

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Luciana Pádua Tavares

Inibição da Fosfodiesterase-4 em um modelo murino
de pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*

Belo Horizonte

2015

Luciana Pádua Tavares

INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 4 EM UM MODELO
MURINO DE PNEUMONIA POR *STREPTOCOCCUS*
PNEUMONIAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins
Teixeira

Co-orientadora: Dra. Cristiana Couto
Garcia

Belo Horizonte

2015

*Dedico este trabalho a minha família
linda!*

*Aos meus pais, Francisco e Maria
Helena, pelos primeiros e mais
importantes ensinamentos.*

*À minha irmã querida, Flávia pela
torcida e risada fácil.*

*Ao meu namorado, Lucas pelo amor e
confiança.*

Obrigada por caminharem junto comigo, sempre!

AGRADECIMENTOS:

Não só durante a execução de todo o trabalho, mas ao longo da minha vida acadêmica tive a sorte de contar com pessoas muito especiais sem as quais não poderia chegar até aqui. Agradeço a todas elas!

Ao meu orientador Prof. Mauro Martins Teixeira, por todo apoio, confiança e incentivo. Agradeço pela paciência durante a iniciação científica e também durante o mestrado, pelas reuniões cheias de novas idéias e por sempre tornar a ciência mais divertida e desafiadora!

A minha co-orientadora, Dra. Cristiana Couto Garcia. Que foi mais que uma chefe, foi amiga, confidente e essencial durante a minha ainda curta trajetória científica! Obrigada por sempre estar presente e me fazer pensar como “cientista”! Agradeço por todo o ensinamento, as discussões científicas, carinho, paciência e principalmente por sempre acreditar em mim.

A Profa. Lirlândia Pires de Sousa, orientadora durante a iniciação científica, mas que nunca deixou de me orientar e ajudar. Agradeço não só por me trazer para o Laboratório de Imunofarmacologia, mas principalmente por toda a atenção e carinho durante a execução do trabalho.

Aos amigos da Imunofar, o melhor laboratório desse mundo! Agradeço pela ajuda de sempre, os ensinamentos e por tornarem o dia a dia do laboratório sempre melhor!

Aos professores: Remo, Dani, Flávio e Vanessa por me ajudarem sempre que eu precisei, pelo carinho e ótima convivência. As amigas: Bela, Angel, Livinha, Dai, Aninha, Beca, Juju, Ciça, Rezoca, Vivi, Iara que me ajudaram nas letalidades, autoclavações, dúvidas e me “salvaram” durante os experimentos! Aos amigos: Elisão, Bro, Baiano, Bruno, Leandro, principalmente pelas risadas, mas também por toda a ajuda!

Aos amigos do grupo da Landa: Katita, Bruno, Lu, Ana e em especial:

À Ju que me ajudou durante todos os experimentos, discussões e pela amizade de sempre: dos desabafos às fofocas!

À Thaís por sempre estar disposta a ajudar, pelo jeito engraçado e desajeitado e pela amizade sempre!

Ao pessoal da Dani, da Vanessa e Gustavo: principalmente a Bruna pela amizade e paciência durante a interpretação e imagens dos experimentos de imunofluorescência.

À Ilma, a verdadeira chefe do grupo Imunofar, pelo enorme apoio técnico, pela ótima convivência, amizade e pelas muitas risadas. À Frank pelos experimentos de FACS, pelo apoio técnico e pelo carinho e paciência de sempre! Ao Hermes e Pedro que sempre estiveram dispostos a ajudar para que os animais estivessem sempre em boas condições para os experimentos.

Ao Jamil e ao Laboratório de Ecologia de Microrganismos pela ajuda e pela disponibilização da sua infraestrutura de trabalho.

À Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira do Instituto Butantã, São Paulo, por ceder gentilmente a cepa de *Streptococcus pneumoniae* utilizada no trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Aos amigos da Bio e de Bases por tornarem as aulas sempre mais leves!

Aos amigos do colégio (família que eu pude escolher): Caca, Iza, Jo, Mah, Bel, Polly, Nanda, Friends e todos os outros.

E principalmente, à minha família. Razão da minha vida e a minha maior torcida! Aos meus pais e a minha irmã Flávia! Pelo exemplo de caráter, amor incondicional e determinação! Agradeço todo o incentivo, carinho, esforço diário e por fazerem de tudo (mesmo) para que esse trabalho pudesse ser concluído. Ao meu namorado e melhor amigo, Lucas, pelo amor, carinho e compreensão! Pelas idas ao laboratório no final de semana, feriados e madrugadas e por não me deixar desistir nunca!

Agradeço também aos meus padrinhos e avós, primos e tios. Exemplos de vida, dedicação e até mesmo na ciência. Obrigado por escutarem meus desabafos, pelos conselhos e por torcerem muito por mim!

Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO:

A pneumonia pneumocócica é uma importante causa de mortalidade no mundo. A resposta inflamatória contra as bactérias é necessária para controlar a infecção, mas a permanência e ativação excessiva dos neutrófilos nos pulmões podem resultar em dano tecidual significativo. Os inibidores de fosfodiesterase 4 (PDE4), tais como o rolipram, reduzem a inflamação de forma eficiente. O presente estudo analisou o impacto do tratamento com rolipram em um modelo murino de pneumonia pneumocócica. Camundongos Balb/C foram infectados por via intranasal com 10^3 - 10^6 CFU de *Streptococcus pneumoniae* e a cinética da inflamação desencadeada foi avaliada. Camundongos infectados com 10^4 - 10^5 CFU foram então tratados com o rolipram em um esquema profilático ou terapêutico, em combinação ou não com o antibiótico ceftriaxona. Foram realizadas contagens das células inflamatórias e bactérias recuperadas e ensaios *ex vivo* de fagocitose. O tratamento com rolipram durante a infecção por *S. pneumoniae* levou à diminuição do recrutamento de neutrófilos nos pulmões e vias respiratórias e reduziu a lesão pulmonar. A administração profilática de ROL também diminuiu os níveis das citocinas nas vias aéreas. Apesar da modulação da inflamação por ROL melhorar a pneumonia, a carga bacteriana nos pulmões não foi reduzida. Por outro lado, a antibióticoterapia reduziu o número de bactérias sem diminuir a infiltração de neutrófilos, os níveis das citocinas e a lesão pulmonar. O tratamento combinado de rolipram e ceftriaxona foi mais eficiente na redução da inflamação, aumentando a expressão da proteína pró-resolutiva anexina A1, e reduzindo o número de bactérias através do aumento da fagocitose. Ainda, camundongos deficientes em anexina A1 são mais susceptíveis à infecção pneumocócica. Estes dados mostram que os efeitos imunomoduladores dos inibidores de PDE4 são úteis durante pneumonia pneumocócica grave e sugerem o seu potencial como terapia adjuvante nesta infecção.

Palavras-chave: inflamação, *Streptococcus pneumoniae*, imunomodulação, PDE4

ABSTRACT:

Pneumococcal pneumonia is a leading cause of mortality worldwide. The inflammatory response to bacteria is necessary to control infection but the permanence and excessive activation of neutrophils in the lungs may cause tissue damage. Phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitors, such as rolipram (ROL), effectively reduce inflammation. This study examined the impact of rolipram in a model pneumococcal pneumonia in mice. Balb/C mice were infected intranasally with 10^3 - 10^6 CFU of *Streptococcus pneumoniae* and the kinetics of inflammation were evaluated. 10^4 - 10^4 CFU mice were then treated with ROL in a prophylactic or therapeutic schedule in combination or not with the antibiotic ceftriaxone. Inflammation and bacteria counts were assessed and *ex vivo* phagocytosis assays were performed. Rolipram treatment during *S. pneumoniae* infection decreased neutrophil recruitment into the lungs and airways and reduced lung injury. Prophylactic ROL treatment also decreased cytokine levels in the airways. Although modulation of inflammation by ROL ameliorated pneumonia, bacteria burden was not reduced. On the other hand, antibiotic therapy reduced bacteria without reducing neutrophil infiltration, cytokine levels and lung injury. Combined ROL and ceftriaxone treatment was more efficient in reducing inflammation, by increasing pro-resolving protein Annexin A1 expression, and reducing bacteria burden, by enhancing phagocytosis. Furthermore, annexin A1 deficient mice are more susceptible to pneumococcal pneumonia. These data show that immunomodulatory effects of PDE4 inhibitors are useful during severe pneumococcal pneumonia and suggest their potential benefit as adjunctive therapy during infectious diseases.

Keywords: inflammation, *Streptococcus pneumoniae*, immunomodulation, PDE4

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS:

ANOVA: análise de variância

AnxA1: Anexina A1

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

BALF: *Bronchoalveolar Lavage fluid*– fluido do lavado broncoalveolar

Balb/ C: linhagem de camundongos

BSA: *Bovine Serum Albumin* – soro albumina bovina

Cbps: proteínas ligantes de colina

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

CO₂: Dióxido de carbono

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

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

CFSE: carboxifluoresceína succinimidil éster

ChoP: fosforilcolina

CREB: elemento responsivo ao cAMP

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

DAMPs: padrões moleculares associados a dano

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

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPI: Doença pneumocócica invasiva

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

DTT: *dithiothreitol*

EDTA: *Ethylene Diamine Tetracetic acid* - ácido etilendiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPM: erro padrão da média

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

IAL: Instituto Adolfo Lutz

IL-(): interleucina-()

INF- γ : Interferon γ

IRF3/7: *Interferon regulatory factor 3/7*

LPA: lesão pulmonar aguda

LPS: Lipopolissacarídeo

KC: *Keratinocyte Chemokine*

kDa: quilo Dálton

M: molar

MCP-(): *Monocyte chemotactic protein-()*

mg: miligrama

mg/kg: miligramas por quilograma

mg/mL: miligramas por mililitro

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

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

Mock: grupo não infectado

MOI: multiplicidade de infecção

MPO: Mieloperoxidase

Mpb: Milhões de pares de bases

Nan (): Neuraminidase ()

NaCl: Cloreto de sódio

NaF: fluoreto de sódio

NaPO₄: Fosfato de sódio

NaVO₃: Vanadato de sódio

NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos

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

NLRP(): *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich-Repeat-containing protein ()*

NLRC4: *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich family CARD domain-containing protein 4*

nm: nanômetro

NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*

NP-40:

OD: *Optical Density* – densidade óptica

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPD: *o-phenylenediamine dihydrochloride*

PAC: Pneumonia Adquirida na Comunidade

PAFR: *Platelet Activating Factor Receptor* – Receptor do Fator de Ativação

Plaquetária

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

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

PCV: Vacina Conjugada de Polissacarídeos

PDE: Fosfodiesterase

pH: potencial hidrogeniônico

PKA: protein cinase A

Ply: pneumolisina

PMSF: *phenylmethanesulphonyl fluoride*

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

rRNA: RNA ribossomal

SIREVA: Sistema Regional de Vacinas

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo

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

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

TMB: tetrametilbenzidina

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

SUMÁRIO:

1- INTRODUÇÃO.....	16
1.1- <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>: ASPECTOS GERAIS	16
1.2- COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	17
1.3- EPIDEMIOLOGIA	19
1.4- RESPOSTA IMUNE INATA AO <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	21
1.5- VACINAS E TRATAMENTO	28
1.6- INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE-4 E SEU PAPEL ANTI-INFLAMATÓRIO	32
2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	34
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1- ANIMAIS	36
3.2 - <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	36
3.3- INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS	37
3.4 - DROGAS E ESQUEMAS DE TRATAMENTO.....	37
3.5- EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE	38
3.6 - CONTAGEM DE CÉLULAS/BACTÉRIAS E ENSAIOS	38
3.7- PROCESSAMENTO DOS PULMÕES PARA ENSAIOS DE DOSAGEM DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	39
3.8 - DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA	40
3.9 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANEXINA A1 POR WESTERN BLOT	41
3.10 - PADRONIZAÇÃO DO MODELO MURINO DE PNEUMONIA POR <i>S. PNEUMONIAE</i>	43
3.11 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ROLIPRAM NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESENCADEADA PELA INFECÇÃO	43

3.12- AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO DE ROLIPRAM E O ANTIMICROBIANO CEFTRIAXONA NA INFECÇÃO PULMONAR POR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	45
3.13 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
4- RESULTADOS	49
4.1- MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	49
4.2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM ROLIPRAM NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESENCADEADA POR <i>S. PNEUMONIAE</i>	57
4.3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO DE ROLIPRAM E CEFTRIAXONA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESENCADEADA POR <i>S. PNEUMONIAE</i>	62
5- DISCUSSÃO	70
6- CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Rotas de infecção para <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
Figura 2: Incidência de doenças pneumocócicas em crianças	20
Figura 3: Esquema da ativação dos diferentes PRRs durante a infecção.....	23
Figura 4: Curva de letalidade e perda de peso dos animais infectados com os inóculos 10^{6-3} CFU de <i>S. pneumoniae</i>	49
Figura 5: Cinética da resposta inflamatória desencadeada por <i>Streptococcus pneumoniae</i>	52
Figura 6: Contagem de bactérias do lavado broncoalveolar após diferentes tempos de infecção com inóculos de 10^5 , 10^4 , 10^3 CFU de <i>S. pneumoniae</i>	54
Figura 7: Níveis das citocinas pró-inflamatórias nas vias aéreas dos camundongos infectados com 10^4 CFU de <i>S. pneumoniae</i>	54
Figura 8: Análises histológicas dos pulmões de animais não infectados e infectados com 10^4 CFU de <i>S. pneumoniae</i> após 12, 24, 48, 72 e 96 horas de infecção.....	56
Figura 9: Números de células inflamatórias nos pulmões e vias aéreas dos camundongos infectados por <i>S. pneumoniae</i> tratados com rolipram ou o veículo da droga	58
Figura 10: Níveis de citocinas e quimiocinas nas vias aéreas de camundongos infectados por <i>S. pneumoniae</i> e tratados com rolipram ou o veículo da droga	59
Figura 11: Análises histológicas dos pulmões de animais infectados por <i>S. pneumoniae</i> e tratados com rolipram ou com o veículo da droga	60
Figura 12: Curvas de letalidade e contagens de bactéria das vias aéreas de camundongos infectados por <i>S. pneumoniae</i> e tratados com rolipram ou o veículo da droga	61
Figura 13: Contagem de bactérias e resposta inflamatória observada em camundongos infectados e tratados com rolipram, ceftriaxona ou ambas as drogas	64
Figura 14: Análises histológicas dos pulmões de animais infectados por <i>S. pneumoniae</i> e tratados com rolipram, ceftriaxona ou ambas as drogas.....	65
Figura 15: Curvas de letalidade dos animais infectados com 10^5 CFU de <i>S. pneumoniae</i> e tratados com rolipram, ceftriaxona ou ambas as drogas.....	65

Figura 16: Fotomicrografias e quantificação da fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por macrófagos recuperados de animais infectados e tratados com rolipram, ceftriaxona ou ambas as drogas	67
Figura 17: Expressão de Anexina A1 em extratos celulares de pulmões de animais infectados e tratados com rolipram, ceftriaxona ou ambas as drogas	69
Figura 18: Curvas de letalidade de camundongos deficientes em AnxA1 e selvagens infectados com <i>Streptococcus pneumoniae</i>	69

1 - Introdução

1.1 – *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*: ASPECTOS GERAIS

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*), também conhecido como pneumococo, é uma bactéria Gram-positiva de grande relevância médica, causando um número elevado de mortes e hospitalizações em todo o mundo. É o principal agente etiológico das chamadas pneumonias adquiridas na comunidade (PACs) e está entre as causas mais comuns do desenvolvimento de meningite bacteriana, sinusite, otite média, bronquite, conjuntivite e sepse (Song, Nahm e Moseley, 2013).

Morfológicamente, os *S. pneumoniae* são caracterizados como cocos lanceolados com diâmetro entre 0,5 e 1,2 μm e quando cultivados em meio de cultura líquido, crescem aos pares (diplococos) ou formando cadeias (Murray *et al.*, 2010). Durante o crescimento em ágar sangue formam colônias com um halo esverdeado resultante da sua capacidade de realizar a hemólise parcial do sangue produzindo bilirrubina e biliverdina (α hemólise). Além disso, as colônias dos pneumococos são morfológicamente arredondadas, lisas ou mucóides e transparentes ou opacas. Os diferentes morfotipos da bactéria estão associados à sua capacidade de variação de fase em diferentes sítios de colonização (nasofaringe, pulmão, sangue) e expressão da cápsula polissacarídica (Tuomanen, 1999).

Os polissacarídeos capsulares são o principal fator de virulência de *S. pneumoniae*, tendo funções de escape ao sistema imune como a inibição da fagocitose, impedimento da ligação de fragmentos do sistema do complemento e proteção contra armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Abeyta, Hardy e Yother, 2003; Wartha *et al.*, 2007; Hyams *et al.*, 2010). A composição dos polissacarídeos capsulares define os 93 sorotipos diferentes de pneumococos (Calix *et al.*, 2012) os quais são agrupados, a partir de suas características imunológicas, em 46 sorogrupos dentro dos quais alguns são mais relacionados às doenças invasivas (Hausdorff *et al.*, 2000). Os sorotipos 3, 19A e 19F, por exemplo, foram recentemente associados ao maior risco de desenvolvimento de insuficiência respiratória (Burgos *et al.*, 2014), sendo o sorotipo 3

também relacionado à maior incidência de choque séptico (Ahl *et al.*, 2013) e pneumonia pneumocócica necrotizante (Bender *et al.*, 2008).

