator de transcrição induzindo a síntese de proteínas anti-inflamatórias (GILZ, AnxA1, I κ B e IL-10), e também na indução de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico ou na regulação de genes pró-inflamatórios (CLARK, 2007; VANDEVYVER *et al.*, 2013). Devido a sua resposta sistêmica, os GCs possuem efeitos que incluem alterações no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos; manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico; e preservação da função normal do sistema cardiovascular e renal, sistema endócrino, sistema nervoso e sistema imune (VANDEVYVER *et al.*, 2013).

Os efeitos metabólicos dos GCs são geralmente mediados pela ativação da transcrição gênica, enquanto os efeitos anti-inflamatórios são mediados, em grande parte, por inibição ou transrepressão gênica, quando o complexo GC-GR se liga aos fatores de transcrição (NF- κ B) (*Nuclear fator kappa B*) ou AP-1 (proteína ativadora-1), inibindo a transcrição de genes pró-inflamatórios (DE BOSSCHER *et al.*, 2003; MCMASTER; RAY, 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Os GCs reduzem os níveis de TNF- α , IL-6, quimiocinas e outros mediadores pró-inflamatórios além da diminuição do recrutamento de células da imunidade inata como os neutrófilos. Uma resposta inflamatória global diminuída previne dano pulmonar relacionado à inflamação. No entanto, o momento e a dose para administração de corticosteroides são extremamente importantes, pois podem levar à imunossupressão grave, favorecendo o crescimento excessivo de patógenos nos pulmões (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; REMMELTS *et al.*, 2012; TAVARES; GALVÃO; FERRERO, 2021).

GILZ é uma proteína que medeia vários efeitos dos glicocorticoides (GCs) (reviso por: D'ADAMIO *et al.*, 1997; AYROLDI; RICCARDI, 2009; RONCHETTI; MIGLIORATI; RICCARDI, 2015; VAGO *et al.*, 2021). Gilz possui funções anti-inflamatórias que mimetizam os efeitos anti-inflamatórios dos GCs, ao inibir os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (AYROLDI *et al.*, 2009; MITTELSTADT *et al.*, 2001). Até o momento, os estudos sobre os efeitos anti-inflamatórios de Gilz se mostraram dissociados dos efeitos adversos dos GCs, sugerindo que Gilz exerça seus efeitos anti-inflamatórios, assim como os GCs, porém por vias distintas (CHENG *et al.*, 2014). A descoberta de que Gilz interage e inibe a atividade de NF- κ B foi a primeira descrição de mecanismo de ação de Gilz, inicialmente caracterizado em células T (AYROLDI *et al.*, 2009). Subsequentemente, outros alvos de Gilz foram identificados como Raf-1, Ras, e a MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) ERK1/2 (AYROLDI *et al.*, 2002; AYROLDI *et al.*, 2007; SOUNDARARAJAN *et al.*, 2007). Devido à grande variedade de interações com proteínas e sua expressão em vários tipos celulares, Gilz exerce, de fato, um papel crucial no controle do tráfego de proteínas e na sinalização (VAGO *et al.*, 2021; BRUSCOLI; RICCARDI; RONCHETTI, 2021).

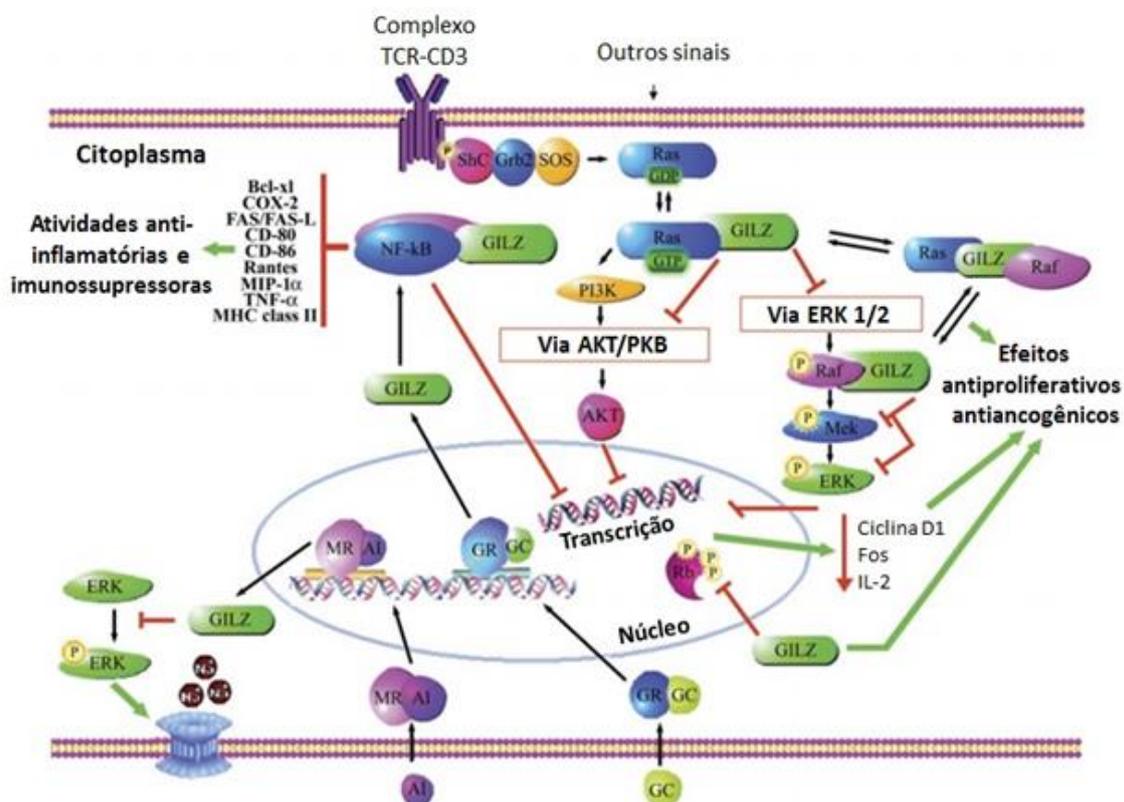


Figura 5. Mecanismo de ação de Gilz. Ilustração esquemática do papel de Gilz como mediador anti-inflamatório e imunossupressor das atividades dos GCs. Gilz interage diretamente com NF- κ B, inibe a transcrição gênica dependente de NF- κ B, medeia os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores

nos compartimentos linfóide e mieloide. O complexo Shc/Grb2/SOS converte Ras à sua forma ativa ligada ao GTP, levando à ativação das vias ERK-1/2 e Akt/PKB. Ao se ligar a Ras e Raf-1, GILZ inibe a fosforilação de MEK e ERK, inibindo, assim, a proliferação celular dependente dessa via (Adaptado de AYROLDI e RICCARDI, 2009).

Além das várias atividades anti-inflamatórias descritas acima, nosso grupo de pesquisa demonstrou algumas propriedades pró-resolutivas de GILZ. Durante a pleurisia induzida por LPS, um modelo pré-clínico em que a resolução da inflamação acontece fisiologicamente, foi mostrado que a expressão de GILZ é aumentada durante a fase resolutiva da inflamação e que a administração do peptídeo TAT-GILZ (uma proteína de fusão com GILZ e permeável à célula), no pico da inflamação, promove uma diminuição do número de neutrófilos viáveis e aumenta o número de neutrófilos apoptóticos, os quais são marca de uma resolução eficiente (VAGO *et al.*, 2015). Posteriormente, foi demonstrado que GILZ modula a polarização de macrófagos e aumenta a eferocitose (fagocitose de células apoptóticas) (VAGO *et al.*, 2020). No estudo de Vago e colaboradores (2020), foi demonstrado que GILZ está aumentado em macrófagos do tipo M2 e o tratamento *in vitro* de macrófagos estimulados com LPS/IFN- γ (M1-Like) com TAT-GILZ diminui a produção das citocinas IL-6 e TNF- α produzidas por estes macrófagos pró-inflamatórios. Além disso, TAT-GILZ diminuiu os números de macrófagos do tipo M1 durante a pleurisia induzida por LPS e aumentou a eferocitose de neutrófilos apoptóticos *in vitro* e *in vivo*, evidenciando o papel de GILZ como um modulador do fenótipo de macrófagos com efeitos diretos na resolução da resposta inflamatória. Em conjunto, os dados obtidos nos trabalhos citados acima mostram que GILZ induz eventos resolutivos chave, incluindo apoptose de neutrófilos, reprogramação de macrófagos e eferocitose (revisto por VAGO *et al.*, 2020). Embora tenha se avançado no entendimento das propriedades pró-resolutivas de GILZ, é preciso entender melhor as ações de GILZ em modelos infecciosos, uma vez que o uso de GCs é comum como terapia adjuvante aos antimicrobianos neste contexto.

1.6O efeito de GILZ em modelos pré-clínicos de infecção

Pesquisas foram conduzidas a fim de segregar os efeitos farmacológicos benéficos dos efeitos adversos decorrentes de altas doses e do uso crônico dos GCs. Uma alternativa seria a descoberta de agonistas capazes de induzir os efeitos inibitórios dos GCs no sistema imune por meio de moléculas que não utilizassem o GR para

transativação gênica (BOSSCHER; HAEGEMAN, 2009; BUTTGEREIT, 2012). No entanto, o uso dos agonistas seletivos de GR (SEGRAs) não se mostraram tão eficazes, visto que a transativação induzida pelo GR é indispensável para as propriedades anti-inflamatórias global dos GCs (VANDEVYVER *et al.*, 2013).

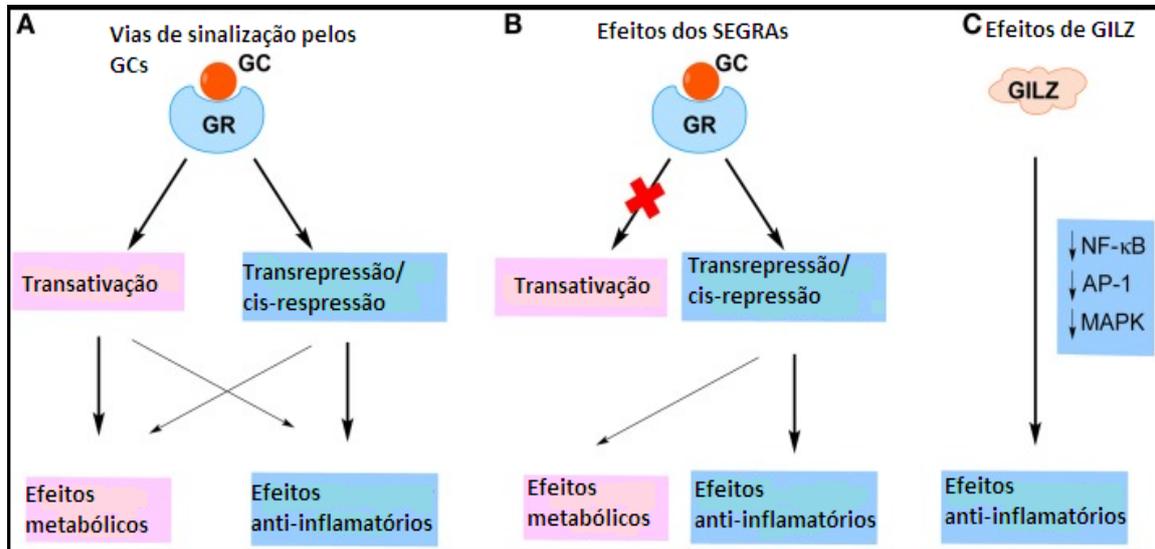


Figura 6. Representação esquemática dos mecanismos de transativação e transrepressão de GCs e o efeito de GILZ. (A) Efeitos celulares dos GCs; a molécula de GC liga-se ao receptor GR e ativa as vias de sinalização intracelulares. Acreditava-se que a transativação fosse responsável pelos efeitos metabólicos dos GCs, enquanto a transrepressão mediava os seus efeitos anti-inflamatórios. (B) Esse conceito foi a estratégia utilizada para o desenvolvimento dos SEGRAs, com o objetivo de inibir os efeitos metabólicos dos GCs. (C) Os efeitos anti-inflamatórios de GILZ são independentes da ligação ao GR, não possuindo efeitos metabólicos. Fonte: adaptado de Cheng *et al.*, 2014.

Assim, terapias baseadas em proteínas induzidas por GCs tem um apelo farmacológico evidente e têm se mostrado eficientes em modelos pré-clínicos de infecção, como aquelas utilizando a proteína AnxA1 ou seus peptídeos miméticos como o Ac2-26 ou o Ac2-50-CR (resistente à clivagem) (GOBBETTI *et al.*, 2014, SCHLOER *et al.*, 2019, MACHADO *et al.*, 2019). Além da AnxA1, a proteína GILZ parece ser uma alternativa interessante e o uso da proteína de fusão - GILZ com o peptídeo TAT (TAT-GILZ) tem se mostrado efetivo em atenuar a inflamação em modelos inflamatórios não infecciosos como colite (CANNARILE *et al.*, 2009; GENTILI *et al.*, 2021), pleurisia (VAGO *et al.*, 2012, VAGO *et al.*, 2020) e injúria renal (BABAN *et al.*, 2018).

No contexto das infecções, são poucos os trabalhos que investigaram até o momento o papel de GILZ em modelos pré-clínicos (RICCI *et al.*, 2018; ELLOUZE *et al.*, 2019; BALLEGEER, 2019). RICCI e colaboradores (2018) demonstraram o

aumento na atividade basal dos neutrófilos de camundongos GILZ KO frente à infecção intraperitoneal por *C. albicans*, sendo estes mais eficazes em eliminar o agente infeccioso quando comparado aos neutrófilos de camundongos do tipo selvagem (WT). Tal atividade foi verificada principalmente na fagocitose e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da via MAPK. No entanto, nesse estudo não foi avaliado a taxa de sobrevivência dos animais após infecção. Frente à essa resposta mais persistente dos neutrófilos, foi demonstrado a importância de GILZ na regulação do estado inflamatório contínuo e sugerido que sua ausência pode levar a doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (RICCI *et al.*, 2018). Outro estudo, utilizando o modelo experimental de sepse polimicrobiana induzida por CLP (ligadura e perfuração do ceco) em camundongos transgênicos com superexpressão de GILZ, mostrou que estes animais apresentaram melhores taxas de sobrevivência associada a redução nas contagens bacterianas no sangue, aumento na fagocitose e da expressão de GILZ nas células do exsudato peritoneal (BALLEGEER, 2019). Ainda, utilizando o modelo de CLP em animais transgênicos que superexpressam GILZ em monócitos e macrófagos (M/M), ELLOUZE e colaboradores (2019) mostraram um aumento da capacidade fagocítica dessas células com menores níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, resultando em maiores taxas de sobrevivência desses animais. Foi observado também que os M/M de camundongos sépticos e de pacientes com choque séptico apresentaram uma menor expressão de GILZ, evidenciando a importância de GILZ na fisiopatologia do choque séptico e uma possível pista para a modulação da inflamação nessa doença (ELLOUZE *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

As infecções do trato respiratório inferior estão entre as 10 principais causas de morte no mundo, apresentando índices elevados em países em desenvolvimento (OMS, 2022). A PAC é um importante problema de saúde pública e é uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo, principalmente entre crianças e idosos (SPOORENBERG *et al.*, 2014). O *S. pneumoniae* é o principal patógeno causador da PAC (SONG; EUN; NAHM, 2013) e, apesar da utilização de vacinas e antimicrobianos como eficientes alternativas profiláticas e terapêuticas, a incidência de infecções pneumocócicas com complicações graves está aumentando em muitas partes do mundo (MACLNTYRE *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2020).