A prevalência e distribuição geográfica dos sorotipos variam conforme as características da população, região geográfica e idade do hospedeiro (Musher, 1992; Scott *et al.*, 1996; Hausdorff, Feikin e Klugman, 2005). Estudos que documentem a prevalência dos sorotipos nas diferentes regiões geográficas são de grande importância, pois direcionam o uso das vacinas, as quais são baseadas nos polissacarídeos capsulares.

Além da cápsula, outros fatores de virulência também contribuem para a patogenicidade de *S. pneumoniae* tais como: pneumolisina (Ply), neuroaminidases (NanA, NanB e NanC), protease IgA1, proteína A de superfície pneumocócica (PspA), proteína C de superfície pneumocócica (PspC), antígeno A de superfície pneumocócica (PsaA), proteínas ligadoras de colina (Cbps) e pili (Mitchell e Mitchell, 2010). Tais fatores são importantes para a adesão à superfície celular e ao muco e também para a evasão aos sistemas de defesa do hospedeiro. Dessa forma, a resposta inflamatória desencadeada ao contrário de levar à proteção contra a infecção, pode gerar intenso dano tecidual e predispor à invasão dos pneumococos para outros órgãos (Feldman e Anderson, 2014).

1.2 – COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Apesar da sua reputação como patógeno, *Streptococcus pneumoniae* é componente comensal da microbiota do trato respiratório superior humano sendo principalmente encontrado na nasofaringe. A prevalência de colonização é maior em crianças que em adultos, atingindo taxas mais elevadas até os três anos de idade (Donkor, 2013). Além disso, a taxa de colonização também está relacionada ao índice de desenvolvimento de cada país. Em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos como a Gâmbia, a taxa de colonização nasofaríngea é bastante elevada entre as crianças mais jovens podendo atingir entre 60-80% (Donkor, 2013). Países desenvolvidos, em contrapartida, possuem uma prevalência mais baixa. Um estudo realizado na Inglaterra apontou uma colonização correspondente a 52% em crianças de até dois anos e 45% para a faixa etária entre três e quatro anos (Hussain *et al.*, 2005). No Brasil, a prevalência de colonização por pneumococos é mais semelhante aos países africanos

atingindo índices de 65% e 57,6% para crianças menores de cinco anos nas cidades de Salvador e Goiânia, respectivamente (Reis *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2010).

Crianças e idosos são particularmente susceptíveis à pneumonia por *S. pneumoniae*. A bactéria é adquirida pelo contato com gotículas de saliva ou secreção respiratória de pessoas portadoras da bactéria. A colonização nasofaríngea por pneumococos é precursora do desenvolvimento de pneumonia via aspiração da bactéria colonizadora para os pulmões, podendo então assumir caráter invasivo (Donkor, 2013). Ao atingir o epitélio do trato respiratório, *Streptococcus pneumoniae* se liga a carboidratos da superfície das células epiteliais (N-acetil-glicosamina) através de proteínas da superfície bacteriana, como a adesina da superfície de pneumococo A (PsaA). Além disso, a própria característica eletrostática e hidrofóbica da bactéria facilita a interação e aderência às células do hospedeiro (Bogaert, De Groot e Hermans, 2004).

Na maioria dos casos, a colonização por *Streptococcus pneumoniae* não é seguida de desenvolvimento de doença e invasividade. Para que haja essa conversão é necessário que haja produção local de moléculas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) resultante da própria colonização ou pela presença de outra infecção associada, como infecções pelo vírus Influenza A (Bogaert, De Groot e Hermans, 2004). Esses mediadores levam a um aumento no número de receptores nas células do epitélio respiratório e do endotélio, tais como o receptor do fator de ativação plaquetária (PAFR). Esse receptor possui alta afinidade pela fosforilcolina (ChoP) da parede celular dos pneumococos o que inicia a internalização da bactéria pelas células do hospedeiro em uma via dependente de β -arrestina (Radin *et al.*, 2005). Após a internalização e migração transcelular pelo epitélio respiratório e endotélio vascular a bactéria pode invadir outros tecidos e desencadear as chamadas doenças pneumocócicas invasivas (DPI) que podem levar o paciente ao óbito. Adicionalmente, proteínas de superfície bacteriana denominadas proteínas ligantes de colina A (CbpA) se ligam com afinidade aos ácidos siálicos imobilizados e lacto-N-neotetraose em células do hospedeiro ativadas por citocinas. Outro fator importante para a adesão bacteriana é a neuraminidase produzida pelas próprias bactérias. Essa enzima cliva glicolipídeos, glicoproteínas e oligossacarídeos, diminuindo a viscosidade do muco do trato respiratório e expondo receptores de N-acetil-glicosamina das células do

hospedeiro (Bogaert, De Groot e Hermans, 2004). Todo esse processo permite o estabelecimento e multiplicação da bactéria nos pulmões, desencadeamento de pneumonia e possível disseminação para outros tecidos.

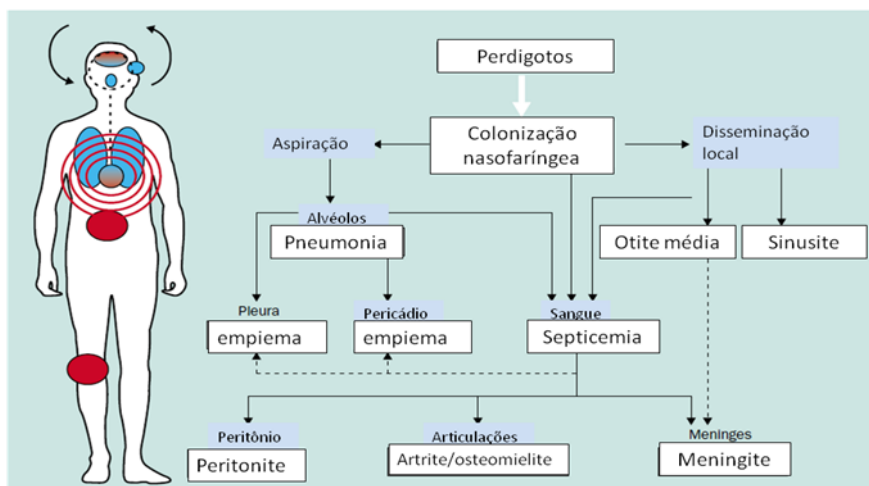


Figura 1- Rotas de infecção para *Streptococcus pneumoniae*. Órgãos infectados a partir do ambiente ou pela rota hematogênica estão representados, respectivamente, em azul e vermelho (adaptado de (Bogaert, De Groot e Hermans, 2004).

1.3 - EPIDEMIOLOGIA

Apesar dos avanços na abordagem diagnóstica e terapêutica (vacinas e antibióticos) *S. pneumoniae* permanece como importante causa de um elevado número de mortes e hospitalizações em todo mundo (Sharif *et al.*, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2008, 476.000 mortes de crianças abaixo de cinco anos de idade (HIV negativas) foram devidas às infecções por *Streptococcus pneumoniae* (OMS, 2008). É estimado que as meningites e pneumonias pneumocócicas graves são responsáveis por aproximadamente 1.612.000 mortes anualmente em todo o mundo, principalmente em crianças (Andrade *et al.*, 2012). De fato, a OMS aponta a pneumonia como maior causa de mortalidade infantil, levando a mais óbitos que os provocados pela AIDS, tuberculose e malária (UNICEF/OMS, 2006) sendo *S. pneumoniae* o principal agente etiológico isolado (Mortality e Causes of Death, 2015) (Figura 2).

Incidência de *S. pneumoniae* (por 100 000 crianças)

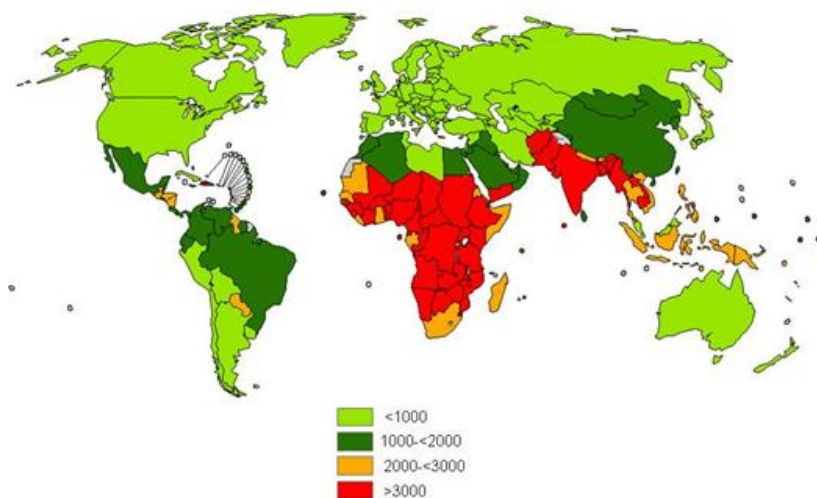


Figura 2 – Incidência de doenças pneumocócicas em crianças abaixo de cinco anos de idade no mundo (dados expressos por 100.000 crianças). (OMS, 2009)

No Brasil, as doenças do trato respiratório constituem a quinta causa de mortalidade, sendo a pneumonia, dentre estas, a causa mais frequente (Mortality e Causes of Death, 2015). A vigilância laboratorial do *Streptococcus pneumoniae* é realizada através do Instituto Adolfo Lutz (IAL), referência nacional do Sistema Regional de Vacinas (SIREVA) e patrocinado pela Organização Pan-Americana da Saúde e pelo Ministério da Saúde. A dificuldade de se obter um diagnóstico microbiológico exato nos casos de pneumonia, devido à contaminação do material por microrganismos da microbiota da nasofaringe ou antibioticoterapia empírica prévia, e a falta de estudos epidemiológicos baseados na população subestima o número de casos de pneumonia pneumocócica reportados no Brasil. No período de 2000 a 2008, o IAL analisou 4.376 cepas de *Streptococcus pneumoniae* isoladas do Brasil. Destas, a maioria (62%) foi isolada de pacientes com meningite, 28% de pacientes com pneumonia e 2% de pacientes com bacteremia. Dentre os sorotipos de pneumococos, os mais frequentemente identificados foram os seguintes: 14 (27,9%); 6B (9,7%); 19F (5,4%); 23F (5,4%); 18C (5,1%); 6A (4,3%); 1 (3,8%); 3 (4,5%); 5 (3,5%); 19A (3,3%); 9V (3,2%); 4 (2,8%); 7F (2,1%); e outros (19,1%) (Saúde, 2010).

Nesse mesmo período, ocorreram no país 7.129.291 internações por pneumonias, 45% destas foram crianças menores de cinco anos, resultando em uma frequência média

anual de 2100 internações por 100.000 habitantes (Saúde, 2010), o que está relacionado a um grande custo econômico em saúde para o país.

Estudos recentes realizados em Goiânia, Porto Alegre e Salvador, confirmam a grande incidência de doenças invasivas causadas por *S. pneumoniae*, bem como a alta taxa de colonização nasofaríngea (57-65%) em crianças abaixo de cinco anos de idade (Reis *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2012; Caierao *et al.*, 2014). Os estudos reafirmam os dados obtidos pelo Instituto Adolfo Lutz quanto à frequência dos sorotipos circulantes no país e ressaltam a importância médica e econômica da doença pneumocócica em países em desenvolvimento como o Brasil.

1.4 – RESPOSTA IMUNE INATA AO *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

A resposta imune engloba diversos mecanismos de defesa contra patógenos incluindo as barreiras físicas (pele, muco, pH, etc.), o sistema do complemento, as células fagocitárias, os anticorpos e as células T efectoras. A imunidade inata inclui respostas de defesa rápidas, não específicas que são críticas para a prevenção de infecções ou manutenção de um número relativamente baixo de patógenos até que a resposta imune adaptativa seja montada. Além disso, a resposta imune inata exerce um papel importante orquestrando o desenvolvimento da resposta adaptativa e, ambas são, na maioria das vezes, eficientes no controle e/ou erradicação do patógeno (Janeway *et al.* 2006).

Os macrófagos alveolares residentes são as primeiras células do sistema imune a encontrar e sinalizar a presença de *Streptococcus pneumoniae* no pulmão. O reconhecimento inicial é mediado por receptores denominados receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) presentes já na linhagem germinativa das células do sistema imune. Tais receptores reconhecem moléculas conservadas em diversos tipos de microrganismos ou “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMPs) bem como moléculas endógenas liberadas após dano tecidual (DAMPs - padrões moleculares associados ao dano) (Vance, Isberg e Portnoy, 2009). Após a ativação desses receptores ocorre um desencadeamento de cascatas de sinalização que levam à produção de mediadores inflamatórios que estimulam e ativam outras células - do sistema imune ou

não – resultando em recrutamento e ativação de leucócitos e montagem da resposta adaptativa contra a bactéria (Koppe, Suttorp e Opitz, 2012).

Os receptores do tipo Toll (TLRs) constituem uma classe de PRRs que reconhecem diversos componentes de *Streptococcus pneumoniae*. A ativação desses receptores ativa fatores de transcrição como NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) e/ou IRF (*Interferon regulatory fator*) 3/7 culminando com a transcrição de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6 e CXCL1/KC. Componentes da parede celular bacteriana, tais como o ácido lipoteicóico, peptidoglicano e as lipoproteínas, são reconhecidos pelo receptor do tipo Toll 2 (TLR2) (Schroder *et al.*, 2003; Tomlinson *et al.*, 2014). A sinalização via este receptor tem papel relevante durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae*, uma vez que polimorfismos no gene codificante de TLR2 estão associados à maior predisposição a desenvolvimento de doença invasiva pela bactéria (Telleria-Orrriols *et al.*, 2014). Além disso, ativação de TLR2 favorece a fagocitose e morte de *Streptococcus pneumoniae* pelos granulócitos (Letiembre *et al.*, 2005). Receptores TLR4, cujo ativador clássico é o LPS de bactérias Gram-negativas, são estimulados pela pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*. Essa enzima é um importante fator de virulência dos pneumococos, capaz de lisar as células pulmonares formando poros na membrana citoplasmática (Malley *et al.*, 2003; Mitchell e Mitchell, 2010). Outros receptores do tipo Toll, como o TLR9, também são importantes no reconhecimento de *Streptococcus pneumoniae*. Esses receptores se ligam a motivos CpG do DNA bacteriano desencadeando uma cascata de sinalização que é importante para controlar o número de bactérias no pulmão (Albiger *et al.*, 2007). Em suma, os TLRs possuem um papel importante e, parcialmente redundante, na resposta imune contra *S. pneumoniae*.

Além dos receptores do tipo Toll, outra família de receptores envolvidos no reconhecimento e sinalização da presença de *Streptococcus pneumoniae* é a dos receptores do tipo NOD (NLR). Essa família é composta por PRRs intracelulares que atuam no citosol reconhecendo componentes da parede celular dos pneumococos, como os peptidoglicanos que são reconhecidos por NOD1 e NOD2 (Sorbara e Philpott, 2011), e levam à expressão de genes pró-inflamatórios pela ativação de NF- κ B. Os receptores NLRP1, NLRP3 e NLRC4 formam complexos proteicos denominados inflamassomas responsáveis pela produção de IL-1 β , IL-18 e IL-33 por clivagem das

suas pró-formas inativas. O inflamassoma NLRP3 é ativado durante a infecção por *S. pneumoniae* pelo efluxo de íons K^+ resultante da formação de poros na membrana plasmática pela pneumolisina (Dos Santos, Kutuzov e Ridge, 2012). A resposta relacionada à ativação de NLRP3 é importante para o *clearance* bacteriano nos pulmões e está relacionada à proteção contra dano pulmonar e morte durante a pneumonia pneumocócica (Mcneela *et al.*, 2010; Witzenrath *et al.*, 2011).

A sinalização por PRRs culmina com a produção de grande concentração de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de fagócitos como neutrófilos e macrófagos, bem como a produção de agentes microbicidas como as espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos (Figura 4). Esses mecanismos levam à erradicação do patógeno tanto por fagocitose ou por morte extracelular. Dentre as citocinas secretadas, destaca-se a produção de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IFN-\gamma$, $CXCL1/KC$ e $CCL2/MCP-1$.

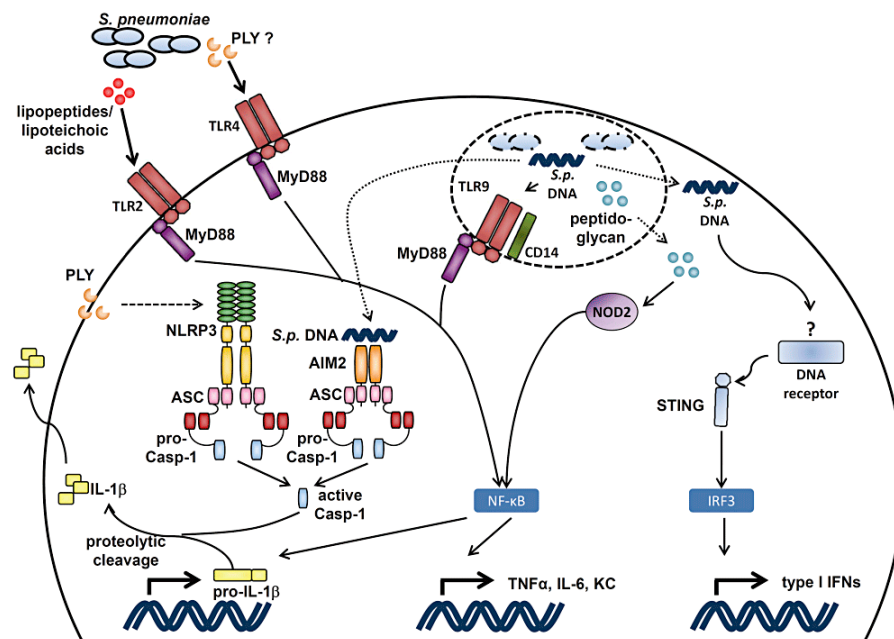


Figura 3 – Representação esquemática da ativação dos diferentes PRRs durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae*. (Koppe, Suttorp e Opitz, 2012)

Os principais produtores de $TNF-\alpha$ e iniciadores da resposta imune inata contra *Streptococcus pneumoniae* são os macrófagos alveolares (Kirby, Raynes e Kaye, 2005). Em seguida, os neutrófilos assumem o papel principal na fagocitose e morte da bactéria nos pulmões, auxiliando os macrófagos alveolares residentes e inflamatórios que foram

recrutados (Calbo e Garau, 2010). Os neutrófilos são as células polimorfonucleares predominantes durante a pneumonia estabelecida. São importantes no controle da multiplicação bacteriana no pulmão produzindo proteases como a catepsina G e elastase, e espécies reativas de oxigênio que são importantes para a morte da bactéria no meio extracelular (Hahn *et al.*, 2011). Além disso, os neutrófilos podem produzir armadilhas extracelulares (NETs), às quais a bactéria se prende facilitando a ação das moléculas antimicrobianas produzidas por essas células (Brinkmann *et al.*, 2004).

O sistema do complemento também tem importante função de defesa contra os pneumococos. Esse sistema compreende proteínas que quando ativadas desencadeiam uma cascata de sinalização que contribuem para a opsonização e lise do microrganismo bem como promovem a inflamação (Janeway *et al.* 2006). Durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae*, a via clássica de ativação do sistema do complemento é a predominante contribuindo para a eliminação da bactéria no pulmão (Brown *et al.*, 2002). Além de anticorpos naturais IgM, proteínas de fase aguda como a proteína C reativa e a própria ligação direta de C1q levam a ativação dessa via. A cápsula polissacarídica e proteínas bacterianas como a PhpA limitam a deposição de C3 na superfície do *S. pneumoniae* facilitando sua evasão à fagocitose pelas células do sistema imune (Angel, Ruzek e Hostetter, 1994; Abeyta, Hardy e Yother, 2003).

A resposta de defesa contra *Streptococcus pneumoniae* envolve diversos componentes do sistema imune que se somam para uma eficiente erradicação da bactéria dos pulmões. Entretanto, a ativação exagerada da resposta imune também é associada a um intenso dano pulmonar durante a infecção (Steel *et al.*, 2013). Neste sentido, bloqueio de uma inflamação excessiva pode resultar em menor dano pulmonar, mas ainda mantendo ações anti-infecciosas do sistema imune. Acredita-se que o estudo das interações bactéria-hospedeiro possa ser útil para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento baseadas na diminuição da resposta inflamatória excessiva das doenças pneumocócicas (Steel *et al.*, 2013).

1.4.1- O PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA PNEUMONIA PNEUMOCÓCICA

A pneumonia é uma doença inflamatória definida como uma infecção aguda do trato respiratório inferior, especificamente os pulmões, que pode ser causada por uma

grande variedade de patógenos (Ottosen e Evans, 2014). As manifestações patológicas associadas à pneumonia dependem principalmente do organismo causador, da idade e da resposta imune do hospedeiro (Driver, 2012).

A chamada pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é definida como uma inflamação aguda do parênquima pulmonar de origem infecciosa e que acomete o paciente fora do ambiente hospitalar ou nas primeiras 48 horas após admissão em hospital (Watkins e Lemonovich, 2011). Os principais sintomas relacionados à pneumonia são respiratórios agudos como tosse seca ou produtiva, dor torácica e dispnéia e sinais sistêmicos como calafrios, febre, confusão mental e mialgia. O principal agente etiológico das PACs é *Streptococcus pneumoniae* o qual é isolado em aproximadamente 48% dos casos, seguido das viroses, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, entre outros (Musher e Thorner, 2014). Além dos sintomas supracitados, a pneumonia pneumocócica é caracterizada radiologicamente por consolidação lobar completa que envolve um segmento ou lobo pulmonar com efusão parapneumônica ativa (Vilar *et al.*, 2004).

Os pulmões são órgãos compostos por milhares de brônquios que se subdividem em ramificações menores – os bronquíolos e estes terminam em pequenos sacos denominados alvéolos. Os alvéolos são irrigados por numerosos capilares onde ocorre a troca gasosa: o oxigênio é captado pelo sangue e o gás carbônico é removido. Para atingir os alvéolos pulmonares o agente infeccioso deve ser capaz de evadir as diversas barreiras físicas do hospedeiro (batimento ciliar, muco). Nos pulmões, o microrganismo é fagocitado por macrófagos que iniciam uma intensa resposta inflamatória levando a um grande exsudado fibrinoso que ocupa os espaços alveolares, diminuindo a superfície disponível para a troca de gases. Além disso, há um grande influxo de neutrófilos e consequente dano tecidual, o que limita a expansão normal do pulmão (Driver, 2012).

Nesse sentido, a resposta inflamatória desencadeada pela infecção está associada aos casos mais graves e complicações da pneumonia (Koegelenberg, Diacon e Bolliger, 2008) e, no caso de infecções por *Streptococcus pneumoniae*, tem papel importante na determinação do caráter invasivo da bactéria (Bogaert, De Groot e Hermans, 2004).

As citocinas TNF- α e IL-6, em particular, são importantes para orquestrar a resposta imune eficaz para a eliminação da bactéria e retorno às condições normais do tecido. Reporta-se que pacientes em uso de terapia com anticorpos anti-TNF- α possuem

maior risco de infecções oportunistas, bem como doença invasiva pneumocócica (Calbo e Garau, 2010). No entanto, alguns estudos apontam que TNF- α produzido exageradamente durante a pneumonia pneumocócica contribui para o dano tecidual, através da ativação excessiva de neutrófilos, e aumenta o número de receptores implicados no favorecimento da invasividade da bactéria para outros tecidos, como o PAFR (Cundell *et al.*, 1995; Radin *et al.*, 2005). Em reforço à hipótese que TNF- α pode contribuir para o dano tecidual, indivíduos com níveis aumentados de TNF- α e IL-6 são mais susceptíveis ao desenvolvimento de pneumonia adquirida na comunidade grave que aqueles com níveis mais baixos dessas citocinas (Yende *et al.*, 2005). A produção da citocina IL-1 β também possui papel dual durante a pneumonia pneumocócica. Juntamente com TNF- α , IL-1 β estimula a produção de CXCL-8 levando ao recrutamento de neutrófilos capazes de realizar o *clearance* bacteriano nos pulmões (Rijneveld *et al.*, 2001). Entretanto, durante pneumonias graves, uma produção excessiva de IL-1 β pode facilitar a disseminação da bactéria uma vez que altera a permeabilidade da mucosa pulmonar e leva a intenso dano tecidual resultante do massivo recrutamento e ativação de neutrófilos (Marriott *et al.*, 2012). Alguns autores sugerem ainda que a resposta inflamatória desencadeada por *S. pneumoniae* pode favorecer a sua transmissão devido ao aumento de secreções durante a inflamação (Kadioglu *et al.*, 2008).

A pneumonia desencadeada por *S. pneumoniae* é caracterizada, dentre outros, pela presença de níveis elevados de citocinas nos pulmões, bem como pelo intenso infiltrado de neutrófilos nos pulmões e espaços alveolares (Bhowmick *et al.*, 2013). A permanência e ativação excessiva dessas células no tecido exacerbam a inflamação através da liberação desregulada de proteases, NETs, espécies reativas de oxigênio e mediadores pró-inflamatórios (Steel *et al.*, 2013). Como consequência, ocorre grande lesão pulmonar relacionada à infecção por *S. pneumoniae* e, por isso, o intenso processo inflamatório desencadeado é associado aos casos mais graves de pneumonia pneumocócica (Driver, 2012). De fato, alguns autores citam que a resposta inflamatória exacerbada durante a pneumonia é uma causa muito comum de lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Poe *et al.*, 2013). Em suma, apesar do papel no controle da infecção, todo o processo de reconhecimento e

montagem da resposta inflamatória deve ser balanceado de forma que ocorra *clearance* bacteriano suficiente e dano pulmonar limitado (Driver, 2012).

Nesse contexto, a inflamação deve ser uma resposta autolimitada, restrita a erradicação do patógeno para que ocorra a resolução do processo inflamatório e retorno à homeostase tecidual. A resolução da inflamação é um processo ativo em que a produção de mediadores pró-resolutivos endógenos lipídicos e protéicos leva a: 1) apoptose dos neutrófilos, 2) reprogramação dos macrófagos para fenótipo pró-resolutivo, 3) eferocitose das células apoptóticas, 4) *clearance* das bactérias e debris celulares e 4) por fim, restauração da função fisiológica do tecido (Gobbetti *et al.*, 2014)

A Anexina A1 (AnxA1) é uma proteína endógena pró-resolutiva regulada por glicocorticóide que possui ações antiinflamatórias e de proteção tecidual, levando a um processo resolutivo eficiente (D'amico *et al.*, 2000; Vago *et al.*, 2012). Além disso, a presença da AnxA1 já foi demonstrada como importante para resposta contra *Mycobacterium tuberculosis* (Vanessa *et al.*, 2014) e capaz de proteger animais durante a sepse (Gobbetti *et al.*, 2014). Dessa forma, a importância da expressão e ação pró-resolutiva de proteínas como AnxA1 durante as infecções está sendo cada vez melhor investigada. Durante a pneumonia, falhas no processo de resolução associada a uma resposta inflamatória exagerada e persistente resultam em piora do quadro e até mesmo óbito.

Estratégias farmacológicas que busquem modular o processo inflamatório desencadeado durante a infecções pulmonares podem diminuir a morbidade e a mortalidade associadas à pneumonia. Dados de estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (Imunofarmacologia) apontam que a redução do infiltrado neutrofílico durante a infecção pelo vírus Influenza A WSN/33 H1N1 através do bloqueio do receptor do mediador inflamatório PAF (Fator de Ativação Plaquetária) (Sousa *et al.*, 2010) ou através da diminuição dos níveis da anafilatoxina C5a (Garcia *et al.*, 2013) confere proteção contra a letalidade causada pelo vírus. Assim, a redução de alguns parâmetros inflamatórios como o infiltrado neutrofílico durante o desenvolvimento da gripe foi descrita como possível alvo terapêutico. De forma similar, a modulação da resposta inflamatória no contexto de uma infecção pulmonar bacteriana pode levar a uma proteção semelhante. (Burns, Abadi e Pirofski, 2005; Marks *et al.*, 2007; Poe *et al.*, 2013; Bou Ghanem *et al.*, 2015).

1.5 – VACINAS E TRATAMENTO

1.5.1 – Vacinas

Os estudos para o desenvolvimento de vacinas contra *Streptococcus pneumoniae* iniciaram em 1911, logo após a identificação e descrição da bactéria (Austrian, 1999). Com o advento dos antibióticos em 1940, a necessidade de obtenção de uma vacina deixou de ser prioridade. Somente em 1960 os estudos foram retomados e em 1977, foi liberado o uso da primeira vacina anti-pneumocócica nos Estados Unidos (Austrian, 1999). Atualmente, as vacinas anti-pneumocócicas disponíveis são baseadas nos polissacarídeos capsulares que podem estar conjugados ou não a uma proteína carreadora imunogênica. A presença de mais de 90 sorotipos diferentes da bactéria torna impossível a formulação de uma vacina polissacarídica que ofereça cobertura para todos os sorotipos de pneumococos. Dessa forma, a definição de programas de vacinação deve levar em consideração a distribuição geográfica e prevalência dos sorotipos.

A vacina Pneumovax®23 (Merck) é, atualmente, a vacina antipneumocócica com maior cobertura compreendendo polissacarídeos de 23 sorotipos diferentes (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F). Esta vacina não é uma vacina conjugada e é indicada apenas para adultos acima de 65 anos ou grupos com alto risco de infecção (pacientes com doenças pulmonares e cardíacas, HIV positivos, etc) (Pittet e Posfay-Barbe, 2012). O uso da Pneumovax®23 em crianças fica limitado, pois os polissacarídeos são antígenos T independentes, ou seja, ativam diretamente as células B induzindo a produção de anticorpos. Como consequência, são produzidos principalmente anticorpos do tipo IgM, de menor afinidade (Baker, 1992). Por essa razão as vacinas baseadas em polissacarídeos livres são pouco imunogênicas para bebês e crianças de até 2 anos de idade.

Já a vacina polissacarídica conjugada heptavalente PCV (PCV7, Prevnar® - Pfizer) é capaz de desencadear uma produção satisfatória de anticorpos específicos em crianças contra sete sorotipos distintos de *S. pneumoniae* e foi responsável pela enorme queda nas taxas de infecção causada pelo pneumococo em países que aderiram à vacinação universal (Poehling *et al.*, 2006). Esta vacina é conjugada a uma proteína

carreadora (CRM197TM) que é um mutante da toxina diftérica e tem cobertura para os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F (Moffitt e Malley, 2011).

Outras vacinas polissacarídicas conjugadas com maior cobertura de sorotipos também são comercializadas. A vacina conjugada deca valente (PCV10) e a trideca valente (PCV13) cobrem 10 e 13 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*, respectivamente. A primeira é conjugada com a proteína D de *Haemophilus influenzae* para oito de seus sorotipos e carreadores de toxóide diftérico e de toxóide tetânico usados por dois sorotipos. A PCV13 utiliza a proteína da toxina diftérica mutada, de forma semelhante à PCV7 (Farkouh *et al.*, 2012). Desde 2007, a Organização Mundial de Saúde recomenda que todos os países incorporem as PCVs nos programas nacionais de imunização infantil (Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper, 2007).

No Brasil, as vacinas PCV7 e Pneumo23 fazem parte da lista de vacinas preconizadas pelo Ministério da Saúde e estão disponíveis, desde a década de 1990, para grupos populacionais especialmente susceptíveis ao *Streptococcus pneumoniae*. Em 2010, a vacina PCV10 foi incorporada no Calendário Básico de Vacinação da Criança, visando imunizar crianças a partir dos dois meses de idade, e é disponibilizada na rotina de vacinação em todo o país (Saúde, 2010). De fato, um estudo realizado com crianças brasileiras que receberam a vacina PCV10 confirma a proteção contra doença pneumocócica invasiva causada pelos sorotipos presentes na sua formulação (Domingues *et al.*, 2014).

Apesar do grande sucesso das vacinas, muitos países em desenvolvimento ainda não oferecem a vacinação a toda população devido ao alto custo e complexidade para a fabricação (Pittet e Posfay-Barbe, 2012). Além disso, em países onde foi realizado um amplo programa de vacinação está sendo observada uma mudança no perfil de prevalência dos sorotipos de *S. pneumoniae* e um aumento no número de casos de infecção com sorotipos não incluídos na vacina. No Brasil, a cobertura da vacina PCV7 que atingia 72,1% no início da introdução da vacinação, caiu para 57,9% (Mantese *et al.*, 2003). Dessa forma, estratégias alternativas para o desenvolvimento de vacinas ainda são necessárias (Malley, 2010).

1.5.2 – Tratamento

A identificação do patógeno causador da pneumonia adquirida na comunidade (PAC) nem sempre é possível por causa da dificuldade em recolher exsudado pulmonar do paciente para as análises bacteriológicas. Além disso, a contaminação das amostras com microrganismos membros da microbiota do trato respiratório superior torna esse processo ainda mais complicado. Sendo assim, a maior parte dos pacientes apresentando pneumonia lobar, recebe antibioticoterapia realizada de maneira empírica de forma a reduzir o risco de óbito (Harris *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2012; Esposito e Principi, 2013).

Segundo as diretrizes brasileiras para tratamento da pneumonia adquirida na comunidade, após o diagnóstico os pacientes devem ser avaliados quanto à gravidade do quadro, o que orientará a escolha e a via de administração do tratamento e a intensidade da investigação etiológica. Nesse sentido, escores de gravidade podem ser usados para identificação de pacientes de baixo risco, os quais são direcionados ao tratamento ambulatorial (Arnold *et al.*, 2003). Os índices e escores para avaliação da gravidade da PAC levam em consideração variáveis relacionadas à pior evolução da doença. Dentre as principais variáveis se destacam a idade do paciente, informações socioeconômicas, sintomas respiratórios agudos (frequência respiratória alterada, tosse, dispneia, etc.) e presença de doenças crônicas associadas (insuficiência cardíaca, COPD, etc.) (Corrêa *et al.* 2009)

As recomendações para o tratamento de pneumonias adquiridas na comunidade causadas por *S. pneumoniae* são concentradas na erradicação da bactéria. Nos casos menos graves, nos quais o paciente não necessita de internação, é sugerido o tratamento com utilização de β -lactâmicos de administração oral (Esposito e Principi, 2013). A pacientes apresentando comorbidades e/ou que fizeram uso de antibiótico recentemente recomenda-se o tratamento com a combinação de um β -lactâmico e um macrolídeo ou, alternativamente, fluoroquinolona (Mandell *et al.*, 2007). A administração parenteral de ampicilina, penicilina G ou algum representante da terceira geração de cefalosporinas (cefotaxina ou ceftriaxona) é indicado para pacientes hospitalizados apresentando um quadro grave de pneumonia ou suas complicações (Esposito *et al.*, 2012). As doses administradas e a duração do tratamento com cada fármaco, em cada caso, dependem da

possibilidade de resistência da cepa de *S. pneumoniae* envolvida e quadro clínico do paciente.