A resposta inflamatória contínua e exacerbada desencadeada pela infecção contribui para o dano pulmonar e gravidade da pneumonia (TAVARES *et al.*, 2017). Assim, tem sido sugerido que a modulação do processo inflamatório possa ser benéfica para diminuir o dano associado à resposta inflamatória (GHONEIM *et al.*, 2014; TAVARES *et al.*, 2016). O estudo de moléculas pró-resolutivas endógenas tem chamado atenção por oferecer uma oportunidade terapêutica única, uma vez que mimetizam moléculas endógenas (PERRETTI *et al.*, 2015).

Desde a descoberta dos mediadores pró-resolutivos nos anos 90, os estudos iniciais em modelos inflamatórios agudos de resolução espontânea vêm ganhando maior complexidade, e, nos últimos anos, vários estudos com aplicação terapêutica de mediadores pró-resolutivos em modelos experimentais infecciosos mais complexos tem apontado um benefício do uso dessas terapias em controlar o processo infeccioso sem, contudo, diminuir a habilidade do hospedeiro em debelar a infecção (revisado por: LEGG, 2012; BASIL; LEVY, 2016; SOUSA *et al.*, 2020). A proteína GILZ possui atividade anti-inflamatória e pró-resolutiva e alguns estudos recentes mostram que também parece ser importante em promover o *clearance* bacteriano. Assim, pretendeu-se com este estudo, avaliar o papel de GILZ durante a resolução da inflamação pulmonar infecciosa ou não.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Estudar o papel da proteína GILZ na resposta inflamatória desencadeada durante a pneumonia experimental induzidas por LPS ou por *Streptococcus pneumoniae* e o efeito do tratamento com o peptídeo TAT-GILZ.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar o papel da proteína GILZ em animais GILZ KO e C57BL/6 WT instilados com LPS quanto aos:

- a. Parâmetros inflamatórios e de resolução;
- b. Dano pulmonar.

3.2.2 Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo TAT-GILZ em animais C57BL/6 ou BALB/c instilados com LPS ou infectados com *S. pneumoniae*, respectivamente, sobre:

- a. Parâmetros inflamatórios e de resolução,
- b. carga bacteriana;
- c. Dano pulmonar.

3.2.3 Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo TAT-GILZ sobre a letalidade em animais BALB/c infectados com *S. pneumoniae*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos machos BALB/c (8-10 semanas de idade) foram obtidos do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos com livre acesso a ração comercial e água. Camundongos C57BL/6 machos deficientes em GILZ (GILZ^{-/-}) e seus companheiros de ninhada (GILZ^{+/+} - WT) foram criados no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia e gerados conforme descrito (NGO *et al.*, 2013). O gene GILZ está ligado ao cromossomo X e os camundongos GILZ^{-/-} machos são inférteis (BRUSCOLI *et al.*, 2012; ROMERO *et al.*, 2012). Portanto, fêmeas heterozigóticas são cruzadas com machos WT. Foram utilizadas ninhadas de diferentes criações, pareadas por idade e peso. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), protocolo 162/2020 (ANEXO A).

4.2 Bactéria

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa de *S. pneumoniae* ATCC 6303, sorotipo 3, conforme padronização pelo nosso grupo de pesquisa (TAVARES *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2019). O cultivo das bactérias foi realizado em caldo de cultura Todd Hewitt acrescido de 0,5% de extrato de levedura (THY) ou ágar sangue (THY acrescido de 5% de sangue). No dia anterior à infecção, as bactérias foram semeadas em placas e incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO₂, por 12h. Posteriormente, as bactérias foram transferidas para 10 mL de caldo de cultura e incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO₂ até atingir a fase exponencial de crescimento - densidade óptica (D.O) de 0.4 (600 nm). Após centrifugação e duas lavagens com 10 mL de salina 0,9% estéril apirogênica, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de salina estéril e a partir dessa suspensão de bactérias, foram realizadas diluições em salina estéril de forma que 40 µL de solução continha os inóculos de 10⁵. Em todos os experimentos o inóculo foi confirmado por meio da semeadura da suspensão de bactérias em diferentes diluições e contagem das colônias após 18h de incubação a 37°C em atmosfera rica em CO₂.

4.3 Modelos de lesão pulmonar aguda (LPA) e protocolos de tratamento

Os camundongos foram anestesiados com cetamina/xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente) e a LPA foi induzida por instilação de LPS ou *Streptococcus pneumoniae*. 1 µg (500 unidades de endotoxina) de LPS ou 10⁵ CFU de *S. pneumoniae* foram instilados por via intranasal em 40 µL. Os grupos controles receberam solução salina. O modelo de LPA induzida por LPS foi previamente padronizado em nosso laboratório e o pico de inflamação mostrou-se entre 12 a 24 h (SANTOS-SOUZA, 2019). O modelo de pneumonia pneumocócica foi realizado em camundongos BALB/c machos conforme descrito anteriormente (TAVARES *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2019) e o modelo ALI foi realizado em camundongos C57BL/6 machos, uma vez que é este o *background* dos camundongos GILZ^{-/-}. Doze horas após a infecção ou instilação de LPS, os camundongos foram tratados com 200 µL de TAT-GILZ (0,2 mg/kg, i.p.) ou somente TAT (0,1 mg/kg, i.p.). As proteínas foram dissolvidas em DMSO e diluídas em solução salina estéril. A dosagem de TAT e TAT-GILZ foi escolhida de acordo com estudos publicados anteriormente (CANNARILE *et al.*, 2009; VAGO *et al.*, 2014; VAGO *et al.*, 2020, GENTILI *et al.*, 2021). Doses equimolares de TAT e TAT-GILZ foram injetadas, considerando que o peso molecular (PM) de TAT é metade do TAT-GILZ. Os animais do grupo controle receberam apenas solução salina estéril. O peptídeo TAT e a proteína de fusão TAT-GILZ, construídos pela inserção de cDNA de GILZ no vetor TAT-C para produzir uma proteína de fusão *in-frame*, foram gerados conforme descrito anteriormente (CANNARILE *et al.*, 2009; VAGO *et al.*, 2015; BARBAN *et al.*, 2018). Cada lote de TAT e TAT-GILZ foi preparado em condições livres de LPS (BARBAN *et al.*, 2018). Para analisar as taxas de sobrevivência, os camundongos foram tratados 12, 24 e 48h após a infecção por *S. pneumoniae*.

4.4 Acompanhamento da letalidade

Os animais infectados foram pesados e acompanhados durante 10 dias para a observação da letalidade. Os que atingiram perda de mais de 25% do seu peso corporal inicial foram eutanasiados de acordo com a Resolução Normativa Nº 33, de 18 de novembro de 2016 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.5 Eutanásia e coleta das amostras para análise

Para todos os experimentos os animais foram anestesiados com uma solução de 80 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina. Posteriormente, a eutanásia ocorreu pelo método de exsanguinação por meio coleta de sangue da veia cava para posterior contagem de bactérias e dosagem de citocinas. Após a eutanásia, os animais foram submetidos à exposição da traqueia para a realização do lavado broncoalveolar (BAL). O lavado consiste na introdução de uma cânula de 1,7 mm na traqueia do animal, a qual foi posteriormente conectada a uma seringa de 1 mL com PBS. Este volume foi recolhido e reintroduzido 3 vezes. Para a obtenção de uma quantidade satisfatória de células, o lavado foi realizado duas vezes, totalizando 2 mL de PBS. O lavado broncoalveolar foi utilizado para contagem de células, contagem de bactérias e dosagem de proteínas e citocinas. Após a realização do BAL, os animais tiveram os seus pulmões perfundidos com 5 mL de PBS por meio de uma seringa conectada a uma agulha de 21G. O ventrículo esquerdo foi cortado e os 5 mL de PBS foram injetados no ventrículo direito até o pulmão inflar e a solução de PBS sangue sair pelo ventrículo esquerdo. O lobo esquerdo foi coletado para análise histológica.

4.6 Contagem de células e bactérias

4.6.1 Contagem de bactérias no lavado broncoalveolar (BAL)

Após a coleta do BAL, 50 µL do fluido recuperado passou por diluições seriadas e foi semeado em placas de ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO₂ por 18h. Em seguida, as placas com a diluição contendo colônias em número entre 30 e 300 foram contadas.

4.6.2 Contagem de bactérias no sangue

20 µL de sangue foram semeados diretamente em placa de ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO₂ por 18h.

4.6.3 Contagem total e diferencial de células

O fluido recuperado do BAL foi submetido à centrifugação a 4°C a 300g por 8 minutos. O sobrenadante foi recolhido e congelado, para posterior dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford e citocinas por ELISA, enquanto ao pellet foi adicionado 100 µL de albumina sérica bovina (BSA) 3% em PBS. A alíquota das células em albumina foi diluída 10 vezes na solução de Turk para lise de hemácias

(IMBRALAB®), e posterior realização da contagem total de leucócitos utilizando câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, foram preparadas lâminas de contendo 50.000 células, utilizando a citocentrífuga (Shandon III). As lâminas foram coradas por coloração de May-Grunwald-Giemsa, utilizando-se o kit Panótico Rápido (LB Laborclin). Posteriormente foi realizada a contagem diferencial de células no aumento de 1000 vezes usando microscópio óptico. As células foram diferenciadas utilizando critérios morfológicos, por meio de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células em cada contagem.

4.7 Dosagem de proteínas no BAL

A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford. Após diluir a solução estoque 5x de Bradford da Biorad ® para a concentração de 1x, adicionou-se 200 µL à uma placa de 96 poços. Em seguida, 10 µL do sobrenadante do BAL em duplicata foi adicionado em cada poço contendo a solução de Bradford e homogeneizado. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm, descontando a leitura do branco. Os resultados obtidos da absorbância foram comparados à uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de BSA.

4.8 Dosagem de citocinas por ELISA

As concentrações de TNF- α , IL-6, CXCL-1 e CXCL-2 foram mensuradas no BAL de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante (R&D Systems, EUA). O protocolo utilizado está estabelecido no kit de ELISA murino da R&D Systems, em placa de 96 poços. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, e adicionados à placa de 96 poços para que a sensibilização ocorresse overnight à 4°C. A placa foi lavada 3 vezes e, em seguida, realizou-se o bloqueio da placa com 1% de albumina bovina diluída em PBS por 2h à temperatura ambiente, para evitar a ligação inespecífica durante o ensaio. Após o bloqueio, a placa foi lavada e 50 µL de amostra foram adicionados a cada poço e incubado overnight. No dia seguinte, após a lavagem, os anticorpos de detecção (diluídos em 0,1% de BSA/PBS) foram adicionados à placa e essa incubada por 2h à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingem” - 1:4000) e revelada com o substrato OPD (ophenylenediamine dihidrochloride - Sigma) com 0,006% peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1 M. A leitura foi feita no

espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. A cor obtida pela reação é diretamente proporcional à concentração da citocina na amostra analisada. As absorvâncias obtidas pela leitura foram comparadas à uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina analisada, fornecida no kit (TNF- α : 31.2 – 2.000 pg/mL; IL-6: 15.6 – 1.000 pg/mL; CXCL-1: 0.5 – 1.810 pg/mL; CXCL-2: 7.8 - 500 pg/mL).

4.9 Análise histológica

Os pulmões esquerdos foram fixados em formalina tamponada neutra (10%) por 48 h e então gradualmente desidratados em etanol e incluídos em parafina. Seções de 5 μ m foram cortadas e coradas com H&E para exame sob microscopia de luz. O escore histopatológico foi realizado conforme descrito (ANDRADE *et al.*, 2021) por um patologista experiente de forma cega para os grupos experimentais e avaliou as seguintes categorias: inflamação das vias aéreas (0-4), inflamação vascular (0-4), inflamação do parênquima (0-5) e infiltrado de PMN (0-4). 5), totalizando 18 pontos.

4.10 Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem foram sacrificados e tíbias e fêmures foram coletados para isolamento de medula óssea. A suspensão de células obtida foi então centrifugada por 5 minutos a 1.200g. O pellet foi ressuspenso em meio condicionado completo para diferenciação de BMDMs (meio RPMI acrescido de antibióticos, 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 30% de sobrenadante de células L929), semeado em frascos e incubados a 37°C e 5% de CO₂. No terceiro dia de cultura 30% do meio foi retirado e adicionado meio novo completo. Após 7 dias, o sobrenadante foi removido e os macrófagos aderentes foram separados por meio de raspador de células e plaqueados (2 x 10⁵ células/poço) em placas de 96 poços para ensaio de fagocitose.

4.11 Ensaio de fagocitose

A fagocitose foi avaliada conforme descrito anteriormente (MACHADO *et al.*, 2019; ZAIDAN *et al.*, 2022). Para os ensaios de fagocitose, 2 x 10⁵ macrófagos alveolares AMJ2-C11 (ATCC CRL-2456) ou BMDMs isolados de camundongos WT ou GILZ^{-/-}, foram plaqueados e incubados com *S. pneumoniae* (MOI 1:10) por 3 h para permitir a fagocitose (1h de adesão a 4°C seguido de 2h a 37°C e 5% de CO₂). As bactérias não internalizadas foram lavadas com penicilina e estreptomicina (30 μ g/mL

em PBS por 30 minutos). Para avaliar as bactérias fagocitadas, os macrófagos foram lisados e as bactérias internalizadas viáveis foram contadas em placas de ágar sangue após incubação durante 15h a 37°C e 5% de CO₂. O pré-tratamento com TAT ou TAT-GILZ foi de 18 h antes dos experimentos e a dose foi baseada em estudos prévios (DELFINO *et al.*, 2004; VAGO *et al.*, 2020).

4.12 Avaliação da eferocitose

A identificação e contagem de macrófagos com corpos apoptóticos englobados foi realizada por microscopia de luz (objetiva 100x, 500 células/lâminas). Os resultados foram expressos como a média \pm SEM (erro padrão da média) da porcentagem de macrófagos com células apoptóticas em seu interior (VAGO *et al.*, 2020; ZAIDAN *et al.*, 2022).

4.13 Teste de sensibilidade *in vitro*

Com uma alça bacteriológica em platina devidamente flambada e resfriada colônias recentes de *S. pneumoniae* foram suspendidas em salina estéril (NaCl) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland (1×10^8 CFU/mL). Em seguida, um swab estéril foi embebido na suspensão bacteriana, sendo comprimido contra as paredes do tubo para tirar o excesso da suspensão, para então ser semeado de forma suave em todas as direções na placa abrangendo toda a superfície. Assim que a superfície do ágar secou, os discos foram colocados, com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. O resultado foi analisado após 18h de incubação a 37°C em atmosfera rica em CO₂. Embora não existam halos definidos pelo CLSI (*Clinical & Laboratory Standard Institute*) para cefalosporinas pelo método de disco difusão, um disco de cefotaxima foi utilizado aqui apenas com efeito comparativo, uma vez que as cefalosporinas são os antimicrobianos de escolha no tratamento da pneumonia pneumocócica grave.

4.14 Análise estatística

As estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 8.0. Os testes de Two-way (Figuras 7 e 8) seguido de correção de Tukey ou one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls foram usados para comparar mais de dois grupos. O teste t não pareado foi usado para comparações entre dois grupos. As curvas de

sobrevida foram analisadas pelo teste Log-rank. Resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 *GILZ é crucial para o controle da inflamação durante a lesão pulmonar aguda induzida por LPS*

Para entender o papel de *GILZ* durante a inflamação pulmonar aguda, estabelecemos um modelo murino de ALI (*acute lung injury* ou lesão pulmonar aguda -LPA), o qual apresenta intensa infiltração de neutrófilos dentro de 12-24h após estímulo intranasal com LPS, com a resolução ocorrendo após 72h (SANTOS-SOUZA, 2019). Nesse modelo investigamos a resposta inflamatória de camundongos deficientes em *GILZ* (*GILZ*^{-/-}) em comparação aos animais WT (desenho experimental esquemático em 7A). De forma interessante, os camundongos *GILZ*^{-/-} apresentaram maiores números de leucócitos (Figura 7B), especialmente neutrófilos (Figura 7C), quando comparados aos animais WT. Os números de macrófagos não foram modificados pelo desafio com LPS (Figura 7D). As concentrações de TNF- α e IL-6 foram aumentadas no lavado broncoalveolar (BAL) após a instilação de LPS, sendo ainda mais elevadas nos camundongos *GILZ*^{-/-} (Figura 7 E-F). De forma interessante, os níveis das quimiocinas ativas de neutrófilos, CXCL-1 e CXCL-2, também foram mais elevados em animais *GILZ*^{-/-} (Figura 7G-H), em consonância com o maior número de neutrófilos vistos nesses animais (Figura 7C). Houve diminuição da eferocitose nos animais *GILZ*^{-/-}, evidenciado por meio da porcentagem de macrófagos que internalizaram neutrófilos apoptóticos (Figura 7I e imagens representativas na Figura 7J).

A análise histopatológica dos pulmões 24h após instilação com LPS mostrou que o grupo de animais *GILZ*^{-/-} apresentou dano pulmonar mais grave e maior infiltrado de células inflamatórias em comparação ao grupo de animais WT (Figura 8A-B). Além disso, a deficiência em *GILZ* levou a uma acentuada degeneração do epitélio bronquiolar no tempo de 24h após a instilação de LPS (caixa vermelha na Figura 8A), a qual foi observada apenas em camundongos *GILZ*^{-/-} instilados com LPS. Nenhum sinal histológico de dano foi observado nos pulmões de camundongos instilados com solução salina (Figura 8B). De acordo com a maior lesão pulmonar observados nos animais *GILZ*^{-/-}, os níveis de proteína total no BAL, uma medida indireta de edema, foram mais elevados nos animais *GILZ*^{-/-} quando comparados aos animais WT (Figura 8C). Em conjunto, esses dados mostram que, na ausência de *GILZ* a instilação de LPS causa maior dano pulmonar e ruptura da barreira epitelial.

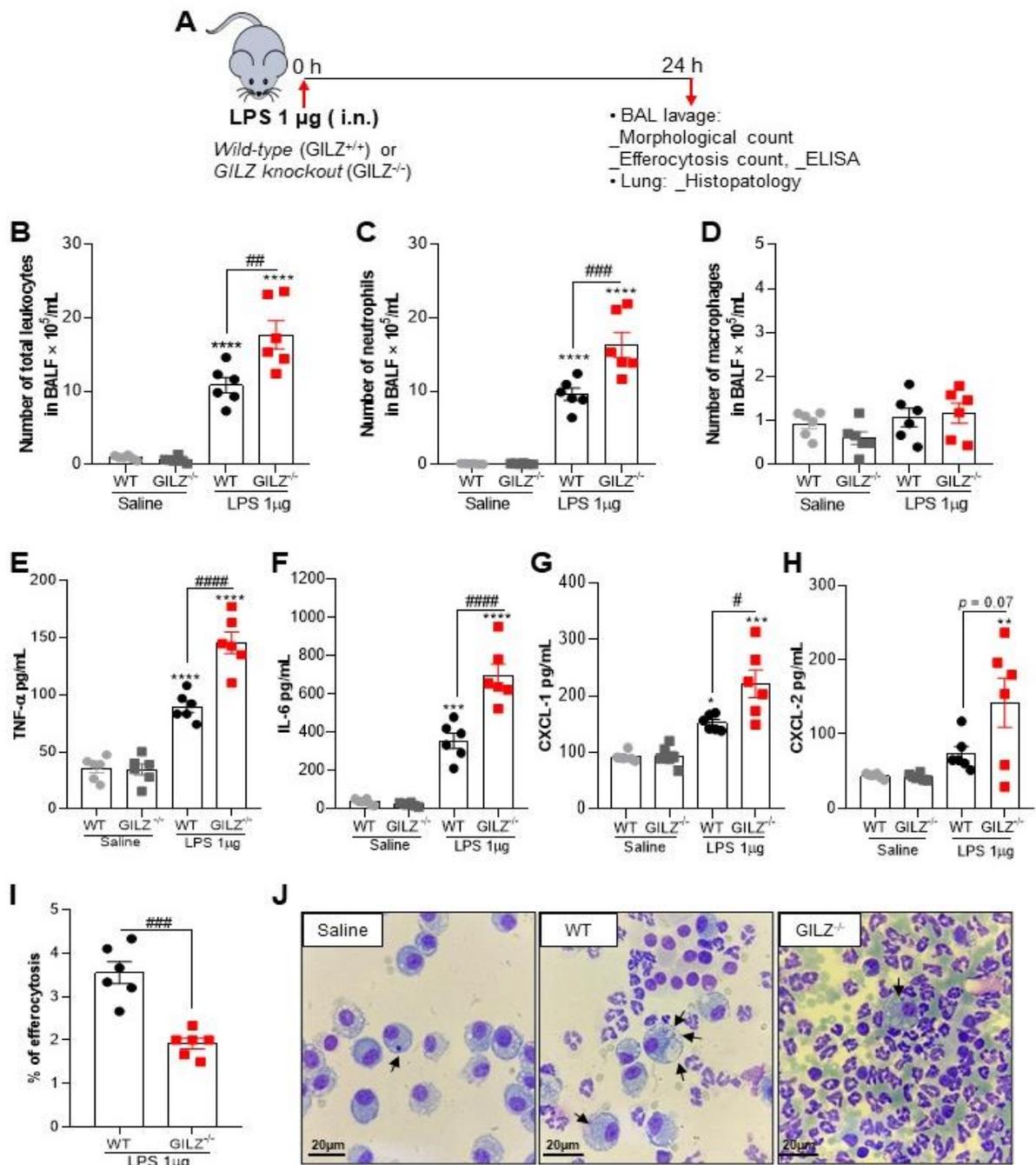


Figura 7. A deficiência de GILZ leva a uma resposta inflamatória mais intensa durante a Lesão Pulmonar Aguda induzida por LPS. Camundongos C57BL/6 WT ou GILZ^{-/-} foram estimulados com LPS (1 µg, i.n.) e sacrificados 24 h depois (protocolo experimental em **A**). O BAL foi colhido para quantificar o número de leucócitos totais (**B**), neutrófilos (**C**) e macrófagos (**D**). Os níveis das citocinas TNF-α (**E**) e IL-6 (**F**) e das quimiocinas CXCL-1 (**G**) e CXCL-2 (**H**) no BAL foram mensurados por ELISA. O gráfico (**I**) mostra a porcentagem de eferocitose pela contagem morfológica das lâminas de citospin coradas com May-Grunwald-Giemsa. Em **J**, as setas indicam neutrófilos apoptóticos dentro dos macrófagos. Ampliação 1000x. Os dados são média ± SEM de N = 6 animais por grupo. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 ou *****p* < 0,0001 quando comparado ao grupo salina; ou conforme indicado: #*p* < 0,05, ##*p* < 0,01, ###*p* < 0,001 ou ####*p* < 0,0001 ao comparar animais GILZ^{-/-} desafiados com LPS ao grupo WT, por two-way ANOVA.

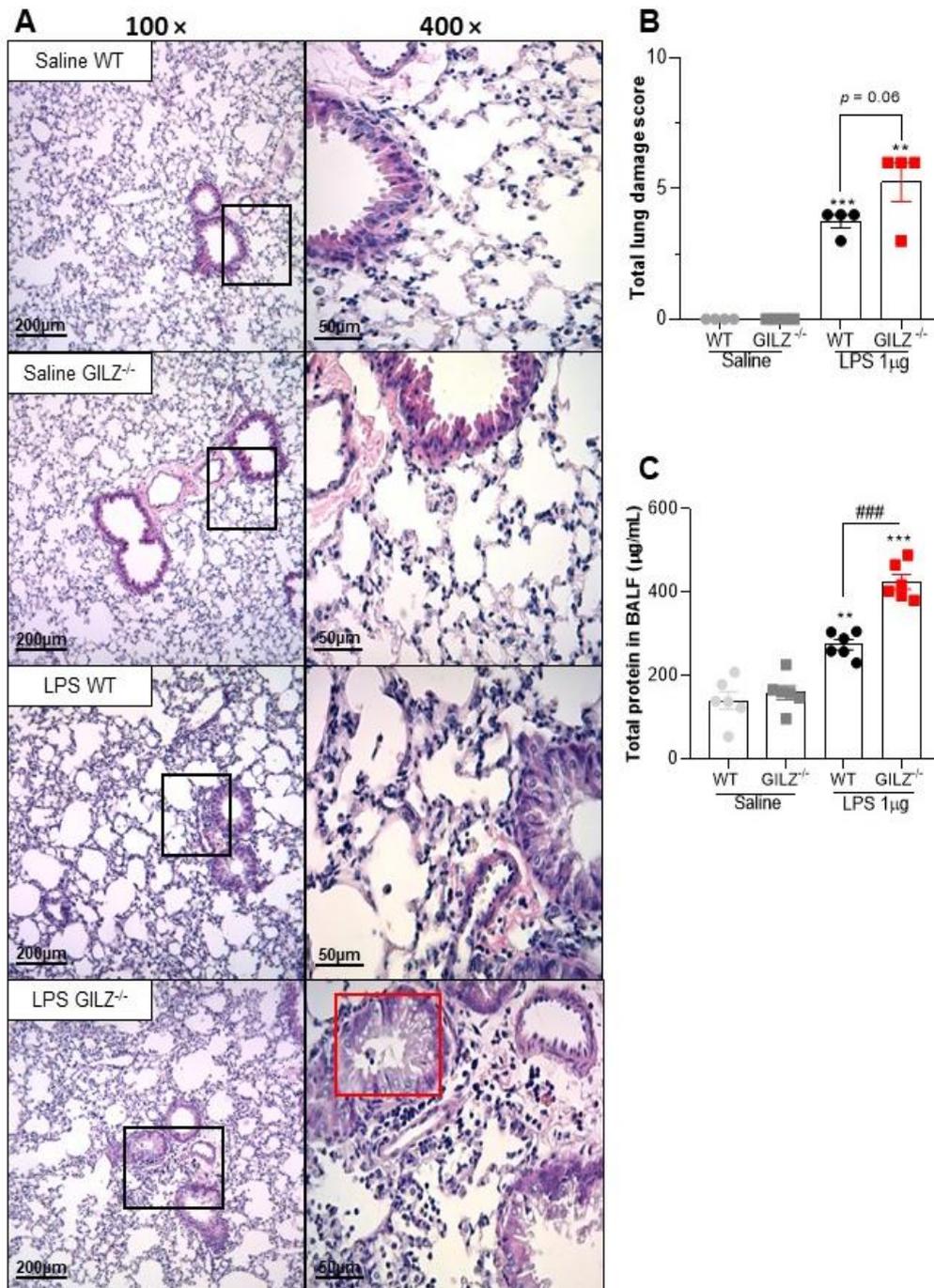


Figura 8. Camundongos com deficiência de GILZ apresentam exacerbação de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Camundongos C57BL/6 WT ou GILZ^{-/-} foram estimulados com LPS (1 μ g, i.n.) e eutanasiados 24 h depois. Lâminas representativas de pulmões corados com hematoxilina e eosina (H&E) são mostradas (A). Barras de escala = 200 μ m (menor ampliação) e 50 μ m (maior ampliação). Os slides da direita são ampliações maiores (400 \times) das áreas selecionadas (caixas) nos slides da esquerda (100 \times). O escore histopatológico avaliou inflamação das vias aéreas, vascular e parenquimatosa, infiltração neutrofílica e lesão epitelial (B). A caixa vermelha representa degeneração do epitélio bronquiolar, observada apenas no grupo de animais GILZ^{-/-} instilado com LPS. (C) Níveis de proteínas totais no BAL. Os dados são mostrados como média \pm SEM de N = 4 animais (histopatologia) ou N = 6 (níveis de proteína) por grupo. ** p < 0,01 ou *** p < 0,001 quando comparado aos grupos instilados com solução salina; ou conforme indicado: ### p < 0,001 por two-way ANOVA ou p =0,06 ao comparar os animais GILZ^{-/-} desafiados com LPS aos animais WT (teste t).

Em seguida, nos perguntamos se a administração exógena de GILZ protegeria os camundongos da inflamação e danos induzidos por LPS. Para tal, camundongos instilados com LPS foram tratados com TAT-GILZ, uma proteína de fusão à GILZ e permeável às células, no pico da inflamação (esquema terapêutico mostrado na Figura 9A). Observamos que o tratamento com TAT-GILZ diminuiu as contagens de leucócitos no BAL (Figura 9B), principalmente do número de neutrófilos (Figura 9C), sem alterar o número de macrófagos (Figura 9D). Em consonância com a redução da inflamação neutrofílica, TAT-GILZ também diminuiu os níveis de TNF- α e IL-6 no BAL de camundongos instilados com LPS (Figuras 9E-F). De forma interessante, o tratamento com TAT-GILZ também aumentou a porcentagem de eferocitose (gráfico na Figura 9G e imagens representativas na Figura 9H). Em resumo, a LPA induzida por LPS foi diminuída após o tratamento com TAT-GILZ, por meio da modulação da inflamação e indução da eferocitose, um determinante chave para a resolução da inflamação pulmonar (ROBB *et al.*, 2016; GREENLEE-WACKER, 2016).