A prevalência de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes aos antibióticos tem aumentado em todo o mundo desde 1967, quando foram primeiramente isolados pneumococos resistentes à penicilina e tetraciclina (Fuller, McGeer e Low, 2005). Atualmente, cepas resistentes à penicilina, macrolídeos e fluoroquinolonas têm sido isoladas de forma cada vez mais frequente e representam, em alguns países, 15% das cepas de pneumococos isoladas (Fuller, McGeer e Low, 2005). Os baixos índices de vacinação, uso aumentado de antibióticos e a superlotação em creches e institutos são possíveis fatores que justificam esse aumento (De Lencastre *et al.*, 1999; Dagan *et al.*, 2008; Song, Nahm e Moseley, 2013). No Brasil, um estudo realizado pelo Programa de Vigilância Epidemiológica Nacional no período entre 1993 e 2004 relatou aumento no número de isolados de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina. Foram avaliadas 6.470 amostras clínicas positivas para pneumococos (pneumonias, meningites e bacteremia) e um aumento de 10,2% para 27,9% de cepas resistentes para penicilina foi observado (Brandileone *et al.*, 2006).

Além disso, o uso de antibióticos durante infecções graves por *Streptococcus pneumoniae* pode levar a um agravamento da resposta inflamatória desencadeada uma vez que ocorre liberação maciça de componentes da parede celular, DNA e toxinas. A hiperestimulação do sistema imune leva a intenso dano ao epitélio pulmonar e pode favorecer a disseminação dos pneumococos para a corrente sanguínea (Steel *et al.*, 2013) o que pode explicar a grande mortalidade dos pacientes, mesmo quando a antibioticoterapia é iniciada. Nesse sentido, diversos estudos apontam o uso de estratégias antiinflamatórias associadas ao uso de antibióticos para melhor tratamento e recuperação do paciente durante pneumonia pneumocócica grave (Feldman e Anderson, 2009; Martin-Loeches *et al.*, 2010; Corrales-Medina e Musher, 2011; Feldman e Anderson, 2011). Entre elas, o uso de estatinas (Doshi *et al.*, 2013), vitamina D (Olliver *et al.*, 2013) e corticosteróides (Confalonieri *et al.*, 2005). Sendo assim, o estudo dos mecanismos envolvidos na infecção e doença causada pelo *S. pneumoniae*, além da melhor compreensão da resposta inflamatória do hospedeiro é de grande importância.

1.6 – INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE-4 E SEU PAPEL ANTIINFLAMATÓRIO

Os nucleotídeos cíclicos tais como a adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e a guanosina monofosfato cíclica (cGMP), são segundo mensageiros intracelulares que possuem um papel essencial em diversas funções biológicas, dentre as quais o controle da frequência cardíaca, relaxamento do músculo liso, processos cognitivos, apoptose e até mesmo as respostas inflamatórias (Torphy, 1998). A eficiente integração e transdução de sinais dentro das células permitem que os diversos processos e respostas sejam eficientemente executados e controlados. Nesse sentido, os níveis dos mensageiros intracelulares devem ser finamente regulados temporal e espacialmente. Os reguladores centrais dos níveis dos nucleotídeos cíclicos na célula são as enzimas chamadas fosfodiesterases (PDEs). As PDEs formam uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise e subsequente inativação dos nucleotídeos cíclicos. São organizadas em pelo menos 11 famílias e 21 isoformas, agrupadas por similaridade na sequência, seletividade do inibidor, distribuição celular e tecidual, regulação por cinases e outras características bioquímicas (Houslay, 2010).

Dentre as fosfodiesterases, as PDE4s são um grupo de isoenzimas que seletivamente hidrolisam o cAMP para sua forma inativa, AMP. São expressas predominantemente em células do sistema imune como linfócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos, mas, também podem ser detectadas em células epiteliais, endotélio vascular, condrócitos e células do músculo liso. A expressão das PDE4s é positivamente regulada durante a inflamação (Chiang *et al.*, 2012; Jin, Ding e Lin, 2012), o que resulta em níveis diminuídos de cAMP nas células inflamatórias. Nesse sentido, a inibição da PDE4 foi extensamente estudada e comprovada como uma interessante estratégia antiinflamatória. Os inibidores de PDE4 levam ao acúmulo intracelular do segundo mensageiro cAMP, o que resulta na ativação subsequente da proteína cinase A (PKA) e fosforilação do fator de transcrição CREB (elemento modulador de resposta ao cAMP). Essa via de sinalização modula a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , resultando na supressão de tais genes (Manning *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2013). Além disso, o aumento do cAMP em neutrófilos e eosinófilos pode levar à indução da apoptose e bloqueio de vias de sinalização que levam à sobrevivência celular, diminuição da liberação de mediadores

lipídicos pró-inflamatórios, quimioatraentes e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Sousa *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010; Jin, Ding e Lin, 2012).

O uso de inibidores seletivos de fosfodiesterase-4 no tratamento de doenças de caráter predominantemente inflamatório como Alzheimer, psoríase, artrite, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma tem sido vastamente estudado (Garcia-Osta *et al.*, 2012; Schafer e Day, 2013; Wittmann e Helliwell, 2013). Atualmente, um inibidor seletivo de PDE4, o roflumilaste, já foi aprovado para o tratamento de DPOC por diversos países (Diamant e Spina, 2011; Rabe, 2011; Sezgi e Senyigit, 2011), inclusive o Brasil (ANVISA, 2011).

Rolipram é um inibidor seletivo de PDE4 que possui eficiente efeito antiinflamatório (Spina, 2004). Entretanto, sua aplicação terapêutica é limitada, pois seu uso está associado a efeitos adversos como náuseas, vômitos e diarreia (Kumar *et al.*, 2013). Apesar disso, rolipram é uma ferramenta poderosa no estudo da inibição da PDE4 e sua aplicação pode ajudar a compreender os efeitos benéficos que os níveis aumentados de cAMP podem trazer no contexto de uma doença relacionada à inflamação exacerbada, como a pneumonia.

Como discutido anteriormente, durante a pneumonia pneumocócica a resposta inflamatória tem papel dual sendo importante para a defesa contra a bactéria e ao mesmo tempo podendo levar a lesão tecidual e até mesmo a morte do hospedeiro. Dessa forma, estratégias imunomodulatórias durante a pneumonia por *S. pneumoniae* são sugeridas como benéficas, principalmente em associação ao uso de antibióticos (Steel *et al.*, 2013). O tratamento com inibidores de PDE4 leva a proteção tecidual em diversos tipos de modelos de lesão (Hamamoto *et al.*, 2004; Subbian *et al.*, 2011; Mammadov *et al.*, 2012), mas o papel da inibição de PDE4 durante as infecções é pouco explorado e controverso (Soares *et al.*, 2003; Erdogan *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2011). Dessa maneira, a hipótese a ser estudada no presente trabalho é que a inibição de PDE4 durante a pneumonia pneumocócica pode ser benéfica para o hospedeiro.

2 – Justificativa e Objetivos

Apesar dos grandes esforços voltados para a prevenção e tratamento da infecção por *Streptococcus pneumoniae*, a pneumonia ainda é a causa principal da mortalidade infantil e hospitalização de adultos, principalmente em países em desenvolvimento (Zar *et al.*, 2013). Além disso, o uso contínuo de antibióticos pode selecionar cepas resistentes além de agravar a inflamação desencadeada pela infecção. Dessa forma, terapias utilizadas em combinação com antibióticos para a prevenção do dano tecidual consequente de uma pneumonia pneumocócica são estratégias interessantes que podem levar à menor morbidade e mortalidade associadas à pneumonia.

A hipótese a ser estudada no presente trabalho é de que a modulação da resposta inflamatória, através da inibição de fosfodiesterase-4, pode contribuir para a diminuição da morbidade associada à infecção por *Streptococcus pneumoniae*.

2.1- OBJETIVO GERAL:

Estudar a resposta inflamatória causada pela infecção pulmonar por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos bem como o efeito do tratamento isolado com um inibidor específico de fosfodiesterase-4 (rolipram) ou em combinação com um antimicrobiano no decurso da infecção.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Padronizar o modelo de infecção pela cepa ATCC 6303 da bactéria *Streptococcus pneumoniae* em camundongos Balb/C
 - a. Avaliar os parâmetros inflamatórios induzidos pela infecção com os inóculos de 10^{3-5} CFU em diferentes tempos após a infecção;
 - b. Observar a relação entre a letalidade e a resposta inflamatória, desencadeadas pela infecção.

2- Avaliar o efeito da administração do inibidor de PDE4 rolipram no curso da infecção por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos Balb/C sobre:

- a.** a letalidade induzida pela infecção com o inóculo de 10^4 CFU da bactéria *S. pneumoniae* ATCC 6303;
- b.** a resposta inflamatória desencadeada pela infecção;
- c.** o *clearance* bacteriano;
- d.** a lesão pulmonar induzida pela infecção.

3- Estudar o efeito do tratamento combinado de rolipram com o antibiótico ceftriaxona no curso de uma infecção grave por *Streptococcus pneumoniae* sobre:

- a.** os diversos parâmetros inflamatórios;
- b.** o *clearance* bacteriano;
- c.** a capacidade fagocítica dos macrófagos;
- d.** o dano pulmonar consequente da infecção;
- e.** a expressão da proteína pró-resolutiva Anexina A1.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – ANIMAIS

Os experimentos com animais foram realizados em camundongos Balb/C machos (deficientes ou não para o gene codificante da Anexina A1) de 8 a 12 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG e mantidos em condições de temperatura e luz controladas, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos descritos neste projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo CETEA/UFMG número: 219/2014).

Os animais infectados foram mantidos em gaiolas microisoladoras, em estantes para animais com filtros de entrada e saída de ar. A letalidade e perda de peso foram acompanhadas diariamente por 10 dias.

3.2 – *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

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

O cultivo das bactérias foi realizado em caldo de cultura Todd Hewitt acrescido de 0.5% de extrato de levedura (THY) e Ágar Sangue (THY acrescido de 5% de sangue). No dia anterior à infecção, as bactérias foram plaqueadas e incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO₂, por 15 horas. Em seguida, as bactérias foram transferidas para 10 mL de caldo de cultura e incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO₂ até que fosse atingida 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 ressuscitado em 1 mL de salina estéril e a partir dessa suspensão de bactérias, diluições em salina estéril foram realizadas, de forma que 40uL de solução contivesse os inóculos de 10⁶-10³ CFU. Os animais foram injetados intranasalmente (i.n.) após devidamente anestesiados. Em todos os experimentos o inóculo foi

confirmado através do plaqueamento da suspensão de bactérias em diferentes diluições e contagem das colônias após 15 horas de incubação a 37°C em atmosfera rica em CO₂.

3.3 – INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS

A via de infecção utilizada foi a intranasal. Para tanto, os camundongos foram anestesiados por via subcutânea com uma solução contendo 60 mg/kg de cetamina e 4mg/kg de xilazina. Após a anestesia, os animais receberam 40 µL do inóculo da bactéria, ou apenas salina estéril nos grupos não infectados (Mock). Todo o procedimento de infecção foi realizado no fluxo laminar. Utilizando uma ponteira estéril, a solução contendo a bactéria foi gotejada lentamente nas narinas dos animais, de maneira que aspirassem todo o volume correspondente ao inóculo de bactérias. Todos os animais foram monitorados até que se recuperassem da sedação causada pelo anestésico.

3.4 – DROGAS E ESQUEMAS DE TRATAMENTO

Para a avaliação do efeito do inibidor específico de fosfodiesterase 4 (PDE4), rolipram (4-(3-(Cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)pyrrolidin-2-one – Enzo Life Sciences®) durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae*, os camundongos foram tratados uma hora antes da infecção com 6 mg/kg da droga via intraperitoneal ou com o veículo, 200µL de PBS/DMSO (2%). Os animais foram eutanasiados após 24 horas de infecção. Para os experimentos de letalidade os animais receberam, além do pré-tratamento, doses de reforço a cada 12 horas por 5 dias.

Para os experimentos de avaliação do efeito do tratamento combinado, os camundongos foram tratados duas vezes com o antimicrobiano Ceftriaxona Sódica (Eurofarma – 10mg/kg), rolipram (6 mg/kg) ou as duas drogas após 60 e 72 horas da infecção. Os animais foram eutanasiados após 84 horas da infecção para coleta do lavado broncoalveolar e pulmões. O antimicrobiano ceftriaxona, comumente utilizado na clínica no tratamento de infecções graves por *S. pneumoniae*, foi adquirido em estabelecimento comercial (Ceftriaxona Sódica – Eurofarma®). É uma cefalosporina de 3ª geração que atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana, e dessa forma leva a

morte das bactérias (Murray, 2010). O fármaco foi diluído em salina para injeção e administrado via intraperitoneal em um volume total de 200 μ L.

3.5 - EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Para todos os experimentos (com exceção dos experimentos de letalidade), os animais foram eutanasiados com uma dose letal do anestésico composto por uma solução de 150mg/kg de cetamina e 10mg/kg de xilazina. Após a morte, os animais foram submetidos à exposição da traquéia para a realização do lavado broncoalveolar (BAL), para recolher os leucócitos e bactérias do espaço alveolar. O lavado consiste na introdução, através de uma cânula de 1.7 mm conectada a uma seringa, de 1 mL de PBS no pulmão, sendo que esse volume é recolhido e reintroduzido 3 vezes. Para a obtenção de uma quantidade satisfatória de células, o lavado é realizado duas vezes, totalizando 2 mL de PBS. O volume total recuperado foi medido para posterior correção na contagem bacteriana. Após a realização do BAL, os animais tiveram os seus pulmões coletados e divididos em duas porções: o pulmão esquerdo foi processado para as análises histológicas; e o pulmão direito foi retirado para o ensaio de MPO (atividade da mieloperoxidase) e western blot. O lavado broncoalveolar foi utilizado para contagem ou cultura de células, dosagem de citocinas e contagem de bactérias.

3.6 – CONTAGEM DE CÉLULAS/BACTÉRIAS E ENSAIOS

3.6.1 - Contagem de bactérias no lavado broncoalveolar

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

3.6.2 - Contagem total e diferencial de células

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

3.7 – PROCESSAMENTO DOS PULMÕES PARA ENSAIOS DE DOSAGEM DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Cinquenta miligramas do pulmão direito dos camundongos foram homogeneizados em 0.95 mL do Tampão 1 pH 4.7 (0.1 M de NaCl, 0.02 M de NaPO₄, 0.015 M de NaEDTA) utilizando para tanto um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Após centrifugação por 10 minutos, a 4°C a 10000 RPM, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi submetido à lise de hemácias através da adição de 0,75 mL de NaCl 0.2%, seguida de 0.75 mL de uma solução de NaCl 1.6% com glicose 5%. A solução final foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos, a 4°C a 10000 RPM. O sobrenadante foi novamente desprezado e foram adicionados 800 µL de Tampão 2 (0.05 M de Na₃PO₄ e 0.5% de HETAB em pH 5.4) para o ensaio de MPO. Após novamente homogeneizada, a amostra foi congelada em freezer -20°C para posterior realização de ensaio enzimático.

3.7.1 - Ensaio de MPO

As amostras obtidas a partir do processamento descrito anteriormente foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para liberação da enzima mieloperoxidase das vesículas citoplasmáticas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 RPM e o sobrenadante, diluído em Tampão 2 para MPO (0.05 M de Na₃PO₄ e 0.5% de HETAB em pH 5.4) na proporção de 1:5, foi utilizado para o ensaio enzimático colorimétrico.

Em uma placa contendo 96 poços foi adicionada 25 µL da amostra diluída e em seguida, 25 µL de tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) na concentração final de 1.6mM. A placa foi incubada a 37°C por 5 minutos e, após a adição de 100 µL de peróxido de hidrogênio 0.003% (diluído em Tampão 2 para MPO), uma nova incubação a 37°C por 5 minutos foi realizada. A reação leva ao aparecimento de uma cor azulada pela quebra do substrato TMB e para o término desta reação, adiciona-se 100 µL de H₂SO₄ 1M. A atividade da mieloperoxidase é então proporcional à intensidade da cor observada em cada poço. A placa então é levada ao espectrofotômetro, e após a leitura da absorbância a 450 nm, o resultado é calculado a partir da comparação com a curva padronizada no Laboratório de Imunofarmacologia.

A curva padrão, que serve para a comparação das absorbâncias observadas, refere-se à D.O. (densidade ótica) resultante da reação da atividade de MPO de neutrófilos purificados e igualmente processados, obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, após indução com caseína 5% (Russo *et al.*, 2009).

3.8 - DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

O sobrenadante do lavado broncoalveolar foi utilizado para a dosagem das citocinas IL-6, CXCL1/KC, TNF- α , CCL2/ MCP-1, CXCL2/MIP-2 e IL-10. O protocolo utilizado foi estabelecido no kit de ELISA murino da R&D Systems, em placa de 96 poços. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, e adicionados à placa de 96 poços para que a sensibilização ocorresse durante 18 horas à 4° C. Em seguida, foi

realizado o bloqueio da reação com 1% de albumina bovina diluída em PBS por 2 horas à temperatura ambiente, de forma que não houvesse ligação inespecífica durante o ensaio. Após lavagem, os anticorpos de detecção (diluídos em 0.1% de BSA/PBS) foram adicionados à placa e esta foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (“*HRP-Streptavidin* Pharmingem” - 1:4000) e revelada com o substrato OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride* - Sigma) com 0.006% peróxido de hidrogênio. Após cerca de 20 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1 M.

A leitura foi feita no espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. A cor obtida pela reação é diretamente proporcional à concentração da citocina na amostra analisada. As absorbâncias obtidas pela leitura foram comparadas a uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina analisada, fornecida no kit.