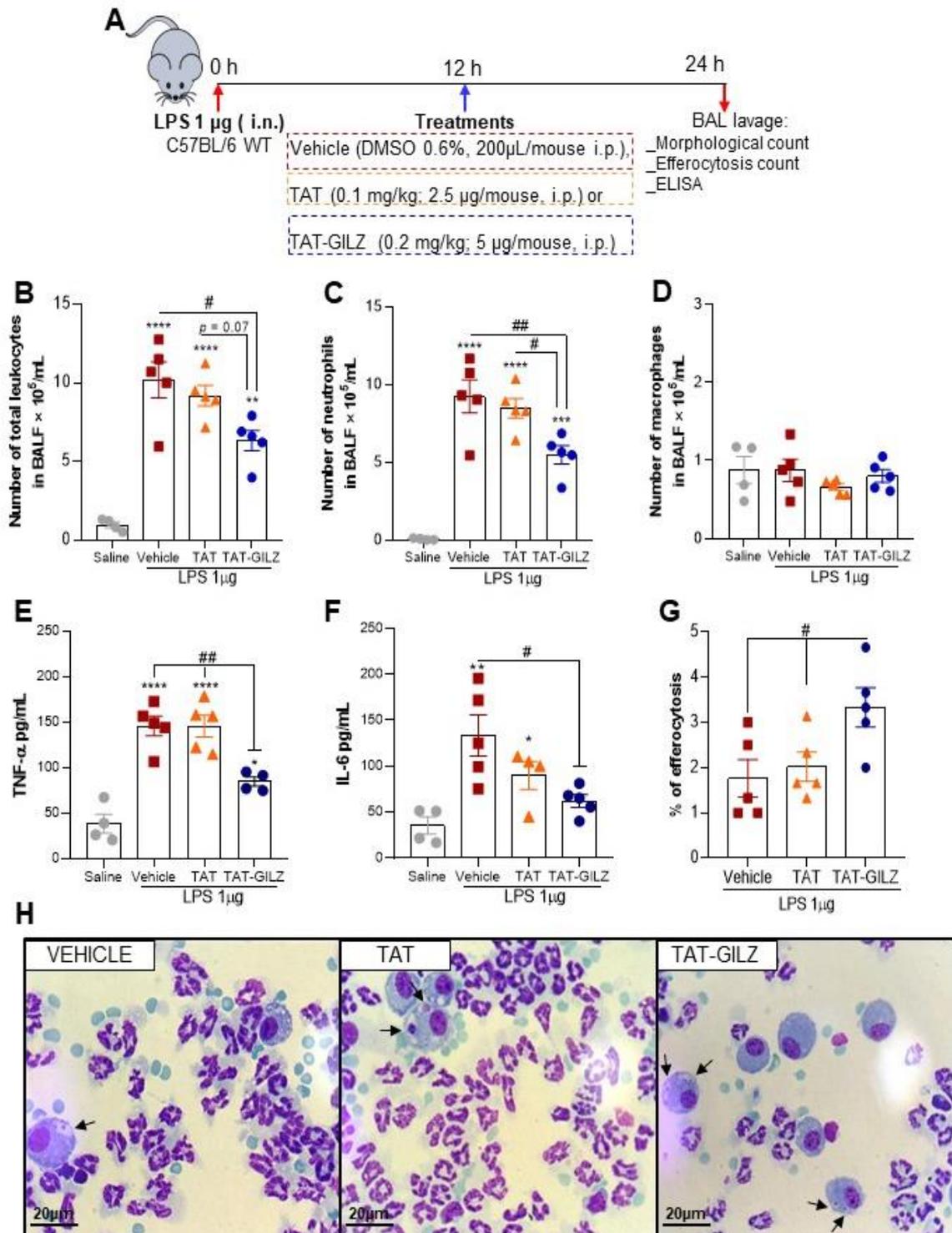


Figura 9. O tratamento com TAT-GILZ durante a LPA induzida por LPS modula a inflamação neutrofílica e aumenta os índices de eferocitose. Camundongos C57BL/6 WT foram estimulados com LPS (1 μg , in), tratados com TAT (0,1 mg/kg, ip) ou TAT-GILZ (0,2 mg/kg, ip) 12 h pi, e eutanasiados 24 h depois (protocolo experimental em A). O BAL foi coletado para quantificação do número de leucócitos totais (B), neutrófilos (C) e macrófagos (D). Os níveis das citocinas TNF- α (E) e IL-6 (F) no BAL foram mensuradas por ELISA. O gráfico (G) mostra a porcentagem de eferocitose pela contagem morfológica das lâminas de citospin coradas com May-Grunwald-Giemsa. Em H, as setas indicam neutrófilos apoptóticos dentro dos macrófagos. Ampliação 1000 \times . O grupo veículo recebeu

DMSO 0,6%. Os dados são representados como média \pm SEM de N = 4-5 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$ quando comparados aos grupos instilados com solução salina; ou conforme indicado: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ou $p=0,07$ ao comparar camundongos desafiados com LPS tratados com TAT-GILZ com os grupos veículo ou TAT, por one-way ANOVA.

5.2 O tratamento TAT-GILZ modula a resposta inflamatória, aumenta a eferocitose e a depuração bacteriana durante a pneumonia pneumocócica

Dado o papel do GILZ na modulação da inflamação pulmonar durante a LPA induzida por LPS e que a inflamação exacerbada está correlacionada com a gravidade nas pneumonias (ZAR *et al.*, 2013; DRIJKONINGEN & ROHDE, 2014), nos perguntamos se a administração exógena de GILZ poderia promover proteção em um modelo de pneumonia bacteriana induzida por *S. pneumoniae*. Para verificar essa hipótese, os animais foram infectados por via intranasal com 10^5 CFU de *S. pneumoniae* e tratados 12h depois com TAT-GILZ (0,2 mg/kg, i.p.). Camundongos tratados apenas com TAT (0,1mg/kg) ou veículo foram usados como grupos controles da infecção. Os animais foram eutanasiados 24h após a infecção e os parâmetros inflamatórios foram avaliados (delineamento experimental apresentado na Figura 10A). O tratamento sistêmico com TAT-GILZ diminuiu significativamente o acúmulo de leucócitos nas vias aéreas (Figura 10B), composto principalmente por neutrófilos (Figura 10C). Embora em menores números quando comparado aos neutrófilos, os macrófagos foram aumentados pelo tratamento com TAT-GILZ (Figura 10D). O tratamento com TAT-GILZ também reduziu os níveis de de TNF- α e IL-6 e da quimiocina quimioatrativa para neutrófilos CXCL-1 (Figura 10E-G), não apresentando efeito sobre os níveis de CXCL-2 (Figura 10H). Esses resultados sugerem que a diminuição do infiltrado de células inflamatórias para os alvéolos em resposta ao tratamento com TAT-GILZ é acompanhada por uma redução na produção local de mediadores pró-inflamatórios.

Uma vez observado os efeitos anti-inflamatórios do tratamento com TAT-GILZ na pneumonia pneumocócica, avaliamos em seguida os efeitos dessa proteína na eliminação de células apoptóticas por macrófagos e no *clearance* bacteriano. TAT-GILZ aumentou significativamente a eferocitose por macrófagos (Figura 10I), um importante marcador para a resolução da inflamação pulmonar (ROBB, 2016). Além disso, TAT-GILZ, mas não TAT sozinho, diminuiu a contagem de bactérias no BAL (Figura 10J). Consistente com um estudo prévio do nosso grupo (MACHADO *et al.*, 2019), os pneumococos raramente são encontradas no sangue de camundongos 24h pós-infecção (Figura 10L) e os tratamentos não apresentaram efeito nesse parâmetro.

Em conjunto, esses dados mostram que o tratamento com TAT-GILZ além de modular a inflamação pulmonar durante a infecção, reduz as contagens de bactérias no BAL.

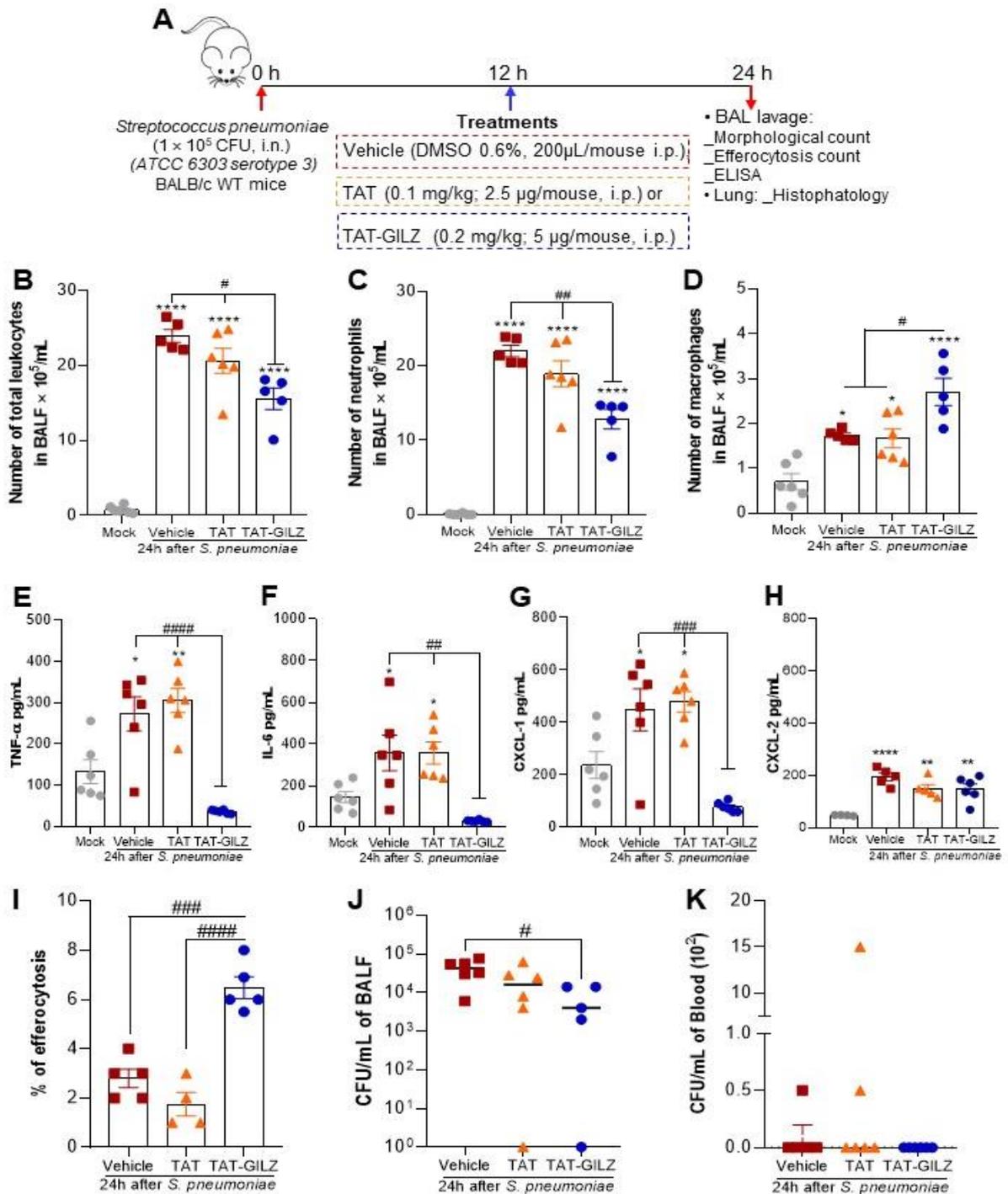


Figura 10. Efeito do tratamento com TAT-GILZ no curso da pneumonia pneumocócica. Camundongos BALB/c foram infectados com *S. pneumoniae* (1×10^5 CFU, i.n.) e então tratados com TAT (0,1 mg/kg, i.p.) ou TAT-GILZ (0,2 mg/kg, i.p.) 12 h p.i. Os camundongos foram sacrificados 24h p.i. (protocolo experimental em A). Quantificação do número de leucócitos totais (B), neutrófilos (C) e macrófagos (D) no BAL. Os níveis das citocinas TNF- α (E), IL-6 (F) e das quimiocinas CXCL-1 (G) e CXCL-2 (H) no BAL foram realizadas por ELISA. O gráfico (I) mostra a porcentagem de eferocitose.

Contagens da carga bacteriana no BAL (J) e no sangue (L). O grupo mock (não infectado) recebeu solução salina e o grupo veículo recebeu DMSO 0,6%. Os dados são média \pm SEM de N = 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo mock; ou conforme indicado por # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ ou #### $p < 0,0001$ ao comparar animais com pneumonia pneumocócica tratados com TAT-GILZ aos grupos veículo ou TAT, por one-way ANOVA.

5.3 O tratamento com TAT-GILZ diminui o dano pulmonar causado durante a pneumonia pneumocócica

A análise histológica dos pulmões 24h após a infecção por *S. pneumoniae* mostrou pneumonia considerável caracterizada por dano pulmonar acentuado e infiltração acentuada de células inflamatórias em bronquíolos e alvéolos de camundongos (Figura 11A). De acordo com a redução do quadro inflamatório geral e das contagens de bactérias no BAL, os camundongos tratados com TAT-GILZ apresentaram pneumonia leve, com preservação da arquitetura pulmonar e redução da infiltração leucocitária (Figura 11A). A pontuação histopatológica mostrou que enquanto uma proporção maior de camundongos tratados com veículo ou TAT apresentou pneumonia grave a moderada, todos os camundongos que receberam TAT-GILZ apresentaram sinais histológicos leves de pneumonia (Figura 11B).

De acordo com a redução da lesão pulmonar, os níveis de proteínas totais no BAL, também foram menores nos animais tratados com TAT-GILZ, em comparação com os outros grupos infectados (Figura 11C). Em conjunto, esses dados sugerem que a regulação da inflamação e da carga bacteriana induzida por TAT-GILZ, contribuíram para a redução da lesão pulmonar associada à pneumonia pneumocócica.