3.9 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANEXINA A1 POR WESTERN BLOT

3.9.1 – Obtenção dos extratos proteicos

Extratos proteicos de 50 mg do pulmão direito dos camundongos foram obtidos pela adição de 500 µL de solução de lise (0.5% p/v de NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8.0, 10% de glicerol, 0.2 mM de EDTA, 1mM de NaVO₃, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina), e homogeneização usando um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante aliqotado e guardado a -20°C até o momento de uso.

3.9.2 - Dosagem de proteínas totais do pulmão

Para realizar a dosagem de proteínas totais do extrato celular do pulmão, foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) baseado no método de Bradford. O ensaio é realizado em uma microplaca de 96 poços, e consiste na adição de

2 μL de cada amostra a 200 μL do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente é realizada uma curva padrão utilizando como solução padrão BSA 1mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura é feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 595 nm. A absorbância das amostras é comparada com a absorbância da curva, com concentrações variando de 0.063 mg/mL a 2 mg/mL e os resultados são expressos em mg/mL.

3.9.3 - Western Blot para análise da expressão de AnxA1

Após a dosagem de proteínas, 50 μg dos extratos proteicos foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão (10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.25M Tris/HCl pH 6,8) e incubados a 100°C por 5 minutos. Para o fracionamento das amostras, foi utilizado um gel desnaturante de poliacrilamida/SDS (10%) para a eletroforese. Após a corrida em gel, os extratos fracionados foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond® ECL®, GE Healthcare), que em seguida foi bloqueada com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado. Posteriormente, as membranas foram lavadas com PBS-Tween, e incubadas com o anticorpo primário anti-Anexina A1 (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C *overnight*. Após nova lavagem com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-rabbit (Cell Signaling Technology) ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL (GE Healthcare), expostas contra filme de raio-X (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante. As bandas obtidas foram mensuradas utilizando o programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda). Para a normalização, as membranas foram incubadas posteriormente com o anticorpo primário anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology) e o secundário anti-mouse (Cell Signaling Technology).

3.10 – PADRONIZAÇÃO DO MODELO MURINO DE PNEUMONIA POR *S. PNEUMONIAE*

3.10.1 – Letalidade e Perda de Peso

Inóculos crescentes de *Streptococcus pneumoniae* (10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 CFU) foram utilizados para a infecção intranasal dos camundongos e observação da letalidade e perda de peso. Os animais foram acompanhados por 10 dias.

3.10.2 - Cinética da resposta inflamatória

Os inóculos 10^3 , 10^4 e 10^5 CFU foram utilizados para avaliação da resposta inflamatória desencadeada após a infecção. Os animais foram infectados via intranasal e eutanasiados em diferentes tempos de infecção. Para a eutanásia dos animais infectados com os inóculos de 10^3 e 10^5 CFU, foram escolhidos os tempos de 24, 48 e 72 horas e ainda o tempo de 84 horas após a infecção para os animais infectados com o maior inóculo. Os animais infectados com o inóculo de 10^4 CFU foram eutanasiados após 12, 24, 48, 72 e 96 horas da infecção. Após a eutanásia, os camundongos foram submetidos a procedimentos de extração de células, fluidos e tecidos que, posteriormente, foram utilizados para as análises do número de bactérias no lavado broncoalveolar (BAL) e dos parâmetros inflamatórios: quantificação de células totais, neutrófilos e mononucleares no BAL; quantificação de neutrófilos nos pulmões; análises histopatológicas dos pulmões, quantificação das quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2 e das citocinas TNF- α e IL-6 no BALF.

3.11 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ROLIPRAM NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESENCADEADA PELA INFECÇÃO

3.11.1 – Letalidade

Os camundongos foram tratados com rolipram (ROL) ou PBS/DMSO 2% (Veículo), 1 hora antes da infecção pela bactéria *S. pneumoniae* e depois de 12 em 12

horas por 5 dias. O inóculo da bactéria utilizado foi de 10^4 CFU e os camundongos foram monitorados quanto à sobrevida e perda de peso durante 10 dias.

3.11.2 - Comparação da resposta inflamatória e *clearance* bacteriano

Camundongos tratados com rolipram ou com o veículo (1 hora antes da infecção, via intraperitoneal) foram infectados com o inóculo de 10^4 CFU e eutanasiados após 24 horas de infecção. Foi realizado o lavado broncoalveolar (BAL) dos animais e 100 μ l deste foi retirado e plaqueado em ágar sangue para a contagem do número de unidades formadoras de colônias (CFU) recuperadas. Após centrifugação, o sobrenadante do fluido do BAL foi utilizado para a dosagem de citocinas (TNF- α , IL-6, CCL2/MCP-1, CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC e IL-10), enquanto que as células do *pellet* passaram por contagem total e diferencial. Os pulmões foram retirados para a quantificação de neutrófilos (através da medida da atividade da enzima mieloperoxidase - MPO) e para as análises histológicas.

3.11.3 – Comparação do dano tecidual desencadeado após a infecção

Após a eutanásia dos animais pré-tratados com rolipram ou veículo, os pulmões esquerdos foram recolhidos e fixados em solução de formol 10% tamponado. As amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo, fixadas em lâminas histológicas. Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. As análises das lâminas foram realizadas por patologista experiente, sem conhecimento prévio sobre os grupos experimentais, em microscópio óptico com aumento objetivo de 10 e 40 vezes para determinação do padrão inflamatório e do grau de dano tecidual provocado pela infecção. O grau de consolidação pulmonar, inflamação, edema e hemorragia foram quantificados usando um escore semi-quantitativo da gravidade das alterações observadas (0- ausente, 1- mínimo, 2- pouco, 3- moderado, 4- intenso e 5- muito intenso). O total do escore histopatológico representa 20 pontos. Campos de imagens representativos de cada grupo foram capturados e fotografados no Microscópio Olympus Bx41.

3.12 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO DE ROLIPRAM E O ANTIMICROBIANO CEFTRIAXONA NA INFECÇÃO PULMONAR POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

3.12.1 - Resposta inflamatória, letalidade e *clearance* bacteriano nos espaços alveolares

Para a avaliação do tratamento combinado de rolipram com o antimicrobiano ceftriaxona, camundongos foram infectados com o inóculo 10^5 CFU de *Streptococcus pneumoniae* via intranasal. Após 60 horas de infecção os camundongos foram tratados com rolipram, antimicrobiano ou a combinação de tratamentos. Duas doses do tratamento foram administradas aos camundongos, com o intervalo de 12 horas entre elas. Após 84 horas da infecção, os camundongos foram eutanasiados para a coleta dos materiais para as análises. Foi realizado o lavado broncoalveolar (BAL) dos animais e 100 μ L deste foi retirado e plaqueado em ágar sangue para a contagem do número de unidades formadoras de colônia presentes no pulmão. Após centrifugação, as células do *pellet* passaram por contagem total e diferencial e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem das citocinas TNF- α , CXCL1/KC e CCL2/MCP-1 por ELISA. Os pulmões foram retirados para a quantificação indireta do número de neutrófilos (MPO) e análises histológicas. Para os experimentos de letalidade, os animais foram observados diariamente durante 10 dias após a infecção.

3.12.2 – Análise da função pulmonar

A avaliação do efeito do tratamento combinado de ceftriaxona e rolipram na função pulmonar foi realizada pela análise de parâmetros espirométricos. Os camundongos foram anestesiados com uma injeção subcutânea de cetamina e xilazina (8.5 mg/kg xilazina e 130 mg/kg cetamina) para manutenção da respiração espontânea sob anestesia. Após a traqueostomia, os camundongos foram alocados em um pletismógrafo corporal com ventilação controlada, conectado a um computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, North

Carolina - USA). Para a medida da complacência dinâmica pulmonar, foi realizada uma manobra respiratória em que os pulmões foram inflados até uma pressão padrão de -30 cm H₂O e em seguida a análise da distensão pulmonar foi realizada pelo pletismógrafo. A complacência dinâmica (C_{dyn}) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$C_{dyn} = \frac{\text{Volume corrente}}{(\text{Pico da pressão inspiratória}) - (\text{pressão expiratória positiva final})}$$

Os resultados foram expressos como volume/taxa de pressão (mL/cm H₂O). Cada teste realizado em cada camundongo foi repetido por no mínimo três vezes para obter um maior grau de confiabilidade. Manobras subótimas foram rejeitadas das análises.

3.12.3 – Ensaio de fagocitose

Para a análise da capacidade fagocítica dos macrófagos alveolares, a fagocitose de *S. pneumoniae* foi avaliada de duas maneiras diferentes usando macrófagos alveolares cultivados *ex vivo*. Na primeira abordagem, macrófagos foram recuperados após 84 horas de infecção do fluido do lavado broncoalveolar (BALF) de camundongos tratados com o veículo, rolipram, ceftriaxona ou ambas as drogas. 5×10^5 macrófagos foram cultivados por três horas em lamínulas em placas de 24 poços com o meio DMEM contendo antibióticos para remover bactérias remanescentes no BALF. Em seguida, as células não aderidas foram removidas por duas etapas de lavagem com DMEM sem antibióticos. *S. pneumoniae* marcados com CFSE e diluídos em DMEM sem antibióticos foram adicionados à cultura celular. A multiplicidade de infecção (MOI) de 18 foi utilizada. Após 40 minutos de incubação a 37° C, as bactérias não fagocitadas foram retiradas por lavagem com DMEM. As lamínulas contendo os macrófagos foram fixadas e removidas da placa para marcação das células e visualização das bactérias. Os núcleos dos macrófagos foram corados com DAPI (azul) e as células foram analisadas por microscopia confocal. As células contendo bactérias fagocitadas foram contadas em 4 campos diferentes por lamínula.

No segundo experimento, os macrófagos coletados do BALF dos animais tratados com veículo, cada uma das drogas ou a combinação de tratamentos foram cultivados diretamente em placas de 24 poços com DMEM. Após três horas, as células não

aderidas foram lavadas e infectadas com *S. pneumoniae* marcados com CFSE utilizando a MOI de 8. Após 40 minutos de infecção, os macrófagos foram removidos da placa por tripsinização. As células foram lavadas com PBS, fixadas com 2% de formaldeído e a aquisição foi realizada no citômetro de fluxo BD FACScantoII™. A marcação do CFSE detectada dentro das células foi analisada utilizando o software FlowJo (Treestar, USA) e expressa como a intensidade média de fluorescência (MFI) que se correlaciona ao número de bactérias dentro dos macrófagos.

3.12.4 - Marcação de *Streptococcus pneumoniae* com CFSE e opsonização:

Um mililitro da suspensão das bactérias previamente cultivadas até a fase exponencial (D.O.= 0.4) e ressuspendida em PBS, foi incubada por 30 minutos com 2 µM de uma solução de 5(-e 6) carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFDA/SE, Molecular Probes, Eugene, Oregon) a 37°C ao abrigo da luz. A forma diacetato não fluorescente do CFDA passa facilmente pelas membranas das bactérias viáveis e é então convertida à carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE), que fluoresce (Vander Top, Perry e Gentry-Nielsen, 2006). Em seguida, as bactérias foram lavadas com PBS estéril duas vezes para a retirada do reagente não incorporado. Após centrifugação (2000 rpm por 20 minutos), as bactérias foram ressuspendidas com meio de cultura DMEM sem antibiótico acrescido de 10% de soro murino fresco para a etapa da opsonização. A solução contendo as bactérias foi incubada por 30 minutos a 37°C e, posteriormente adicionada às placas para o ensaio de fagocitose.

3.13 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0.05$. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad PRISM 4. A exclusão de valores que se portaram como outliers foi feita através do teste de Grubbs, com nível de significância igual a 0.05. As curvas de

letalidade, construídas no mesmo software, foram comparadas utilizando o teste Log-rank qui-quadrado. Diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados, com $p < 0.05$ foram representadas graficamente com um asterisco (*); diferenças com $p < 0.01$ foram representadas com dois asteriscos (**) e com $p < 0.001$ com três asteriscos (***); diferenças entre os grupos infectados – veículo versus tratamento com rolipram, veículo versus tratamento combinado, veículo versus tratamento com ceftriaxona – foram representadas graficamente com o um símbolo (#) para diferenças com $p < 0,05$; diferenças com $p < 0.01$ foram representadas com dois símbolos (##) e com $p < 0.001$ com três símbolos (###). A comparação entre outros grupos foi representada com o símbolo \square .

4 - Resultados

4.1- MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCÃO POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

4.1.1 - Padronização:

Para a padronização do modelo murino de pneumonia pneumocócica foram utilizados quatro inóculos da bactéria *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 3 ATCC 6303 – 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 CFU. As curvas de letalidade e perda de peso dos camundongos infectados apresentaram caráter inóculo dependente (Figura 4). Quando infectados com 10^6 CFU, todos os animais sucumbiram à infecção em um dia; a infecção com 10^5 CFU levou a 100% de letalidade em 4 dias. O inóculo de 10^4 CFU levou à morte de aproximadamente 70% dos animais infectados e o menor inóculo analisado (10^3 CFU) resultou em 50% de letalidade dos animais infectados. (Figura 4A). Da mesma forma, a perda de peso dos animais infectados foi proporcional ao inóculo. Os animais infectados com 10^5 CFU da bactéria apresentaram intensa perda de peso correspondente a 20% do peso inicial dos camundongos. Os inóculos de 10^4 e 10^3 CFU levaram a perda de peso de aproximadamente 10% e 5%, respectivamente. Os animais sobreviventes recuperaram o peso inicial após cinco dias de infecção (Figura 4B).

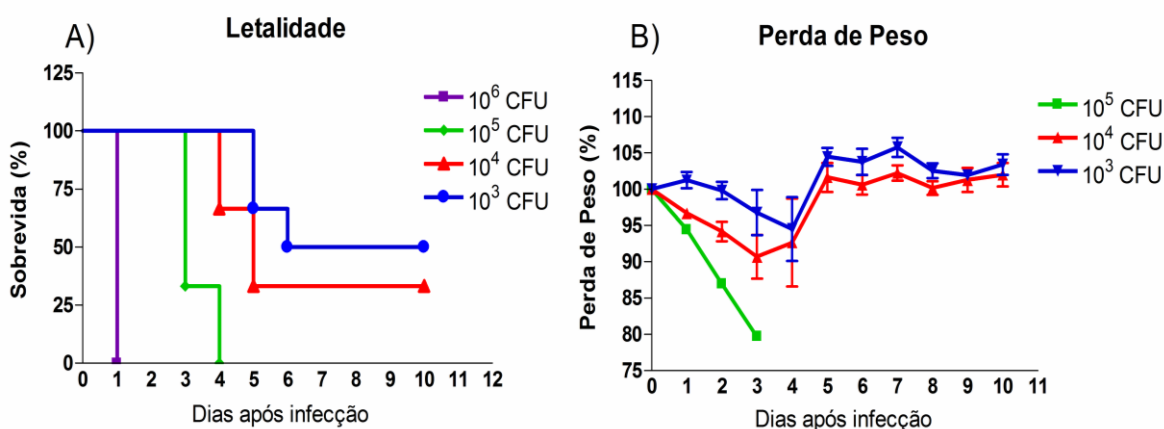


Figura 4 - Curvas de letalidade (A) e perda de peso (B) observadas após infecção com os inóculos de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 CFU de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303. Os resultados de perda de peso estão expressos em média \pm EPM.

4.1.1.1 - Cinética da resposta inflamatória após a infecção por *Streptococcus pneumoniae*

A partir dos dados encontrados nas curvas de letalidade e perda de peso, os inóculos de 10^5 , 10^4 e 10^3 CFU foram escolhidos para a caracterização da cinética da resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *S. pneumoniae*. Os camundongos foram eutanasiados após 24, 48, 72 horas da infecção intranasal pela bactéria, e ainda após 12 horas e 96 horas quando infectados com 10^4 CFU ou 84 horas após a infecção com o inóculo de 10^5 CFU.

Os resultados evidenciam o caráter inóculo-dependente da gravidade da doença e a correlação entre a mortalidade (Figura 4A) e morbidade (Figura 4B), e a resposta inflamatória (Figura 5). O recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar após a infecção atingiu o pico com 24 horas nos inóculos de 10^5 e 10^4 CFU e se manteve alto, quando comparado ao grupo não infectado, nos tempos posteriores observados. Em contrapartida, o inóculo de 10^3 CFU apresentou um maior recrutamento de leucócitos 72 horas pós-infecção, dentre os tempos avaliados. A intensidade do recrutamento de células foi proporcional ao inóculo de infecção (Figura 5A-C).

O número máximo de neutrófilos presentes nas vias aéreas dos camundongos infectados com os inóculos de 10^4 e 10^5 CFU coincidiu com o pico do recrutamento de leucócitos, o que reforça os neutrófilos como as principais células envolvidas na defesa contra *S. pneumoniae* (Figura 5D-E). Após os tempos seguintes de infecção (48, 72h, 84 e 96 horas) houve diminuição significativa do número de neutrófilos recrutados e, após a infecção com 10^5 CFU essa diminuição coincidiu com o aumento no número de células mononucleares nos espaços aéreos (Figura 5J). Por outro lado, a principal população leucocitária recrutada para as vias aéreas no pico de inflamação (72h) após a infecção com 10^3 CFU foi a de células mononucleares (Figura 5 F e L).

O acúmulo de neutrófilos nos pulmões pôde ser quantificado através de ensaio que mede a atividade da enzima MPO a qual está presente em altos níveis em neutrófilos e, por isso é usada como indicador da presença dessas células (Russo *et al.*, 2009). O número de neutrófilos presentes nos pulmões dos camundongos infectados com o inóculo de 10^5 CFU permaneceu aumentado durante todos os tempos avaliados da infecção (Figura 5G), enquanto no grupo infectado com o menor inóculo não houve

aumento em nenhum dos tempos analisados (Figura 5I). Após a infecção com o inóculo de 10^4 CFU foi observado um recrutamento de neutrófilos para os pulmões (Figura 5H) com perfil similar ao recrutamento para as vias aéreas (Figura 5E).

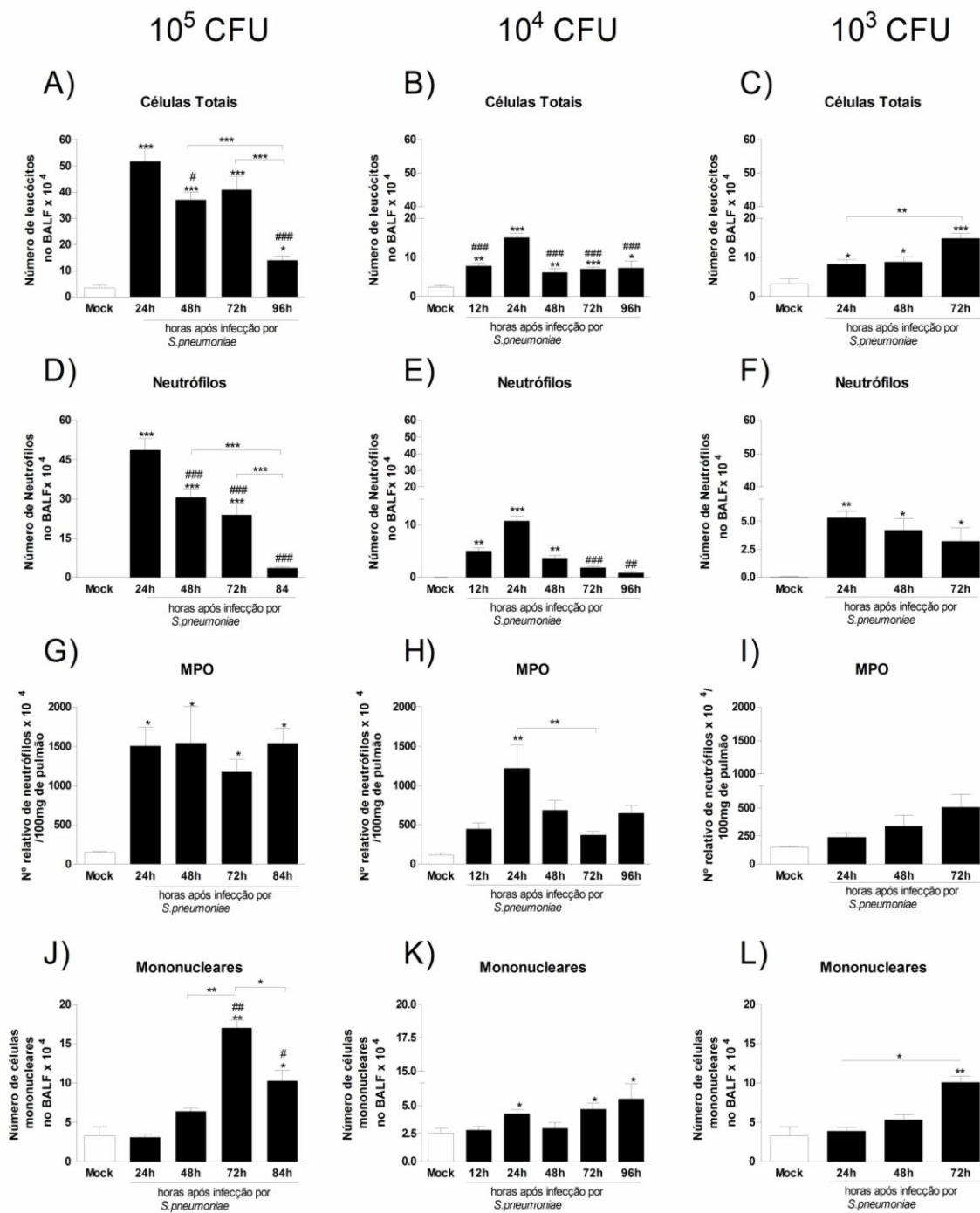


Figura 5- Cinética da resposta inflamatória desencadeada por *Streptococcus pneumoniae*. Número de leucócitos totais (A-C), neutrófilos (D-F) e macrófagos (J-L) recrutados para o espaço alveolar e número relativo de neutrófilos (G-I) recrutados para os pulmões após infecção com 10⁵ CFU (coluna à esquerda), 10⁴ CFU (coluna central) e 10³ CFU (coluna à direita) de *Streptococcus pneumoniae* e no grupo controle não infectado (Mock). Os resultados apresentam a média ± EPM e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação aos grupos não infectados ou quando comparados entre os grupos indicados (—) e ## para p<0,01 e ### para p<0,001 quando comparado com o grupo 24h.

O número de bactérias recuperadas dos espaços alveolares dos animais infectados com 10^5 , 10^4 e 10^3 CFU de pneumococos foi maior do que o inóculo utilizado na infecção já no primeiro tempo analisado. Durante o curso da infecção, esse número caiu progressivamente nos grupos infectados com 10^4 e 10^3 CFU da bactéria (Figura 6 B e C). Entretanto, os animais infectados com o maior inóculo apresentaram um aumento no número de bactérias nas vias aéreas com pico após 72 horas de infecção, diminuindo bruscamente após 84 horas de infecção (Figura 6 A) indicando o controle atrasado da multiplicação bacteriana pelo hospedeiro.

4.1.1.2- Cinética da infecção com 10^4 CFU de *Streptococcus pneumoniae*

Por causar uma letalidade intermediária e uma inflamação intensa, o inóculo de 10^4 CFU foi escolhido para análises mais detalhadas da inflamação e patologia induzida por *S. pneumoniae* e posterior estudo da inibição de PDE4. Para a devida padronização da cinética da resposta inflamatória desencadeada por esse inóculo, foram medidos os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e das quimiocinas CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2 e CCL2/MCP-1 nas vias aéreas dos animais infectados. Os níveis de TNF- α apresentaram um pico nas primeiras 12 horas da infecção e diminuíram nos tempos seguintes até retornar aos níveis basais 72 horas após a infecção (Figura 7A). A citocina IL-6 e as quimiocinas CXCL1/KC e CCL2/MCP-1 apresentaram pico com 48 horas de infecção por *Streptococcus pneumoniae* e retornaram a níveis basais após 72 horas (Figura 7B, C e E). A quimiocina CXCL2/MIP-2 apresentou níveis aumentados nos tempos iniciais de infecção, apresentando pico com 24 horas (Figura 7 D). Nos tempos posteriores houve diminuição dos níveis desta quimiocina, retornando aos níveis basais.

Dessa forma, o recrutamento de células observado coincide com a intensa produção de citocinas e quimiocinas inicialmente e durante a infecção por *S. pneumoniae*.

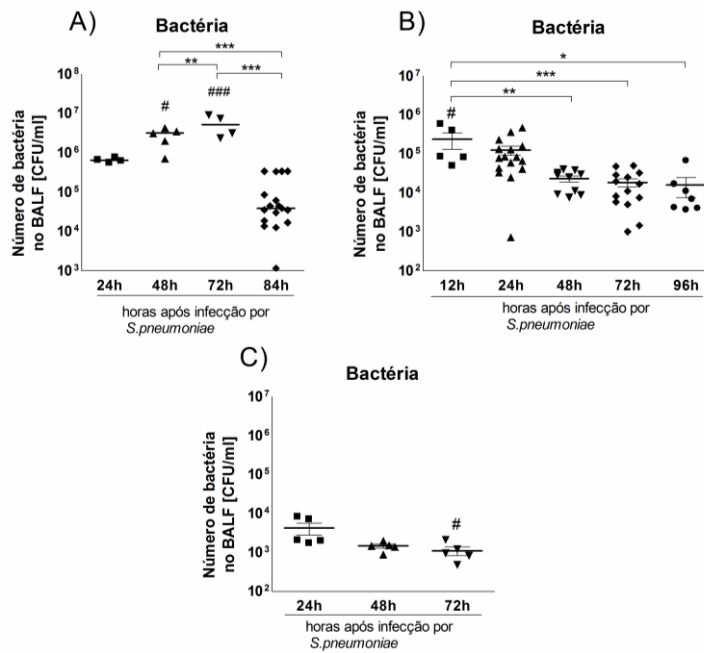


Figura 6- Número de bactérias (em CFU) presentes no espaço alveolar de animais infectados com 10^5 , 10^4 e 10^3 CFU de *S. pneumoniae* e eutanasiados após os diversos tempos de infecção. Os resultados foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ quando comparados os grupos indicados (—) e # para $p < 0,05$ e ### para $p < 0,001$ quando comparados com o grupo 24h.

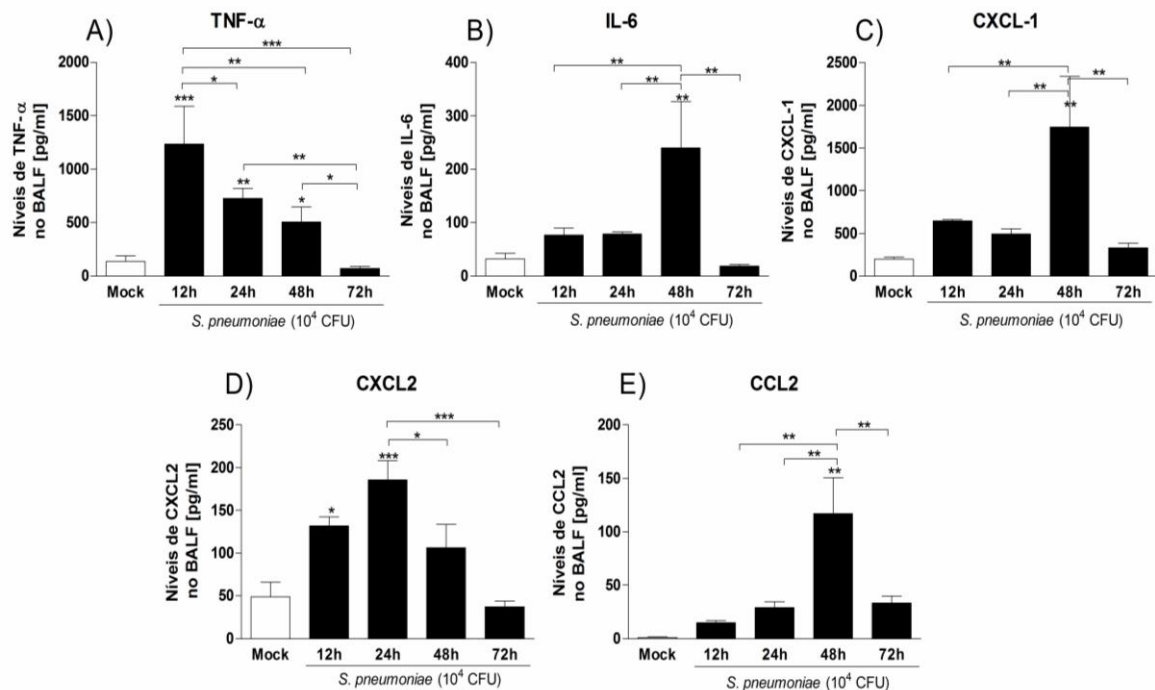


Figura 7- Níveis das citocinas TNF- α (A) e IL-6 (B) e quimiocinas CXCL1/KC (C), CXCL2/MIP-2 (D) e CCL2/MCP-1 (E) no BALF de animais infectados com 10^4 CFU de *Streptococcus pneumoniae*. Os resultados apresentam a média \pm EPM de 5-9 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado ou quando comparados entre os grupos indicados (—).

As análises histopatológicas das lâminas dos pulmões dos camundongos infectados com 10^4 CFU de *Streptococcus pneumoniae* mostraram que durante todos os tempos avaliados, houve dano tecidual pulmonar significativo. Foi possível observar focos de células inflamatórias (predominantemente neutrófilos), áreas com perda da morfologia do parênquima pulmonar, presença de descamação e alteração estrutural no epitélio dos bronquíolos terminais. Em adição, foi observado infiltrado de células inflamatórias no interior dos bronquíolos terminais caracterizando inflamação das vias aéreas, e presença de inflamação vascular (Figura 8A).

A figura 8 evidencia as alterações citadas – lâminas representativas do grupo foram fotografadas com aumento de 100 e 400 vezes. O escore histopatológico, analisado por um patologista cego para o experimento, apresentou-se elevado em todos os tempos analisados (Figura 8B).

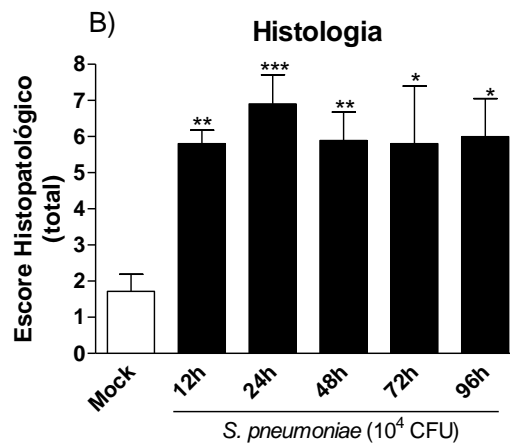
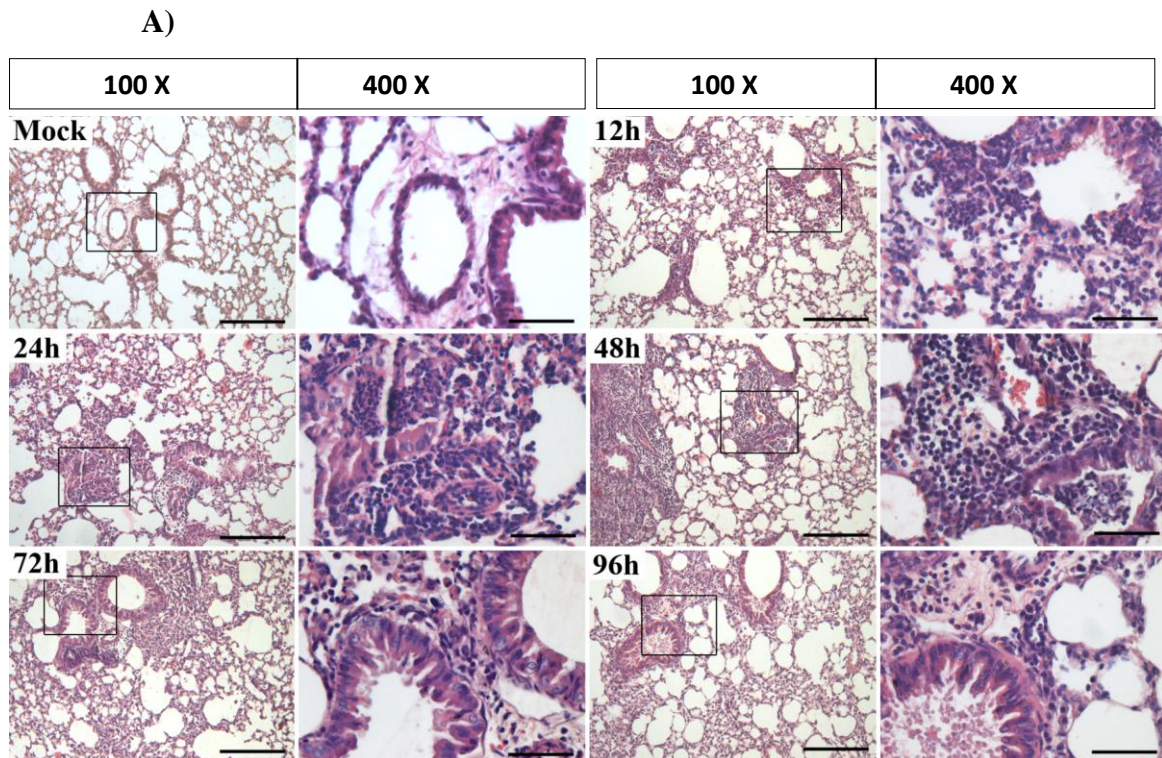


Figura 8 - Cortes histológicos representativos de seções de pulmões de camundongos não infectados (Mock) e de camundongos infectados com 10^4 CFU de *S. pneumoniae* sacrificados após 12, 24, 48, 72 e 96h de infecção. As barras representam 200 μ m quando o no aumento de 100 vezes e 50 μ m no aumento de 400 vezes. O escore histopatológico realizado a partir das lâminas utilizou a escala (descrita na seção de materiais e métodos) em que o dano tecidual observado variou de 0 a 20 (B).

4.2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM ROLIPRAM NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESENCADEADA POR *S. PNEUMONIAE*

4.2.1 – Resposta inflamatória após o pré-tratamento com rolipram

Como observado, a infecção com 10^4 CFU de *S. pneumoniae* induziu um intenso recrutamento de neutrófilos e produção de mediadores pró-inflamatórios culminando com significativa lesão pulmonar. O pré-tratamento com rolipram em uma dose única levou a uma diminuição dos parâmetros inflamatórios analisados após 24 horas de infecção, pico do recrutamento de neutrófilos para os pulmões e vias aéreas. O número de neutrófilos recrutados para o espaço alveolar e pulmões (Figura 9A e B) e os níveis das citocinas, TNF- α e IL-6, e quimiocinas, CCL2/MCP-1e CXCL2/MIP-2, medidos no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) foram observados diminuídos quando comparados ao grupo tratado com veículo (Figura 10A e B). Não houve diferença nos níveis da quimiocina CXCL1/KC e da citocina IL-10 entre o grupo tratado com rolipram e o grupo que apenas recebeu o veículo (Figura 10 C e E).