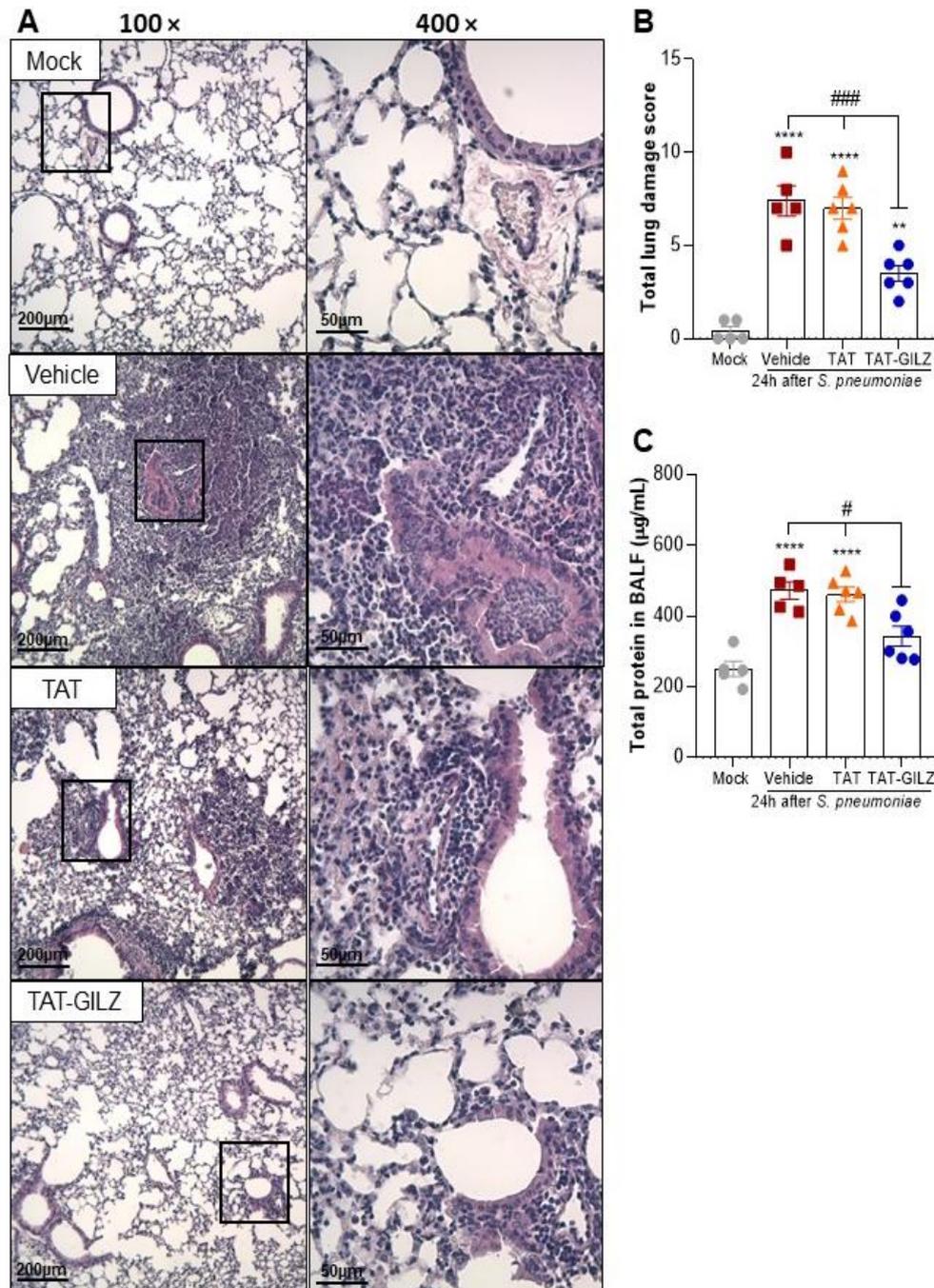


Figura 11. Efeito do tratamento com TAT-GILZ no dano pulmonar associado à infecção pneumocócica. Camundongos BALB/c foram infectados com *S. pneumoniae* (1×10^5 CFU, i.n.) e, em seguida, tratados com TAT (0,1 mg/kg, ip) ou TAT-GILZ (0,2 mg/kg, ip) 12h p.i. e eutanasiados no tempo de 24h. O grupo mock (não infectado) recebeu solução salina e o grupo veículo recebeu DMSO 0,6%. Lâminas representativas de pulmões corados com hematoxilina e eosina (H&E) são mostradas em (A). Barras de escala = 200 µm (menor ampliação) e 50 µm (maior ampliação). Os slides da direita são ampliações maiores (400x) das áreas selecionadas (caixas) nos slides da esquerda (100x). O escore histopatológico avaliou inflamação das vias aéreas, vascular e parenquimatosa, infiltração neutrofílica e lesão epitelial (B). Os níveis de proteínas totais no BAL (C). Os dados são apresentados como média \pm SEM de N = 5-6 animais por grupo. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ quando comparado ao mock, ou conforme indicado: # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ ao comparar camundongos com pneumonia pneumocócica tratados com TAT-GILZ aos grupos veículo ou TAT, por one-way ANOVA.

5.4 GILZ estimula macrófagos alveolares e macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) a fagocitarem pneumococos

Uma vez que os camundongos tratados com TAT-GILZ apresentaram menores contagens bacterianas no BAL e números de macrófagos aumentados, avaliamos em seguida se TAT-GILZ poderia aumentar diretamente a fagocitose de bactérias por macrófagos. Para tal, macrófagos alveolares (AMJ2-C11) foram pré-tratados com TAT (1 µg/mL) ou TAT-GILZ (2 µg/mL) por 18h, seguido da infecção com 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* por 3 h (desenho experimental na Figura 12A), e as bactérias fagocitadas por macrófagos alveolares foram quantificadas. O pre-tratamento com TAT-GILZ promoveu um aumento da fagocitose de pneumococos em comparação com as células tratadas com veículo ou TAT (Figura 12B). A mesma estratégia foi realizada em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), com achados semelhantes (Figura 12C).

Em seguida, avaliamos se o GILZ endógeno impactaria na capacidade fagocitária dos macrófagos. Assim, BMDMs de camundongos GILZ^{-/-} ou WT foram infectados com 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* por 3 h, e a fagocitose foi avaliada como acima (Figura 12A e métodos). Curiosamente, as células de animais GILZ^{-/-} mostraram um número significativamente menor de bactérias internalizadas do que BMDMs de camundongos WT (Figura 12D). Em seguida foi avaliada se GILZ poderia apresentar ação antibacteriana direta. Assim, discos impregnados com TAT, TAT-GILZ ou com o antibiótico cefotaxima foram adicionados em placas de ágar sangue após semeadura com *S. pneumoniae* e após 18h de incubação à 37°C e 5% CO₂ as placas foram avaliadas. TAT-GILZ na concentração utilizada no ensaio não apresentou nenhum halo de inibição, sugerindo que não tenha efeito inibitório direto no crescimento bacteriano (Figura 12E). Juntos, esses dados sugerem que GILZ estimula mecanismos antibacterianos celulares do hospedeiro e que o tratamento com TAT-GILZ é uma estratégia terapêutica potencial para aumentar a resistência do hospedeiro à infecção.

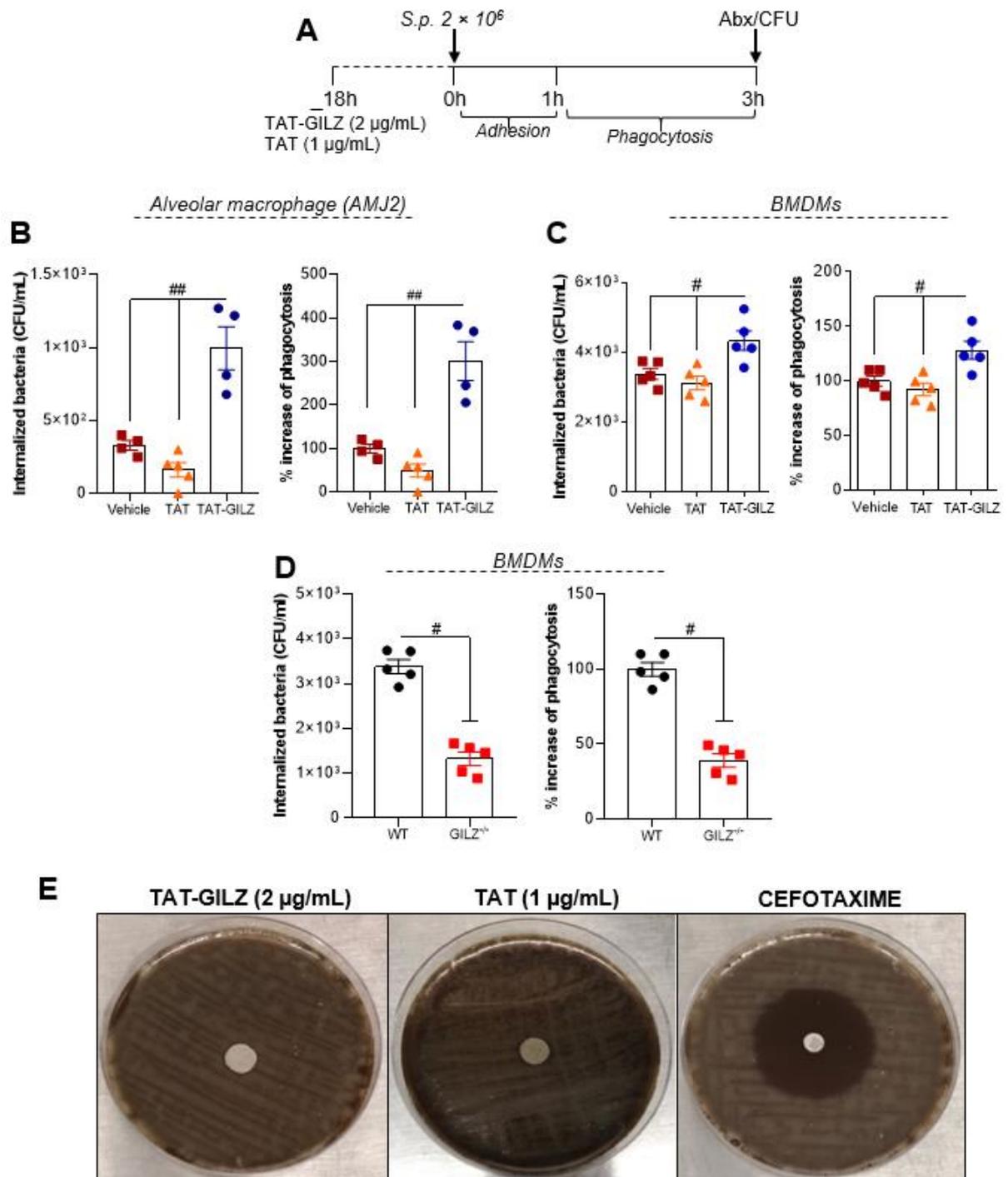


Figura 12. TAT-GILZ aumenta a fagocitose de *Streptococcus pneumoniae* por macrófagos. Fagocitose de bactérias - protocolo experimental em (A) - foram avaliadas em macrófagos alveolares (AMJ2-C11) (B) ou BMDMs obtidos de camundongos WT (C). Macrófagos (2×10^5) foram pré-tratados com TAT ($1 \mu\text{g/mL}$) ou TAT-GILZ ($2 \mu\text{g/mL}$) por 18 h e depois incubados com *S. pneumoniae* (MOI 1:10) por 3 h para permitir a adesão e fagocitose. As bactérias não internalizadas foram excluídas pela incubação das células com penicilina/estreptomicina (Abx), seguida da lise dos macrófagos e plaqueamento em ágar sangue para identificar o número de bactérias fagocitadas viáveis. Em outro grupo experimental, BMDMs de camundongos WT e *GILZ*^{-/-} (2×10^5) também foram submetidos à fagocitose conforme descrito acima (D). Os resultados são expressos como CFU de bactérias internalizadas ou % de fagocitose (contagens de CFU em placas de ágar sangue, N=4-5) e são apresentados como média \pm SEM; #*p* < 0,05, ##*p* < 0,01 ao comparar células tratadas com TAT-GILZ com veículo ou TAT, por one-way ANOVA (B-C). A comparação entre BMDMs de WT e *GILZ*^{-/-} foi por

teste t ($p < 0,05$). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicatas ou quintuplicatas biológicas. TAT-GILZ (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), TAT (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou cefotaxima (controle) impregnados em filtros estéreis foram então adicionados a placas de ágar sangue contendo *S. pneumoniae*. A zona de inibição de crescimento foi avaliada após incubação por 18h à 37°C (E).

5.5 O tratamento TAT-GILZ previne 30% da letalidade induzida pela pneumonia pneumocócica

Considerando que o tratamento com TAT-GILZ mostrou efeito benéfico em vários parâmetros inflamatórios, aumentou a eferocitose e diminuiu a contagem de bactérias no BAL durante a infecção por *S. pneumoniae*, investigamos em seguida se este tratamento poderia influenciar a sobrevivência dos animais infectados. Para tanto, camundongos WT foram infectados por via intranasal com 10^5 CFU de *S. pneumoniae* e receberam TAT-GILZ, TAT ou veículo por via intraperitoneal às 12, 24 e 48h após a infecção (delineamento experimental na Figura 13A) e foram acompanhados por 10 dias para avaliação de sobrevivência e peso. Todos os camundongos tratados com veículo ou TAT morreram entre os dias 6-7 pós infecção, mas o tratamento com TAT-GILZ resultou em sobrevivência de 30% dos animais (Figura 13B). Além disso, enquanto os animais tratados com veículo ou TAT apresentaram alta porcentagem de perda de peso no quinto dia pós infecção, o grupo de camundongos tratados com TAT-GILZ teve uma perda de peso menor (Figura 13C) e começou a recuperá-lo a partir do sexto dia, apresentando sinais de recuperação mais rápida, como a maior mobilidade dentro das caixas.

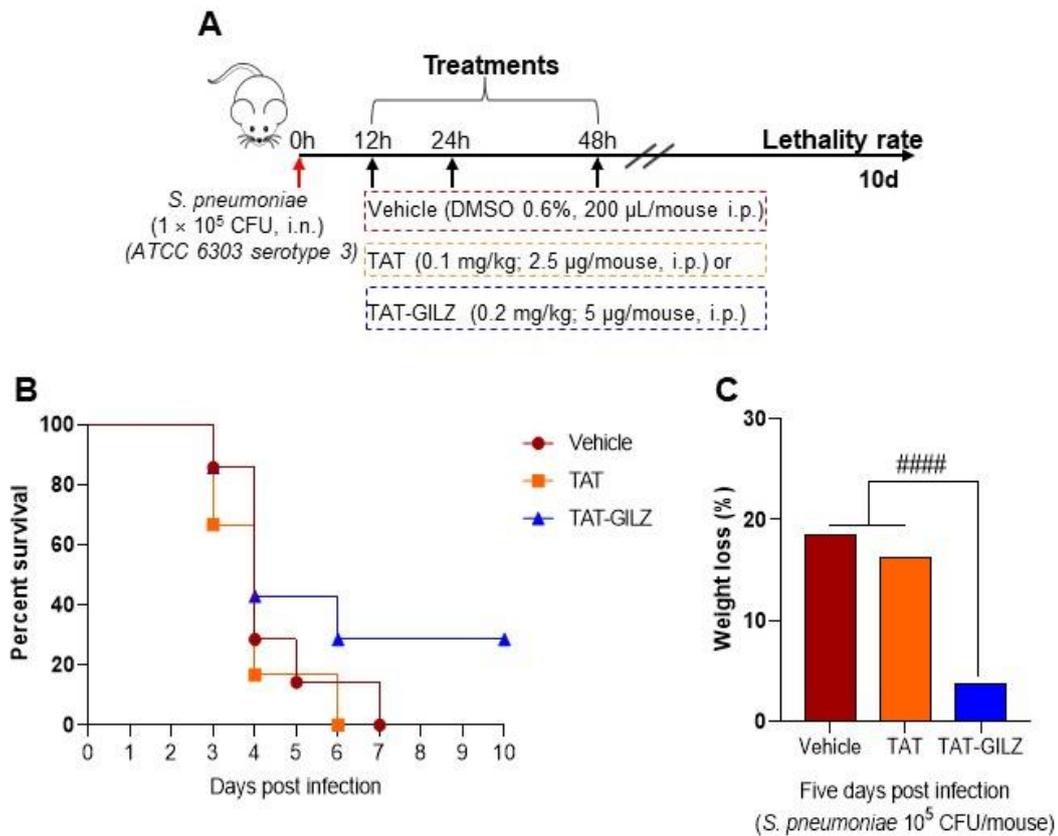


Figura 13. O tratamento com TAT-GILZ protegeu 30% dos camundongos da pneumonia pneumocócica letal. Camundongos BALB/c foram infectados com *S. pneumoniae* (1×10^5 CFU, i.n.) e tratados com TAT (0,1 mg/kg, i.p.), TAT-GILZ (0,2 mg/kg, i.p.) ou veículo às 12, 24 e 48 h p.i. (A), os grupos foram monitorados quanto às taxas de letalidade (B) e porcentagem de peso perdido no quinto dia pós-infecção (C). O grupo veículo recebeu DMSO 0,6%. N = 6-7 animais por grupo. #### $p < 0,0001$ ao comparar camundongos com pneumonia pneumocócica tratados com TAT-GILZ com veículo ou grupo TAT, por one-way ANOVA.