O número de leucócitos totais e de células mononucleares recrutados para os espaços alveolares foi similar entre os animais infectados (Figura 9C e D). Em adição, de forma bastante interessante, o dano tecidual resultante da infecção por *Streptococcus pneumoniae* observado no grupo veículo foi prevenido com apenas uma dose de rolipram (Figura 11A). Os animais infectados com 10^4 CFU de *S. pneumoniae* e tratados apenas com o veículo da droga, apresentaram intenso infiltrado neutrofílico, perda da arquitetura pulmonar e lesão celular dos brônquios e bronquíolos. Os animais pré-tratados com rolipram apresentaram preservação da arquitetura do órgão, com regiões de infiltrado neutrofílico de menor intensidade que o grupo veículo e dano tecidual visivelmente diminuído. A figura 11B mostra a quantificação do escore histopatológico dos pulmões dos animais infectados.

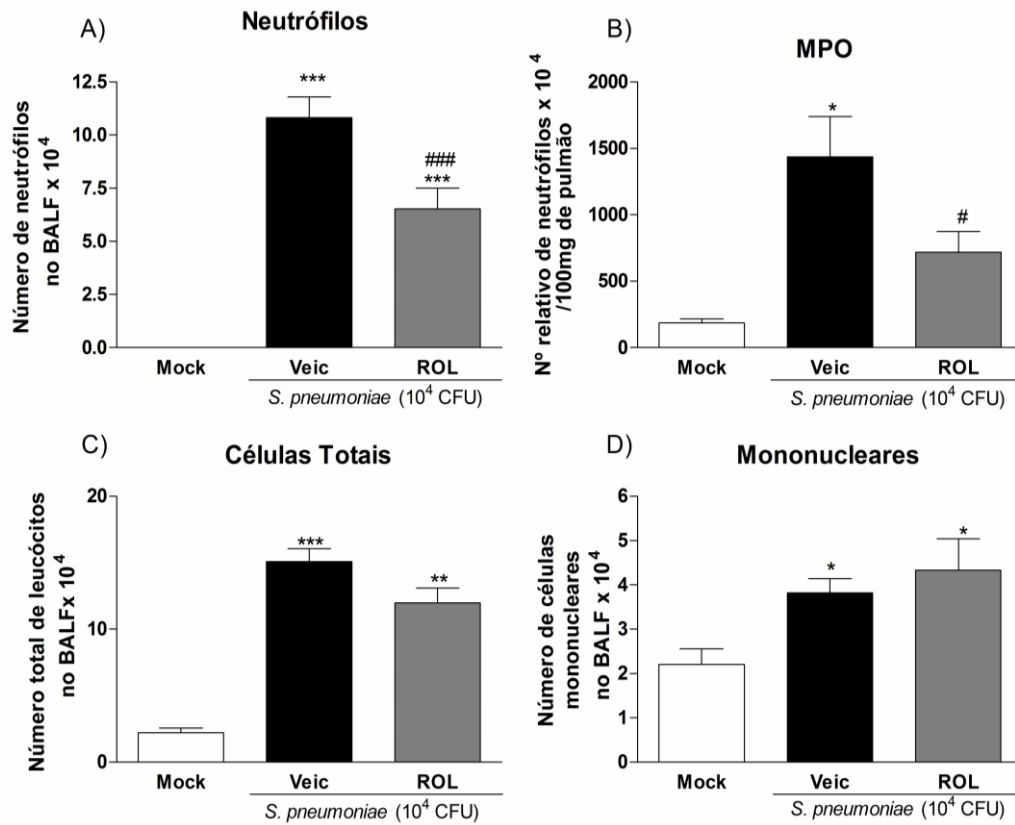


Figura 9 - Número de neutrófilos recrutados para as vias aéreas (A) e pulmões (B) e número de leucócitos totais (C) e mononucleares (D) nas vias aéreas de animais não infectados (Mock) e infectados com *S. pneumoniae* pré-tratados com veiculo (Veic) ou rolipram (ROL). Os resultados apresentam a média ± EPM de 5-8 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p > 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado (Mock) ou # para $p < 0.05$ e ### para $p < 0.001$ quando comparados com o grupo Veic.

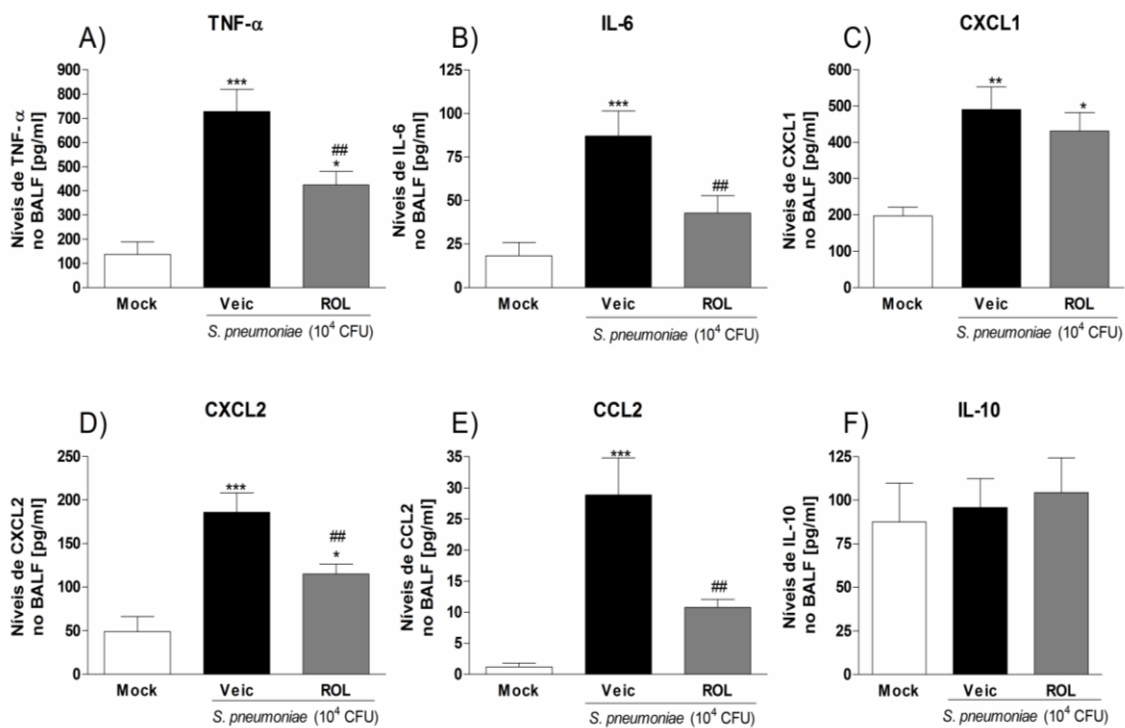


Figura 10 - Níveis das citocinas e quimiocinas TNF- α (A) IL-6 (B), CXCL1/KC (C), CXCL-2/MIP-2 (D), CCL2/MCP-1 (E) e IL-10 (F) no BALF de animais infectados com 10^4 CFU de *S. pneumoniae* e pré-tratados com rolipram (ROL) ou veículo (Veic) ou não infectados (Mock). Os resultados apresentam a média \pm EPM de 6-7 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado ou ## para $p < 0.01$ quando comparados ao grupo veículo (Veic).

A)

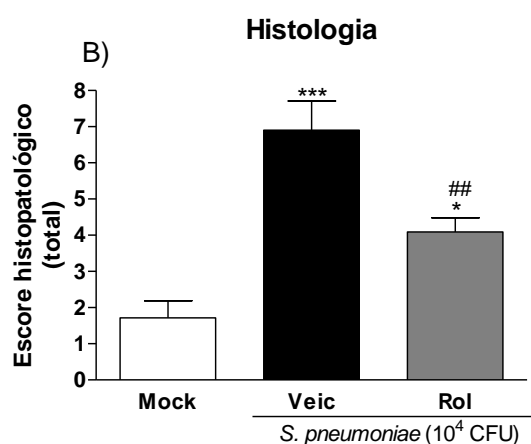
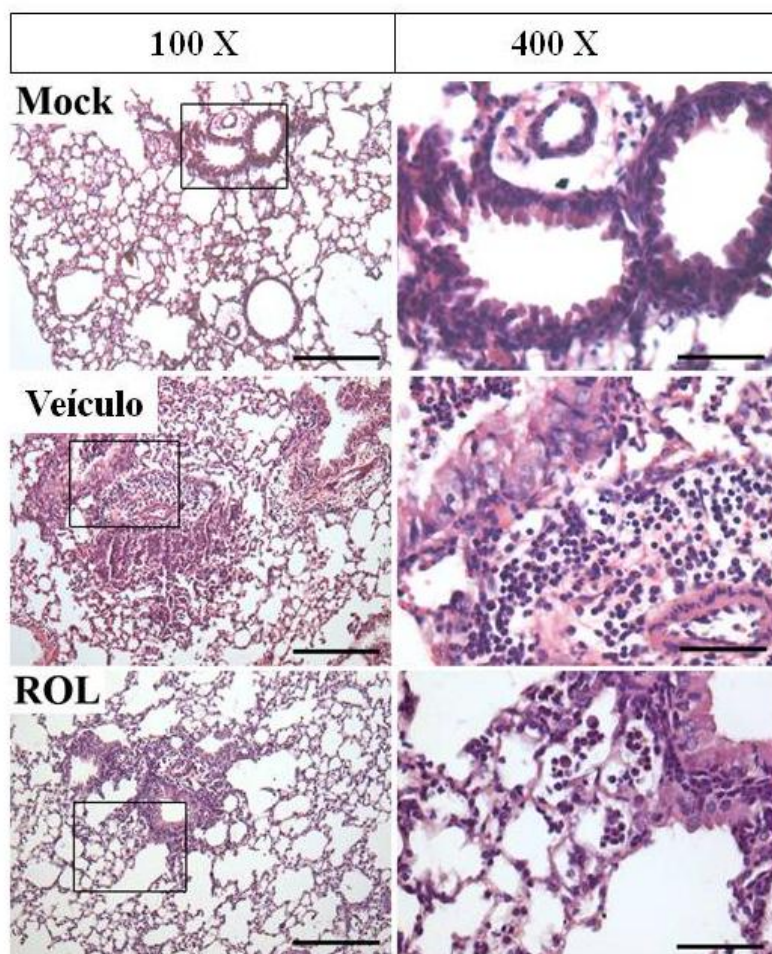


Figura 11 - Cortes histológicos representativos de seções de pulmões de camundongos não infectados (Mock) e de camundongos infectados com 10^4 CFU de *S. pneumoniae* tratados com veículo ou com rolipram (ROL). As barras representam 200 μ m quando no aumento de 100 vezes e 50 μ m no aumento de 400 vezes. Em B, escore histopatológico realizado a partir da análise dos cortes histológicos. A escala de dano tecidual observada variou de nenhum (0) a muito afetado (20).

4.2.2 - Letalidade e contagem de bactérias

Visto que o pré-tratamento com rolipram diminuiu diversos parâmetros da resposta inflamatória e dano tecidual, o efeito do tratamento na letalidade dos animais infectados foi avaliado. Para tanto foi utilizado um protocolo terapêutico no qual os animais receberam uma dose de rolipram ou veículo 1 hora antes da infecção com 10^4 CFU de *Streptococcus pneumoniae*. Os animais receberam doses de reforço de 12 em 12 horas por 5 dias. Não houve diferença na taxa de sobrevivência entre o grupo que recebeu tratamento com rolipram e o grupo que recebeu veículo da droga (Figura 12A). O tratamento com rolipram, apesar de diminuir a resposta inflamatória desencadeada pela infecção não foi capaz de interferir com a capacidade do hospedeiro de lidar com a infecção, como evidenciado pela letalidade e semelhança no número de bactérias presentes nos espaços alveolares dos grupos infectados (Figura 12B).

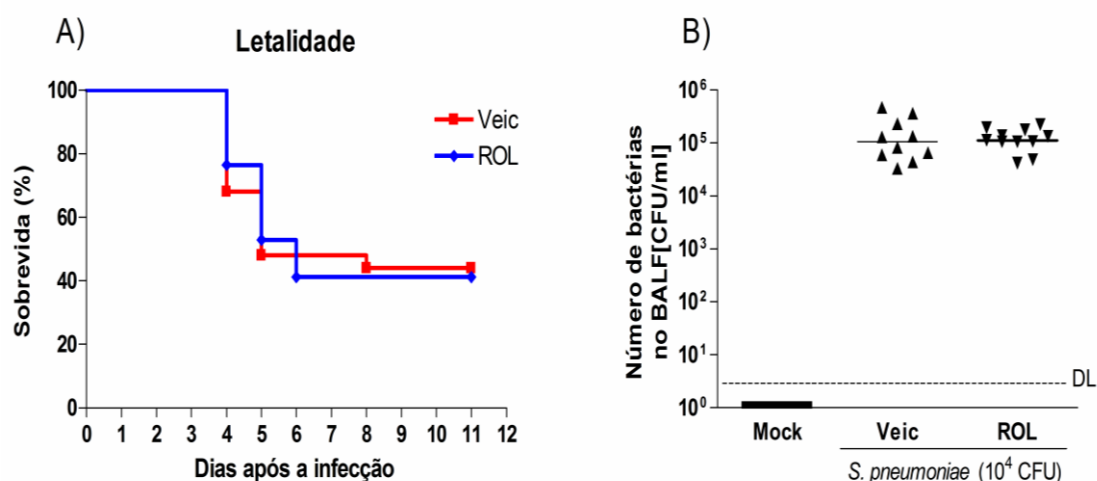


Figura 12 - Curva de letalidade de animais infectados com 10^4 CFU de *S. pneumoniae* e tratados com rolipram (ROL) ou veículo (Veic) - A. Em B, número de bactérias recuperadas no BALF de animais infectados pré-tratados com rolipram (ROL) ou veículo (Veic) e não infectados (Mock). A eutanásia dos animais foi realizada após 24h de infecção.

4.3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO DE ROLIPRAM E CEFTRIAXONA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESENCADEADA POR *S. PNEUMONIAE*

4.3.1 – Resposta inflamatória após o tratamento combinado de rolipram com ceftriaxona

Foi demonstrado que o tratamento com rolipram reduziu alguns dos parâmetros inflamatórios analisados, mas não teve efeito na letalidade dos animais, mesmo tendo reduzido a lesão pulmonar resultante da inflamação. Dessa maneira, foi investigada a possibilidade da combinação de um antibiótico - terapia convencional utilizada na clínica para o tratamento da pneumonia causada por *S. pneumoniae* - com a estratégia anti-inflamatória proporcionada pelo inibidor de PDE4, potencializar o efeito de cada fármaco. Para observar um possível efeito aditivo foi utilizado um inóculo maior da bactéria (10^5 CFU) para o desenvolvimento de pneumonia mais grave, a qual resulta em 100% de letalidade após 4 dias de infecção. Os animais foram tratados com ceftriaxona, rolipram ou ceftriaxona e rolipram após 60 e 72 horas de infecção (tempo que antecede o início da letalidade dos animais infectados com este inóculo) de forma a mimetizar o que ocorre durante uma infecção em humanos, na qual o paciente apenas procura tratamento após o desenvolvimento da doença.

A contagem de bactérias recuperadas do espaço alveolar dos camundongos tratados com ceftriaxona foi menor que o grupo tratado com veículo, o que não foi observado nos camundongos tratados apenas com rolipram (Figura 13A). Após o tratamento combinado (ceftriaxona e rolipram) o número de bactérias atingiu um número ainda menor em comparação aos tratamentos feitos com cada fármaco isoladamente, sendo que a detecção de bactérias nesse grupo foi mensurável apenas em três de 18 animais (Figura 13A). Além disso, o recrutamento intenso de neutrófilos para o pulmão observado no grupo veículo não foi revertido com o tratamento com rolipram ou ceftriaxona, e o recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar após a infecção foi reduzido apenas com o tratamento com rolipram, mas não ceftriaxona. A combinação de tratamentos reduziu de forma significativa o número de neutrófilos em ambos os compartimentos pulmonares (Figura 13B-C). Em adição, os níveis de TNF- α , CXCL1/KC e CCL2/MCP-1, aumentados no grupo veículo e de forma semelhante nos

grupos que receberam tratamento separado, retornaram ao basal após o tratamento com a combinação das drogas (Figura 13 D-F).

Como descrito anteriormente, a infecção com *Streptococcus pneumoniae* resulta em intenso dano pulmonar com acentuado influxo de neutrófilos. Após o tratamento com o antimicrobiano ceftriaxona, não foram observadas mudanças histopatológicas nos pulmões dos animais quando comparado com o grupo tratado apenas com o veículo. Em contraste, o tratamento com rolipram em combinação ou não com ceftriaxona diminuiu significativamente a lesão pulmonar e restaurou as características teciduais do órgão (Figura 14 A e B).

Para confirmar os dados histopatológicos e avaliar a função pulmonar, foi realizada a pletismografia corporal dos animais. A infecção por *S. pneumoniae* reduziu significativamente a complacência dinâmica pulmonar dos camundongos (a capacidade de expansão pulmonar), o que não foi alterado pelo tratamento com ceftriaxona. O tratamento apenas com rolipram em combinação com ceftriaxona restaurou os valores basais da complacência dinâmica, reforçando os dados de histologia (Figura 14C). Em adição, o tratamento combinado preveniu 20% da mortalidade dos animais infectados quando comparados com o grupo que recebeu apenas ceftriaxona (Figura 15).