6 DISCUSSÃO

A pneumonia é definida como uma inflamação do parênquima pulmonar e das vias aéreas desencadeada por patógenos como bactérias, vírus, fungos ou outros. Apesar da disponibilidade de antibióticos e vacinas, a pneumonia pneumocócica é uma das principais causas de mortalidade, principalmente em crianças e idosos (revisto por: ZAR *et al.*, 2013; DRIJKONINGEN; ROHDE, 2014). A inflamação é importante para proteger o hospedeiro por meio da eliminação do agente infeccioso, mas deve ser autolimitada, progredindo até a resolução completa (revisto por: BASIL; LEVY *et al.*, 2016; SOUSA; PINHO; TEIXEIRA, 2020; VAGO *et al.*, 2021). A resolução da inflamação é um processo ativo que envolve a produção e ativação de mediadores bioquímicos e vias de sinalização para garantir a restauração da homeostase tecidual (revisto por: SOUSA *et al.*, 2013; SUGIMOTO *et al.*, 2019). Por outro lado, respostas inflamatórias exacerbadas desencadeadas por infecção podem causar intenso dano e disfunção pulmonar aumentando a gravidade da pneumonia (QUINTON; WALKEY; MIZGERD, 2018).

Os glicocorticoides (GCs) são medicamentos importantes para o tratamento de muitas doenças inflamatórias e têm se mostrado benéficos no tratamento de inflamações causadas por certas doenças infecciosas, incluindo meningite, tuberculose e pneumonia bacteriana (RHEN & CIDLOWSKI, 2005) e, mais recentemente, COVID-19 (RECOVERY, 2021). De fato, estudos pré-clínicos demonstraram que a combinação de GCs com antibióticos previne danos pulmonares relacionados à inflamação durante pneumonia pneumocócica (GHONEIM & MCCULLERS, 2014; YANG *et al.*, 2019). No entanto, o tratamento com GCs a longo prazo ou em altas doses geralmente está associado a efeitos colaterais importantes (VANDEVYVER *et al.*, 2013).

Proteínas induzidas por GCs, as quais medeiam várias ações imunomoduladoras dessa potente classe de fármacos, sem apresentarem efeitos deletérios, como a proteína GILZ (AYROLDI; RICCARDI *et al.*, 2009; CHENG; MORAND; YANG *et al.*, 2014), podem representar candidatos para o tratamento de doenças inflamatórias. De fato, os benefícios da AnxA1, outra proteína pró-resolutiva induzida por GCs, foram descritos recentemente no tratamento da pneumonia pneumocócica experimental (MACHADO *et al.*, 2019) e apoiam esse conceito. O tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1, Ac2-26, diminuiu a inflamação, o dano pulmonar e a carga bacteriana nas vias aéreas, aumentando a fagocitose bacteriana

pelos macrófagos (MACHADO *et al.*, 2019). Até o momento, poucos estudos investigaram os efeitos de GILZ em modelos pré-clínicos de infecção (RICCI *et al.*, 2019; BALLEGEER *et al.*, 2019; ELLOUZE *et al.*, 2020). Nesse trabalho, identificamos o papel protetor de GILZ em dois modelos de lesão pulmonar aguda: causada por LPS e por *S. pneumoniae*. Mostramos que TAT-GILZ foi capaz de (i) diminuir a inflamação neutrofílica, aumentar a eferocitose de células apoptóticas e a depuração bacteriana nas vias aéreas; (ii) atenuar o dano pulmonar; (iii) aumentar a fagocitose de bactérias *in vitro*; e (iv) reduzir a letalidade da pneumonia pneumocócica. Esses principais achados estão ilustrados na Figura 14.

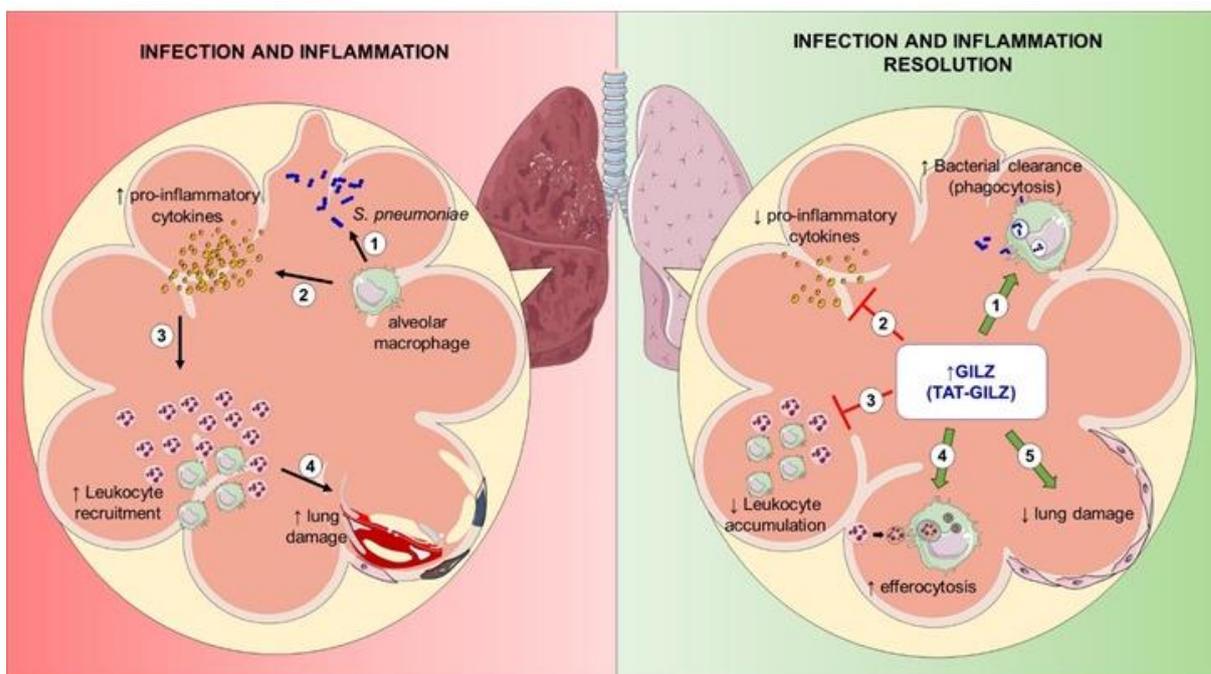


Figura 14. Efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos do tratamento com TAT-GILZ na inflamação pulmonar infecciosa. Durante a infecção pneumocócica grave (painel esquerdo), os macrófagos alveolares (1) reconhecem e sinalizam bactérias através da liberação vários mediadores pró-inflamatórios (2) que ativam o endotélio e aumentam o recrutamento de leucócitos (3) para os pulmões. A inflamação persistente e excessiva leva a danos pulmonares significativos (4). O tratamento com TAT-GILZ (painel direito), controla a inflamação excessiva aumentando o *clearance* bacteriano (1) (através da fagocitose de pneumococos), diminuindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios (2) e reduzindo o acúmulo de leucócitos (3). TAT-GILZ também aumentou a eferocitose de neutrófilos apoptóticos (4) e protegeu o epitélio pulmonar do dano inflamatório associado (5). De forma geral, TAT-GILZ promoveu a resolução da infecção e inflamação durante a pneumonia pneumocócica.

A LPA se manifesta como um processo inflamatório clinicamente caracterizado por infiltrado de leucócitos nos pulmões, hipoxemia e edema, sendo a pneumonia a principal causa de morbidade e mortalidade desta enfermidade (PAREKH; DANCER; THICKETT, 2011). O acúmulo de mediadores pró-inflamatórios e neutrófilos é uma

característica importante da LPA. Aqui, mesmo usando um modelo moderado de LPA (por instilação de 1 µg LPS), observamos uma exacerbação da pneumonia induzida por LPS na ausência de GILZ, o qual foi caracterizada por aumento da infiltração neutrofílica, de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas ativas de neutrófilos nas vias aéreas, e lesão pulmonar pronunciada. Além disso, e de acordo com achados anteriores de estudos *in vitro* (utilizando BMDMs) e *in vivo* em um modelo auto-resolutivo de pleurisia (VAGO *et al.*, 2020), GILZ foi mostrado como um importante indutor de eferocitose, sendo que os camundongos deficientes em GILZ apresentam eferocitose reduzida quando comparados aos animais WT.

Consistente com nossos achados anteriores obtidos no modelo de pleurisia induzida por LPS, no presente estudo, animais com LPA que foram tratados TAT-GILZ apresentaram diminuição da inflamação neutrofílica pulmonar e citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias e aumento do mecanismo de eferocitose, um evento importante para o processo resolutivo pulmonar (ROBB *et al.*, 2016). Esses dados corroboram estudos anteriores mostrando que GILZ reduz a inflamação e melhora a sobrevivência de camundongos durante a endotoxemia induzida por LPS (PINHEIRO *et al.*, 2013) e parece estar envolvido na atenuação da resposta sistêmica ao LPS, promovida por álcoois de cadeia curta (NG *et al.*, 2020). Esses achados sugerem que o GILZ endógeno modula a resposta inflamatória e sua administração exógena (por exemplo, por meio do TAT-GILZ) favorece a resolução da inflamação em ambos os modelos pré-clínicos utilizados neste trabalho.

Já foi demonstrado que a expressão de GILZ é aumentada durante a fase resolutiva do processo inflamatório e que a administração de TAT-GILZ no pico da inflamação promove diminuição do número de neutrófilos viáveis e aumento de neutrófilos apoptóticos (VAGO *et al.*, 2015). Além de induzir a apoptose de neutrófilos, TAT-GILZ também modula a polarização de macrófagos e induz o processo de eferocitose (VAGO *et al.*, 2020). A eferocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos é um processo mediado principalmente por macrófagos do tipo M2 e é um estágio crítico na resolução da inflamação (ARIEL & SERHAN, 2012; ZAIDAN *et al.*, 2022). Macrófagos do tipo M2 produzem mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e TGF-β (ARIEL & SERHAN, 2012; ZAIDAN *et al.*, 2021) e quantidades biologicamente ativas de mediadores pró-resolutivos lipídicos (DALLI & SERHAN, 2012). De fato, sob estímulo polarizante para M1 (IFN-γ + LPS), BMDMs de camundongos GILZ^{-/-} apresentaram aumento da produção de citocinas pró-

inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e diminuição dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, em comparação aos BMDMs de animais WT. Além disso, camundongos GILZ^{-/-} apresentam maior número de macrófagos M1 durante a pleurisia induzida por LPS, o qual foi associado com menores taxas de eferocitose, quando comparados aos camundongos WT (VAGO *et al.*, 2020). Corroborando com o papel de GILZ na indução de eventos pró-resolutivos, nesse mesmo modelo inflamatório de pleurisia o tratamento com TAT-GILZ diminuiu as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e os números de macrófagos M1, promovendo aumento da eferocitose de neutrófilos (VAGO *et al.*, 2015; VAGO *et al.*, 2020).

Em consonância com estes achados, no presente estudo mostramos que o tratamento com TAT-GILZ induziu aumento da eferocitose de neutrófilos no BAL, em ambos os modelos inflamatórios utilizados. No entanto, no *time point* que os experimentos foram realizados (24h), não encontramos níveis aumentados de IL-10 (dados não mostrados), o que corrobora com um estudo anterior que mensurou os níveis da IL-10 em vários momentos após a infecção pneumocócica e não observou aumento dessa citocina, em relação ao grupo que recebeu salina (MACHADO *et al.*, 2019). Ressalta-se ainda que o tratamento da pneumonia pneumocócica com o peptídeo mimético da AnxA1, Ac2-26, não modificou os níveis de IL-10, enquanto reduziu a resposta inflamatória, o dano pulmonar, a carga bacteriana e aumentou a fagocitose de penumococos (MACHADO *et al.*, 2019). Portanto, pode-se sugerir que outros mediadores pró-resolutivos liberados durante a eferocitose podem contribuir para a resolução da inflamação da pneumonia pneumocócica (MARTIN-RODRIGUEZ *et al.*, 2021).

Como a pneumonia pneumocócica é a principal causa de LPA, utilizamos no presente estudo um modelo clinicamente relevante de pneumonia experimental, visando compreender melhor o papel de GILZ na resposta do hospedeiro frente à uma infecção. Assim como no modelo de LPA induzida por LPS, a infecção pulmonar pneumocócica levou ao rápido acúmulo de neutrófilos, com aumento da produção de citocinas no BAL e dano pulmonar. Estes achados são semelhantes às características clínicas da pneumonia pneumocócica grave, que pode progredir para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Curiosamente, a expressão de GILZ é suprarregulada em neutrófilos de pacientes com SDRA grave, sugerindo GILZ como um potencial mecanismo contrarregulador para a inflamação pulmonar exacerbada (ESPINASSE *et al.*, 2016). Também foi observado que animais GILZ^{-/-} tem uma maior

ativação de neutrófilos com produção de ROS aumentada durante a infecção por *Candida albicans* (RICCI *et al.*, 2018). Aqui, mostramos que o tratamento com TAT-GILZ diminuiu o acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas e as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, resultando em redução da lesão pulmonar induzida pela infecção por *S. pneumoniae*. É conhecido que a intensa resposta inflamatória durante pneumonia pneumocócica grave, está associada à proliferação exacerbada de patógenos, mais que sua eliminação eficiente (MACHADO *et al.*, 2019). No presente trabalho, a modulação das respostas do hospedeiro por GILZ levou ao controle dos danos secundários causados pela inflamação e diminuiu significativamente a contagem de bactérias nas vias aéreas de camundongos. Portanto, aqui descrevemos outra atividade pró-resolutiva de GILZ - indução da fagocitose de bactérias por macrófagos.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os achados de contagens bacterianas reduzidas no sangue e fagocitose aumentada em camundongos que superexpressam GILZ quando submetidos ao modelo sepse polimicrobiana (CLP) (BALLEGEER *et al.*, 2019). Além disso, a superexpressão de GILZ especificamente em monócitos e macrófagos, aumentou o *clearance* bacteriano por meio da fagocitose, reduziu citocinas pró-inflamatórias e melhorou a sobrevivência de camundongos com CLP (ELLOUZE *et al.*, 2020). Juntos, os dados evidenciam o papel de GILZ nas funções antibacterianas de macrófagos durante infecções. Em contraste com os dados *in vivo* obtidos nos estudos com os modelos de sepse polimicrobiana e pneumonia pneumocócica (presente estudo), foi demonstrado que a regulação negativa de GILZ aumenta a produção de mediadores inflamatórios e a fagocitose de *S. typhimurium* por macrófagos (HOPPSTÄDTER *et al.*, 2019).

Embora ainda precise ser esclarecido se este dado contrastante, obtido de experimentos *in vitro*, está relacionado com a cepa de bactéria utilizada, aqui demonstramos que o tratamento com TAT-GILZ aumenta a sobrevivência de animais com pneumonia pneumocócica em consonância com os dados de aumento da sobrevivência de animais sépticos que superexpressam GILZ em monócitos/macrófagos (ELLOUZE *et al.*, 2020). Como no letrário ditado de Leonardo da Vinci “*pobre é o aluno que não supera seu mestre*”, GILZ pode ter efeitos mais promissores na sepse (VANDEWALLE & LIBERT, 2020) e em outros tipos de infecções, como mostrado no presente estudo, que os glicocorticoides.

7 CONCLUSÃO

Demonstramos um efeito protetor do GILZ endógeno e exógeno sobre a inflamação, proliferação de bactérias e dano tecidual, associado à redução da letalidade após o tratamento com TAT-GILZ. Sabendo-se que o aumento do DNA bacteriano pode prejudicar a apoptose e a eferocitose dos neutrófilos, perpetuando ainda mais a inflamação durante a infecção (NORLING & PERRETTI, 2020; SEKHERI *et al.*, 2020), a redução das contagens bacterianas e a promoção da eferocitose pelo TAT-GILZ podem ser considerados eventos cruciais para a regulação da inflamação e restauração da homeostase tecidual no contexto infeccioso. Em conjunto, esses achados sugerem que terapias baseadas em GILZ podem representar uma alternativa terapêutica como adjuvante aos antibióticos, no tratamento da pneumonia grave.

REFERÊNCIAS

- ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacol Ther** 2013.
- ALMAND, E. A.; MOORE, M. D.; JAYKUS, L. A. Virus-bacteria interactions: An emerging topic in human infection. *Viruses*. 2017;9:58.
- ALMEIDA, D. R. Método, software e banco de dados para sorotipagem molecular de *Streptococcus pneumoniae* visando o monitoramento da eficácia do programa de vacinação no Brasil. – Belo Horizonte, 2014.
- ANDRADE, D. C. Infection by *Streptococcus pneumoniae* in children with or without radiologically confirmed pneumonia. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 94, n.1, p. 23-30, Feb. 2018.
- ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira *et al.* A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. **Journal of Virology**, v. 95, n. 22, p. e01276-21, 2021.
- ARIEL, A.; SERHAN, C.N. New lives given by cell death: Macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. **Front. Immunol.** 2012, 3, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00004>.
- ASSUNÇÃO, R. G. *et al.* Pneumonia bacteriana: aspectos epidemiológicos, fisiopatologia e avanços no diagnóstico. **Rev. Investig, Bioméd.** v. 10, n. 1, p. 83- 92. 2018.
- AYROLDI E, MIGLIORATI G, BRUSCOLI S, MARCHETTI C, ZOLLO O, CANNARILE L, *et al.* Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 98(3): 743-753, 2001.
- AYROLDI E, ZOLLO O, MACCHIARULO A, DI MARCO B, MARCHETTI C, RICCARDI C. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Molecular and cellular biology* 22(22): 7929-7941, 2002.
- AYROLDI E, ZOLLO O, BASTIANELLI A, MARCHETTI C, AGOSTINI M, DI VIRGILIO R, *et al.* GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest* 117(6): 1605-1615, 2007.
- AYROLDI, E.; RICCARDI, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. **FASEB J.** 23: 3649– 3658. 2009
- AZEVEDO, J. V. V. *et al.* Influência do clima na incidência de infecção respiratória aguda em crianças nos municípios de Campina Grande e Monteiro, Paraíba, Brasil. **Revista brasileira de meteorologia.** V. 30 n.4. 2015.

BABAN, B.; MARCHETTI, C.; KHODADADI, H.; MALIK, A.; EMAMI, G.; LIN, P.-C.; ARBAB, A.S.; RICCARDI, C.; MOZAFFARI, M.S. Glucocorticoid-induced leucine zipper promotes neutrophil and T-cell polarization with protective effects in acute kidney injury. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 2018, 367, 483–493. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.251371>.

BALLEGEER, M.; VANDEWALLE, J.; EGGERMONT, M.; VAN ISTERDAEL, G.; DEJAGER, L.; DE BUS, L.; DECRUYENAERE, J.; VANDENBROUCKE, R. E.; LIBERT, C. Overexpression of Gilz Protects Mice Against Lethal Septic Peritonitis, **Shock**: August 2019 - Volume 52 - Issue 2 - p 208-214. doi: 10.1097/SHK.0000000000001252

BAKER, P. J. T cell regulation of the antibody response to bacterial polysaccharide antigens: an examination of some general characteristics and their implications. **J Infect Dis**, v. 165 Suppl 1, p. S44-8, Jun 1992.

BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol.** 2016 Jan;16(1):51-67.

BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G. 2009 Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. **MolEndocrinol.** 2009 23(3):281–291.

BRENTINI, L. C. *et al.* Incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica e os agentes etiológicos mais prevalentes. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 9, n. 3, out. 2019. ISSN 2238-3360.

BROOKS LRK, MIAS GI. *Streptococcus pneumoniae's* virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention. **Front Immunol** 2018; 9:1366.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. GOODMAN & GILMAN: AS BASES FARMACOLÓGICAS DA TERAPÊUTICA. 12a Edição. Porto Alegre (RS): **McGraw Hill/Artmed**, 2012.

BRUSCOLI, S.; VELARDI, E.; DI SANTE, M.; BERESHCHENKO, O.; VENANZI, A.; COPPO, M.; BERNO, V.; MAMELI, M.G.; COLELLA, R.; CAVALIERE, A. *et al.* Long Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (L-GILZ) Protein Interacts with Ras Protein Pathway and Contributes to Spermatogenesis Control. **J. Biol. Chem.** 2012, 287, 1242–1251. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316372>.

BRUSCOLI S, RICCARDI C, RONCHETTI S. GILZ as a Regulator of Cell Fate and Inflammation. **Cells.** 2021 Dec 30;11(1):122. doi: 10.3390/cells11010122. PMID: 35011684; PMCID: PMC8750894.

BUTTGEREIT, F. A fresh look at glucocorticoids how to use an old ally more effectively. **Bull NYU HospJt Dis.** 2012;70(Suppl 1):26–29.

CANNARILE, L.; CUZZOCREA, S.; SANTUCCI, L.; AGOSTINI, M.; MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; MUIA`, C.; COPPO, M.; DI PAOLA, R.; RICCARDI, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis. **Gastroenterology.** 2009, 136: 530–541.

CDC. Symptoms and Complications. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pneumococcal/about/symptoms-complications.html>>. Acesso em: 02 de jan. de 2022.

CHENG, Q.; MORAND, E.; YANG, Y.H. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases-similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 169. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00169>.

CLARK, A. R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Molecular and cellular endocrinology* *275*(1-2): 79-97, 2007.

DALLI, J.; SERHAN, C.N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: Microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* *2012*, *120*, e60–e72. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-423525>.

DALLI, J. Does promoting resolution instead of inhibiting inflammation represent the new paradigm in treating infections? *Mol Aspects Med.* 2017 Dec;58:12-20. doi: 10.1016/j.mam.2017.03.007. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28365269.

DELFINO, D.V.; AGOSTINI, M.; SPINICELLI, S.; VITO, P.; RICCARDI, C. Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood* *2004*, *104*, 4134–4141. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0920>.

D'ADAMIO, F., ZOLLO, O., MORACA, R., AYROLDI, E., BRUSCOLI, S., BARTOLI, A., *et al.* (1997). A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* *7*, 803–812. doi:10.1016/S1074-7613(00)80398-2.

DA CUNHA, Esther Emanuella; OLIANI, Sonia Maria; DAMAZO, Amílcar Sabino. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 25, n. 4, p. 303-311, 2012.

DATASUS [online]. Brasília: Ministério da Saúde. Informações de Saúde. Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/>>. Acesso em: 10. jan. 2022.

DE BOSSCHER, K.; VANDER, B. W.; HAEGEMAN, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: Molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Ver*, 2003, *24*:488-522.

DONKOR, ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol* *2013*;3:7

DRIJKONINGEN, J.J.C.; ROHDE, G.G.U. Pneumococcal infection in adults: Burden of disease. *Clin. Microbiol. Infect.* *2014*, *20* (Suppl. S5), 45–51. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12461>.

DUFFIN, R.; LEITCH, A. E.; FOX, S.; HASLETT, C.; ROSSI, A.G. Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunol Rev* *2010*, *236*:28-40.

DUQUE, E. A. **Efeito dos glicocorticóides na resposta inflamatória induzida por LPS em cultura de células primárias fronto-corticais de ratos neonatos.** 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ELLOUZE, M., VIGOUROUX, L., TCHERAKIAN, C., WOERTHER, P.-L., GUGUIN, A., ROBERT, O., SURENAUD, M., TRAN, T., CALMETTE, J., BARBIN, T., PERLEMUTER, G., CASSARD, A.-M., LAUNAY, P., MAXIME, V., ANNANE, D., LEVY, Y. AND GODOT, V. Overexpression of GILZ in macrophages limits systemic inflammation while increasing bacterial clearance in sepsis in mice. **Eur. J. Immunol.**, 2020, 50: 589-602. doi:[10.1002/eji.201948278](https://doi.org/10.1002/eji.201948278)

ESPINASSE, M.-A.; PÉPIN, A.; VIRAULT-ROCROY, P.; SZELY, N.; CHOLLET-MARTIN, S.; PALLARDY, M.; BIOLA-VIDAMMENT, A. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Is Expressed in Human Neutrophils and Promotes Apoptosis through Mcl-1 Down-Regulation. **J. Innate Immun.** 2016, 8, 81–96. <https://doi.org/10.1159/000439052>.

EKDAHL, K., AHLINDER, I., HANSSON, H. B., MELANDER, E., MOLSTAD, S., SODERSTROM, M. *et al.* Duration of NP carriage of PRP: Experiences from the South Swedish pneumococcal intervention project. **Clin Infect Dis** 1997;25:1113-7.

ETIENNE, Rachelle; VIEGAS, Flávia Pereira Dias; VIEGAS JR, Claudio. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, 2021.

FARKOUH, R. A. *et al.* Cost-effectiveness models of pneumococcal conjugate vaccines: variability and impact of modeling assumptions. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, n. 10, p. 1235-47, Oct 2012

FERREIRA, L. L. M., CARVALHO, E. S., BEREZIN. E. N., BRANDILEONE, M. C. Colonização e resistência antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* isolado em nasofaringe de crianças com rinfaringite aguda. **J Pediatr** (Rio J). 2001;77:227-34.

FONSECA, S. Pneumonias Pneumocócicas e Pneumonias por Influenza A: Estudo Comparativo. **Medicina Interna**. v. 24, n. 2. 2017.

FORUM OF INTERNATIONAL RESPIRATORY SOCIETIES (FIRS). The Global Impact of Respiratory Disease – Second Edition. Sheffield, European Respiratory Society, 2017.

GANAI, F., SAAD, J. S., MCGEE, L., VAN TONDER, A. J., BENTLEY, S. D., LO, S. W., *et al.* A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral *Streptococcus*. **mBio** 11, 937–20, 2020. doi: [10.1128/mBio.00937-20](https://doi.org/10.1128/mBio.00937-20).

GENTILI, M.; HIDALGO-GARCIA, L.; VEZZA, T.; RICCI, E.; MIGLIORATI, G.; RODRIGUEZ-NOGALES, A.; RICCARDI, C.; GALVEZ, J.; RONCHETTI, S. A recombinant glucocorticoid-induced leucine zipper protein ameliorates symptoms of dextran sulfate sodium-induced colitis by improving intestinal permeability. **FASEB J.** 2021, 35, e21950. <https://doi.org/10.1096/fj.202100778RRR>.

GHONEIM, Hazem E.; MCCULLERS, Jonathan A. Adjunctive corticosteroid therapy improves lung immunopathology and survival during severe secondary pneumococcal pneumonia in mice. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 9, p. 1459-1468, 2014.

GOBBETTI T, COLDEWEY SM, CHEN J, MCARTHUR S, LE FAOUDER P, CENAC N, FLOWER RJ, THIEMERMANN C, PERRETTI M. Nonredundant protective properties of FPR2/ALX in polymicrobial murine sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014 Dec 30;111(52):18685-90. doi: 10.1073/pnas.1410938111. Epub 2014 Dec 15. PMID: 25512512; PMCID: PMC4284560.

GOMES, L. Fatores de risco e medidas profiláticas nas pneumonias adquiridas 8 na comunidade. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 2, p. 97–114, 2001.

GREENLEE-WACKER, M.C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. **Immunol. Rev.** 2016, 273, 357–370. <https://doi.org/10.1111/imr.12453>.

HOPPSTÄDTER, J.; DIESEL, B.; LINNENBERGER, R.; HACHENTHAL, N.; FLAMINI, S.; MINET, M.; LEIDINGER, P.; BACKES, C.; GRÄSSER, F.; MEESE, E.; *et al.* Amplified host defense by toll-like receptor-mediated downregulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in macrophages. **Front. Immunol.** 2019, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03111>.

KADIOGLU, A. & ANDREW, P. W. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. **Trends. Immunol.** 25, 143–149, 2004.

KAFKA, D. *et al.* Contribution of IL-1 to resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. **International immunology**, v. 20, n. 9, p. 1139-1146, 2008.

KASPER, D. L.; FAUCI, A. S. Doenças infecciosas de Harrison. 2ª edição. **Artmed**, 2015. Disponível em: <https://books.google.com.br> – Acesso em: 31 abr. 2020.

KERR A. R. *et al.* Innate immune defense against pneumococcal pneumonia requires pulmonary complement component C3. **Infect Immun** 2005;73(7):4245–52.

LEGG, K. Infectious disease: Pro-resolving lipids offer a helping hand to antibiotics. **Nat Rev Immunol.** 2012 May 25;12(6):398-9. doi: 10.1038/nri3234.

LEONI, G. *et al.* Wound repair: role of immune–epithelial interactions. **Mucosal immunology**, v. 8, n. 5, p. 959-968, 2015.

MACHADO, M.; TAVARES, L. P.; SOUZA, G. V. S.; QUEIROZ'JUNIOR, C. M.; ASCENÇÃO, F. R.; LOPES, M. E.; GARCIA, C. C.; MENEZES, G. B.; PERRETTI, M.; RUSSO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. **FASEB JOURNAL**, v. 1, p. 1-16, 2019.

MACINTYRE CR, BUI CM. Pandemics, public health emergencies and antimicrobial resistance - putting the threat in an epi-demiologic and risk analysis context. **Arch Public Health.**2017;75:54–54.

MARTIN-RODRIGUEZ, O.; GAUTHIER, T.; BONNEFOY, F.; COUTURIER, M.; DAOUI, A.; CHAGUÉ, C.; VALMARY-DEGANO, S.; GAY, C.; SAAS, P.; PERRUCHE,

S. Pro-Resolving Factors Released by Macrophages After Efferocytosis Promote Mucosal Wound Healing in Inflammatory Bowel Disease. **Front. Immunol.** 2021, 12, 5531. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.754475>.

NAGAI K, DOMON H, MAEKAWA T, *et al.* Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. **Cell Immunol** 2018; 325:14–22

MACINTYRE, C.R., CHUGHTAI, A.A., BARNES, M. *et al.* The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza a(H1N1)pdm09. **BMC Infect Dis** 18, 637 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3548-0>

MALFROOT, A. *et al.* A cross-sectional survey of the prevalence of Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 9, p. 797–803, set. 2004.

MASSAIA, Irineu Francisco Delfino Silva. **Avaliação da resposta imune inata in situ no pulmão na doença pneumocócica invasiva.** 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MCMASTER, A; RAY, D. W. Drug insight: Selective agonists and antagonists of the glucocorticoid receptor. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, 2008, 6:1111-1131.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature** 454, 428–435 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07201>.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell** 2010, 140:771-776.

MELO EM, DEL SARTO J, VAGO JP, TAVARES LP, RAGO F, GONÇALVES APF, MACHADO MG, ARANDA-PARDOS I, VALIATE BVS, CASSALI GD, PINHO V, SOUSA LP, A-GONZALEZ N, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, BADER M, SANTOS RAS, MACHADO AV, LUDWIG S, TEIXEIRA MM. Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus and post-influenza pneumococcal infection. **Pharmacol Res.** 2021 Jan;163:105292. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105292. Epub 2020 Nov 7. PMID: 33171305.

MITTELSTADT PR, ASHWELL JD. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. **The Journal of biological chemistry** 276(31): 29603-29610, 2001.

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

NASCIMENTO-CARVALHO, Cristiana M. Community-acquired pneumonia among children: the latest evidence for an updated management. **Jornal de Pediatria**, v. 96, p. 29-38, 2020.

NG, H. P.; Jennings, S.; Nelson, S.; Wang, G. Short-Chain Alcohols Upregulate GILZ Gene Expression and Attenuate LPS-Induced Septic Immune Response. **Front. Immunol**, 2020, 11:53. doi: 10.3389/fimmu.2020.00053

NGO, D.; BEAULIEU, E.; GU, R.; LEANEY, A.; SANTOS, L.; FAN, H.; YANG, Y.; KAO, W.; XU, J.; ESCRIOU, V.; *et al.* Divergent effects of endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models of inflammation and arthritis. **Arthritis Rheum**, 2013, 65, 1203–1212. <https://doi.org/10.1002/art.37858>.

NORLING, L.V.; PERRETTI, M. Proresolving lipid mediators enhance PMN-mediated bacterial clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2020, 117, 9148–9150. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004241117>.

OBOLSKI, U.; LOURENÇO, J.; THOMPSON, C.; THOMPSON R.; GORI, A.; GUPTA, S. Vaccination can drive an increase in frequencies of antibiotic resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. **PNAS**, 2018 115 (12) 3102-3107.

OLIVEIRA, R. X. DE, DA SILVA, C. H., GOMES, A. P., MOREIRA, T. R., & BRAGA, L. M. Resistência antimicrobiana na pneumonia adquirida na comunidade: revisão de literatura. **VITTALLE - Revista De Ciências Da Saúde**, 33(3), 76–88, 2021. <https://doi.org/10.14295/vittalle.v33i3.12659>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Respiratory tract diseases. 2020. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/health-topics/respiratory-tract-diseases/index.html>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

PAREKH, D.; DANCER, R.C.; THICKETT, D.R. Acute lung injury. **Clin. Med. J.** 2011, 11, 615–618. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.11-6-615>.

PATEL, Devang M. *et al.* Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. **Journal of cell science**, v. 124, n. 4, p. 578-588, 2011.

PÉREZ, L. E. E. M.; JUÁREZ, R. N. J.; BARRETO, D. G.; VILLAR, C. F. N. *Streptococcus pneumoniae*: prevalence in nasopharyngeal carriers of more than 50-years-old, in a Mexican rural community, **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Volume 37, Issue 1, 2019.

PERRETTI, M. *et al.* Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 11, p. 737–755, nov. 2015.

PINHEIRO, I.; DEJAGER, L.; PETTA, I.; VANDEVYVER, S.; PUIMÈGE, L.; MAHIEU, T.; BALLEGEER, M.; VAN HAUWERMEIREN, F.; RICCARDI, C.; VUYLSTEKE, M.; *et al.* LPS resistance of SPRET/Ei mice is mediated by Gilz, encoded by the Tsc22d3 gene on the X chromosome. **EMBO Mol. Med.** 2013, 5, 456–470. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201683>

QUINTON, L.J.; WALKEY, A.J.; MIZGERD, J.P. Integrative physiology of pneumonia. **Physiol. Rev.** 2018, 98, 1417–1464. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00032.2017>.

RHEN, Turk; CIDLOWSKI, John A. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

REMMELTS, Hilde HF *et al.* Dexamethasone downregulates the systemic cytokine response in patients with community-acquired pneumonia. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 9, p. 1532-1538, 2012.

REY, L. C.; WOLF, B.; MOREIRA, L. B.; VERHOEF, J. FARHAT, C. K. *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe de crianças saudáveis e com pneumonia: taxa de colonização e suscetibilidade aos antimicrobianos. **J Pediatr** (Rio J). 2002;78:105-12.

RICCI, E.; RONCHETTI, S.; GABRIELLI, E.; PERICOLINI, E.; GENTILI, M.; ROSELLETTI, E.; VECCHIARELLI, A.; RICCARDI, C. GILZ restrains neutrophil activation by inhibiting the MAPK pathway. **J. Leukoc. Biol.** 2018, 105, 187–194. <https://doi.org/10.1002/JLB.3AB0718-255R>.

ROBB, C.T.; REGAN, K.H.; DORWARD, D.A.; ROSSI, A.G. Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. **Semin. Immunopathol.** 2016, 38, 425–448. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0560-6>.

ROMERO, Y.; VUANDABA, M.; SUAREZ, P.; GREY, C.; CALVEL, P.; CONNE, B.; PEARCE, D.; DE MASSY, B.; HUMMLER, E.; NEF, S. The Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ) Is Essential for Spermatogonial Survival and Spermatogenesis. **Sex. Dev.** 2012, 6, 169–177. <https://doi.org/10.1159/000338415>.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; RICCARDI, C. GILZ as a mediator of the antiinflammatory effects of glucocorticoids. **Front Endocrinol** (Lausanne). 2015; 6:170.

SA-LEAO, R. *et al.* Analysis of Invasiveness of Pneumococcal Serotypes and Clones Circulating in Portugal before Widespread Use of Conjugate Vaccines Reveals Heterogeneous Behavior of Clones Expressing the Same Serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1369–1375, 1 abr. 2011.

SANTOS-SOUZA, G. V. **Estudo da resposta inflamatória em modelos experimentais de Lesão pulmonar aguda.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

SEKHERI, M.; EL KEBIR, D.; EDNER, N.M.; FILEP, J.G. 15-Epi-LXA4 and 17-epi-RvD1 restore TLR9-mediated impaired neutrophil phagocytosis and accelerate resolution of lung inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2020, 117, 7971–7980. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920193117>.

SENDER, V.; HENTRICH, K.; AND HENRIQUES-NORMARK. B. Virus-Induced Changes of the Respiratory Tract Environment Promote Secondary Infections With *Streptococcus pneumoniae*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 11:643326, 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.643326

SCHLOER, Sebastian *et al.* The annexin A1/FPR2 signaling axis expands alveolar macrophages, limits viral replication, and attenuates pathogenesis in the murine influenza A virus infection model. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 11, p. 12188-12199, 2019.

SERHAN, C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature** 2014, 510, 92–101.

SHORT, K. R., HABETS, M. N., HERMANS, P. W., AND DIAVATOPOULOS, D. A. Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus: a mutually beneficial relationship? **Future Microbiol.** 7, 609–624. doi: 10.2217/fmb.12.29, 2012.

SMITH, H.; SWEET, C. Cooperation between viral and bacterial pathogens in causing human respiratory disease. Poly-microbial Diseases. ASM Press, 2002.

SNIPPE, H.; ALONSODEVELASCO, E.; VERHEUL, A.F.; VERHOEF, J. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiol. Rev.** 1995, 59, 591–603. <https://doi.org/10.1128/mubr.59.4.591-603.1995>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES (SBIm). São Paulo: SBIm. Calendário de Vacinação SBIm Adulto 2018/2019. Disponível: <<https://sbim.org.br/images/calendarios/calend-sbimadulto.pdf>>. Acesso em: 02 de jan. de 2022.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISSOLOGIA (SBPT). Guia de imunização. 2018 GUIA DE IMUNIZAÇÃO SBIm/SBPT – PNEUMOLOGIA 2018-2019

SONG, J. Y.; EUN, B. W.; NAHM, M. H. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: current pitfalls and the way forward. **Infect Chemother**, 2013;45: 351–366.

SOUSA, L. P. *et al.*: Pharmacological strategies to resolve acute inflammation, **Curr Opin Pharmacol**, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.03.007>

SOUSA, L. P.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Harnessing inflammation resolving-based therapeutic agents to treat pulmonary viral infections: What can the future offer to COVID-19? **Br J Pharmacol**. 2020 Sep;177(17):3898-3904. doi: 10.1111/bph.15164. Epub 2020 Jul 8. PMID: 32557557; PMCID: PMC7323156.

SPOORENBERG, S. M.; BOS, W. J.; HEIJLIGENBERG, R.; VOORN, P. G.; GRUTTERS, J. C.; RIJKERS, G. T.; VAN DE GARDE, E. M. Microbial aetiology, outcomes, and costs of hospitalisation for community-acquired pneumonia: an observational analysis. **BMC Infect Dis** 2014;14:335.

SODHI, C. P.; NGUYEN, J.; YAMAGUCHI, Y.; WERTS, A. D.; LU, P.; LADD, M. R.; FULTON, W. B.; KOVLER, M. L.; WANG, S.; PRINDLE, T. J.R.; ZHANG, Y.; LAZARTIGUES, E. D.; HOLTZMAN, M. J.; ALCORN, J. F.; HACKAM, D. J.; JIA, H. A Dynamic Variation of Pulmonary ACE2 Is Required to Modulate Neutrophilic Inflammation in Response to *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection in Mice. **J Immunol**. 2019 Dec 1;203(11):3000-3012.

SOUNDARARAJAN R, WANG J, MELTERS D, PEARCE D. Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms. *The Journal of biological chemistry* 282(50): 36303- 36313, 2007.

SUGIMOTO, Michelle A. *et al.* Resolution of inflammation: what controls its onset?. **Frontiers in immunology**, p. 160, 2016.

SUGIMOTO, M. A.; VAGO, J. P.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Mediators of the resolution of the inflammatory response. **Trends in immunology**, 2019.

TAVARES, L. P. Inibição da Fosfodiesterase 4 em um modelo murino de pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*. 2015.

TAVARES, L. P.; TEIXEIRA, M. M.; GARCIA, C. C. The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword. **Inflamm Res**. 2017 Apr;66(4):283-302. doi: 10.1007/s00011-016-0996-0. Epub 2016 Oct 15.

TAVARES, L. P.; GALVÃO, I.; FERRERO, M. R. Novel Immunomodulatory Therapies for Respiratory Pathologies. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 2021.

TETRO, J. A. Is COVID-19 receiving ADE from other cor-onaviruses? **Microbes Infect**. 2020;22:72–73

TILLEY, S. J., ORLOVA, E. V., GILBERT, R. J., ANDREW, P. W. & SAIBIL, H. R. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. **Cell** 121, 247–256 (2005).

THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. **N. Engl. J. Med.** 2021, 384, 693–704. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2021436>.

THE UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). A child dies of pneumonia every 39 seconds. UNICEF Data: Monitoring the situation of children and women, 2021. Disponível em: <<https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

TORTORA, G. J.; BERDELL R. F.; CHRISTINE, L. C.; tradução: Danielle Soares de Oliveira Daian, Luis Fernando Marques Dorvillé; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca, Ana Paula Guedes Frazzon, Jeverson Frazzon. – 12. ed. – Porto Alegre : Artmed, 2017.

VAGO, J. P.; NOGUEIRA, C. R.; TAVARES, L. P.; SORIANI, F. M.; LOPES, F.; RUSSO, R. C.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **J. Leukoc. Biol.** 2012, 92: 249–258.

VAGO, J.P.; TAVARES, L.P.; GARCIA, C.C.; LIMA, K.M.; PERUCCI, L.O.; VIEIRA, L.; NOGUEIRA, C.R.C.; SORIANI, F.M.; MARTINS, J.O.; SILVA, P.M.R.; *et al.* The Role and Effects of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper in the Context of Inflammation Resolution. **J. Immunol.** 2015, 194, 4940–4950. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401722>.

VAGO, J. P.; GALVÃO, I.; NEGREIROS-LIMA, G. L.; TEIXEIRA, L. C. R.; LIMA, K. M.; SUGIMOTO, M. A.; MOREIRA, I. Z.; JONES, S. A.; LANG, T.; RICCARDI, C.; TEIXEIRA, M. M.; HARRIS, J.; MORAND, E. F.; SOUSA, L. P. **Pharmacol Res**. 2020 May 13;158:104842. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104842

VAGO, J.P.; TAVARES, L.P.; RICCARDI, C.; TEIXEIRA, M.M.; SOUSA, L.P. Exploiting the pro-resolving actions of glucocorticoid-induced proteins Annexin A1 and

GILZ in infectious diseases. *Biomed. Pharmacotherapy*. 2021, 133, 111033. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111033>

VANDEVYVER S, DEJAGER L, TUCKERMANN J, LIBERT C. New insights into the antiinflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptormediated transactivation. *Endocrinology* 154(3): 993-1007, 2013.

VANDEWALLE J.; LIBERT, C. Gilz in sepsis: "Poor is the pupil who does not surpass his master". *Eur J Immunol*. Apr;50(4):490-493. doi: 10.1002/eji.202048582. Epub 2020a.

VANDEWALLE, J.; LIBERT, C. Glucocorticoids in sepsis: to be or not to be. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 1318, 2020b.

WALKER KH, KRISHNAMOORTHY N, BRÜGGEMANN TR, SHAY AE, SERHAN CN, LEVY BD. Protectins PCTR1 and PD1 Reduce Viral Load and Lung Inflammation During Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *Front Immunol*. 2021 Aug 19;12:704427. doi: 10.3389/fimmu.2021.704427. PMID: 34489955; PMCID: PMC8417406.

WALLACH, D.; KANG, T. B.; KOVALENKO, A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: A historical perspective. *Nature Reviews Immunology* 2014, 14, 5

WEISER JN, FERREIRA DM, PATON JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16:355–367.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Pneumococcus*. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/WHO_SurveillanceVaccinePreventable_17_Pneumococcus_R2.pdf?ua=1>. Acesso em: 06 maio 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Coronavirus Disease (COVID-2019) **Situation Reports 106**. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200505covid-19-sitrep-106.pdf?sfvrsn=47090f63_2>. Acesso em: 10 janeiro 2022.

WU, D., WU, C., ZHANG, S., & ZHONG, Y. Risk factors of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Frontiers in pharmacology*, v. 10, p. 482, 2019.

XU, ZHI-LI *et al*. Candida albicans-induced acute lung injury through activating several inflammatory signaling pathways in mice. *International Immunopharmacology*, v. 72, p. 275-283, 2019.

YANG, M., BASSI, G. L., MOTOS, A., YANG, H., BOBI, J., MELI, A., ... & TORRES, A. Corticosteroid therapy combined with antibiotics for severe *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in ventilated piglets. *European Respiratory Journal* 2019; 54: Suppl. 63, PA4553, 2019.

YONA, S. *et al*. Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. *British journal of pharmacology*, v. 148, n. 4, p. 469, 2006.

ZAIDAN, I.; TAVARES, L.P.; SUGIMOTO, M.A.; LIMA, K.M.; NEGREIROS-LIMA, G.L.; TEIXEIRA, L.C.R.; MIRANDA, T.C.; VALIATE, B.V.S.; CRAMER, A.; VAGO, J.P.; *et al.* Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis. **JCI Insight** 2022, 7, e147819

ANEXO A – Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA INDUZIDA POR GLICOCORTICOIDE GILZ (GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER) NA PNEUMONIA BACTERIANA EXPERIMENTAL", protocolo do CEUA: 162/2020 sob a responsabilidade de Lirlândia Pires de Sousa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 14/09/2020.

Vigência da Autorização	14/09/2020 a 13/09/2025
-------------------------	-------------------------

Considerações posteriores:

14/09/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 14/09/2020. Validade: 14/09/2020 à 13/09/2025.
------------	--

Belo Horizonte, 06/10/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br