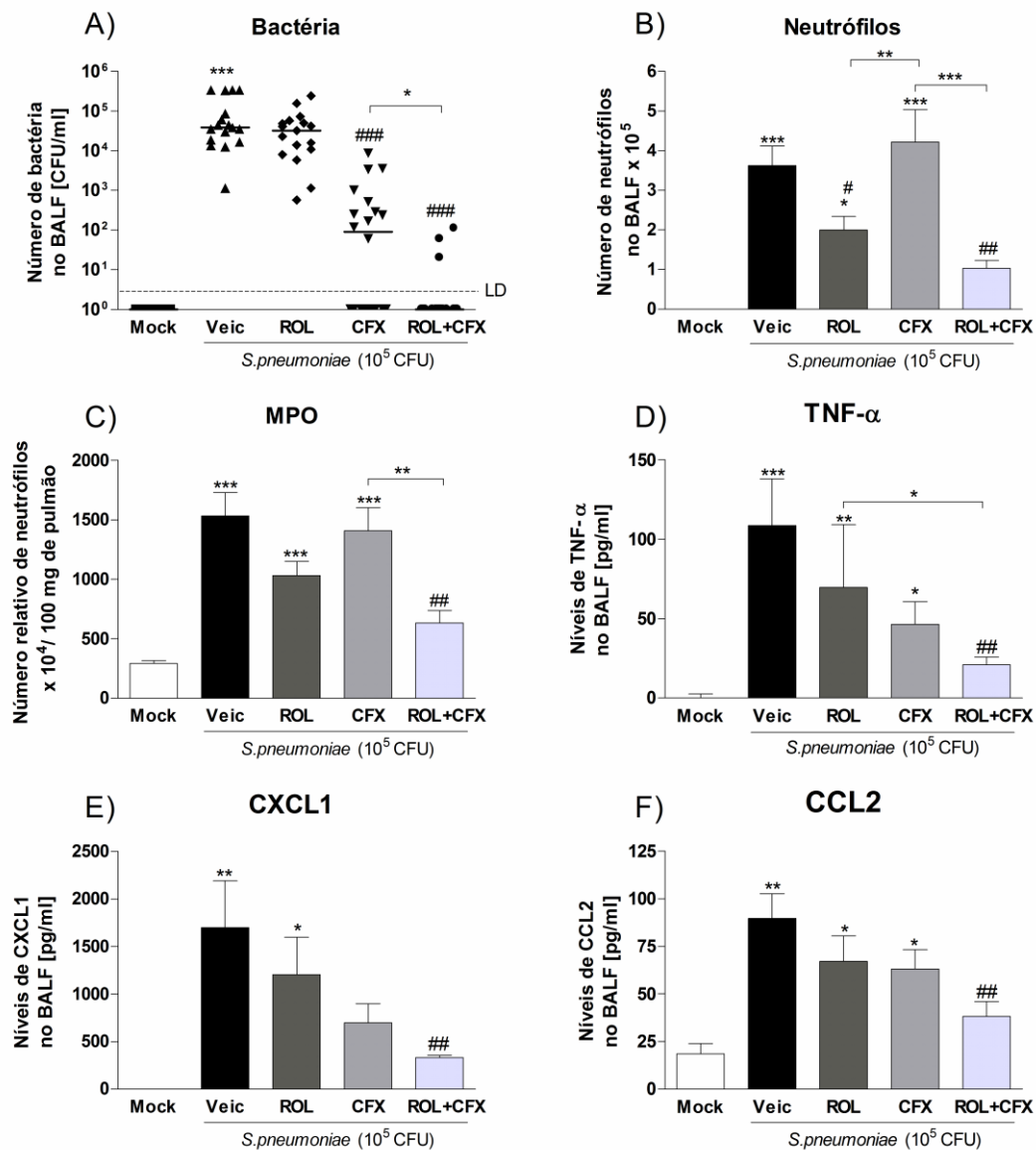


Figura 13 - Número de bactérias (A), neutrófilos presentes nas vias aéreas (B) e pulmões (C) e citocinas (D-F) de animais não infectados (Mock) ou infectados com 10^5 CFU de *S.pneumoniae* e tratados com PBS/DMSO 2% (Veic), rolipram (ROL), ceftriaxona (CFX) e a combinação de tratamentos (ROL+CFX). Os animais foram eutanasiados após 84h de infecção. Os resultados foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ quando comparados com o grupo Mock ou aos grupos indicados (—); ## para $p < 0.01$ e ### para $p < 0.001$ quando comparados com o grupo Veículo (Veic). LD = limite de detecção.

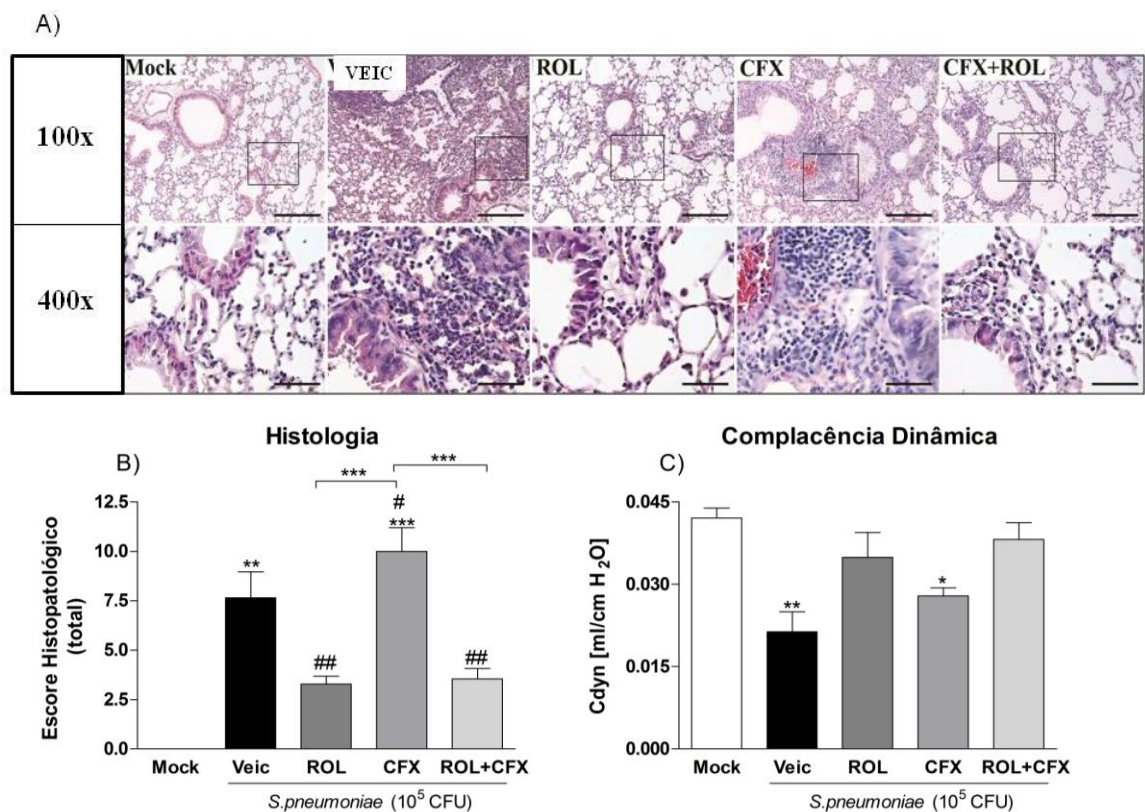


Figura 14- Cortes histológicos representativos de seções de pulmões de camundongos não infectados (Mock) e de camundongos infectados com 10^5 CFU de *S.pneumoniae* tratados com veículo, rolipram (ROL), ceftriaxona (CFX) ou ambas as drogas (ROL+CFX). As barras representam 200 μ m quando no aumento de 100 vezes e 50 μ m no aumento de 400 vezes. Em B, escore histopatológico realizado a partir da análise dos cortes. A escala de dano tecidual observada variou de nenhum (0) a muito danificado (20). Em C, análise da complacência dinâmica pulmonar dos animais.

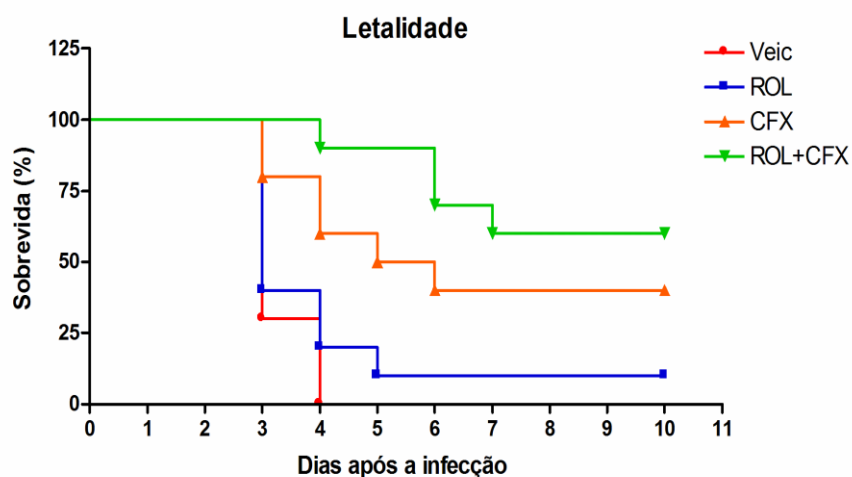


Figura 15 - Curvas de letalidade observadas após infecção com 10^5 CFU de *S. pneumoniae* em camundongos tratados com veículo, rolipram (ROL), ceftriaxona (CFX) ou ambas as drogas (ROL+CFX).

4.3.2 – Efeito do tratamento combinado de rolipram e ceftriaxona na fagocitose de bactérias por macrófagos

Como observado, o tratamento combinado com ceftriaxona e rolipram diminuiu significativamente a contagem de bactérias recuperadas do espaço alveolar dos camundongos. Dessa forma, a capacidade fagocítica dos macrófagos extraídos do espaço alveolar dos camundongos infectados e recebendo os diferentes tratamentos foi avaliada. Para tanto, foi realizado um ensaio de fagocitose *ex vivo* e o número de células contendo *S. pneumoniae* fagocitado foi observado usando microscopia confocal. O número de macrófagos com bactérias fagocitadas aumentou após o tratamento com rolipram ou ceftriaxona e a combinação das drogas aumentou ainda mais a porcentagem dessas células (Figura 16 A e B). Para confirmar esses achados, uma análise por citometria de fluxo foi utilizada para inferir o número de bactérias marcadas com CFSE dentro dos macrófagos recuperados de animais que passaram pelo esquema de tratamento. A intensidade de fluorescência média (MFI) foi utilizada para esse propósito e mostrou um aumento do sinal de bactérias marcadas dentro dos macrófagos de animais tratados com a combinação de tratamento (Figura 16C).

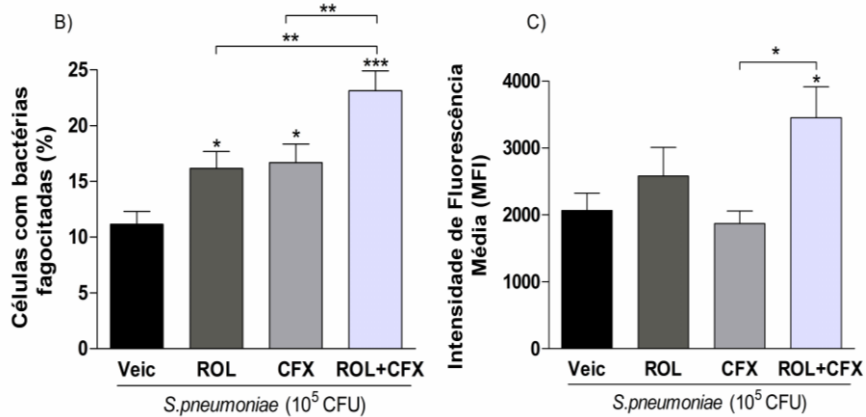
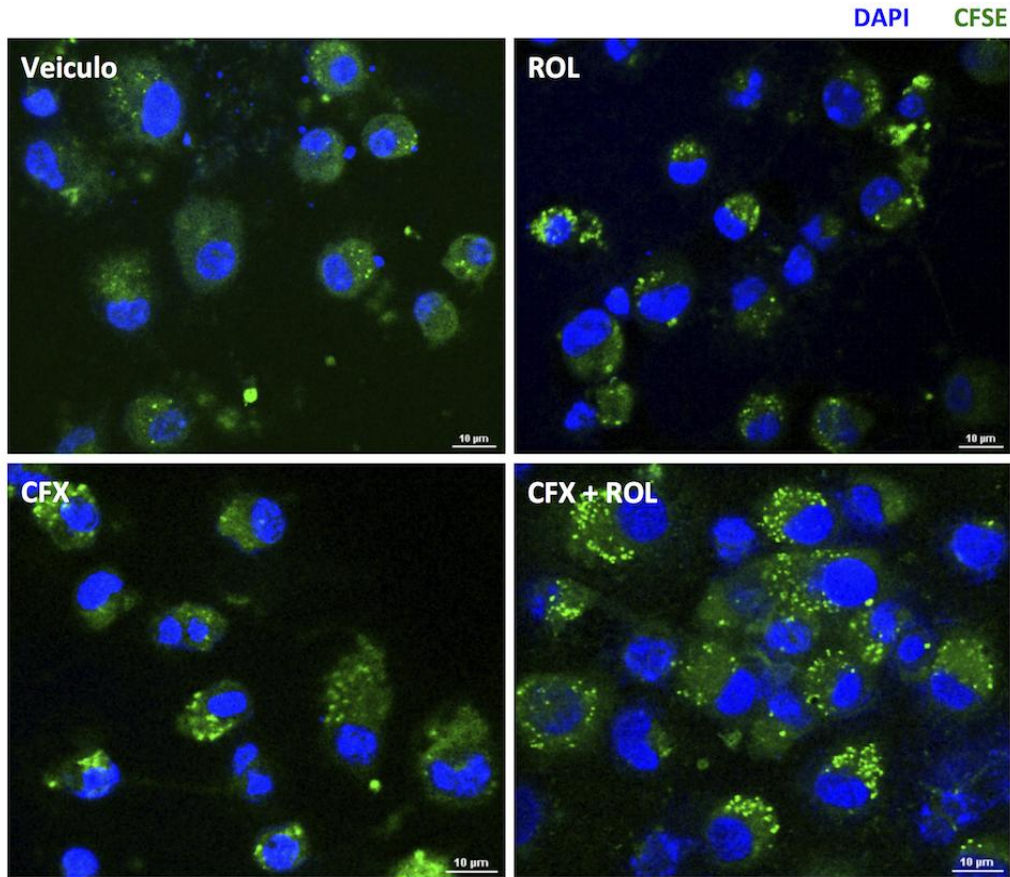


Figura 16 – Fotomicrografias dos macrófagos isolados de animais tratados com veículo (Veic), rolipram (ROL), ceftriaxona (CFX) ou ambas as drogas (ROL+CFX) corados com DAPI (em azul – núcleos) e *S. pneumoniae* fagocitada (em verde – CFSE). Os gráficos E e F mostram a quantificação da taxa de fagocitose observada em cada grupo. Os resultados são expressos como a porcentagem de células contendo bactéria marcada com CFSE (E) ou intensidade de fluorescência média (F). Os resultados apresentam a média \pm EPM de 5 animais por grupo e fotos de 4 campos diferentes para cada animal. Foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo veículo ou quando comparados os grupos indicados (—).

4.3.3 – Expressão da proteína pró-resolutiva Anexina A1 após o tratamento com rolipram, ceftriaxona ou a combinação das drogas

A Anexina A1 intacta é a forma biologicamente ativa da AnxA1, levando a suas ações anti-inflamatórias e de proteção tecidual. Durante a migração dos neutrófilos para o local do estímulo inflamatório (por exemplo, a infecção) a elastase e proteinase-3 neutrofílicas clivam a AnxA1 na sua forma clivada, inativa de 33 kDa (Vago *et al.*, 2012). Em concordância com essa inativação dependente de neutrófilos, após 24 horas de infecção com 10^4 CFU *S.pneumoniae*, o pico do recrutamento de neutrófilos para os pulmões, a Anexina A1 intacta (37 kDa) é totalmente clivada, dando lugar a uma banda de 33 kDa (Figura 17A). Apenas após 96 horas de infecção, tempo no qual o número de neutrófilos retorna ao basal, a banda de Anexina A1 intacta reaparece (Figura 17B).

Como a AnxA1 é uma proteína com papel importante para a resolução da inflamação (Vago *et al.*, 2012) e para a defesa e prevenção de mortalidade durante as infecções (Vanessa *et al.*, 2014), a sua expressão e/ou estabilidade durante a pneumonia pneumocócica e após os tratamentos foi avaliada. Após 84 horas de infecção por *S. pneumoniae* (10^5 CFU) foi observada uma banda de AnxA1 intacta na altura de 37 kDa e uma banda intensa de AnxA1 clivada. Após o tratamento com rolipram, mas não com ceftriaxona, a clivagem dessa proteína foi parcialmente prevenida. A combinação dos tratamentos bloqueou a clivagem de AnxA1 e restaurou os níveis de AnxA1 intacta quase completamente (Figura 17 C e D). De maneira interessante, animais nocautes para o gene da AnxA1 são mais susceptíveis à pneumonia pneumocócica que os animais selvagens (Figura 18). Esses resultados mostram que a associação de antimicrobianos e rolipram pode aumentar a expressão da proteína antiinflamatória/pró-resolutiva AnxA1 e indicam que ela possa exercer importante papel durante a pneumonia.

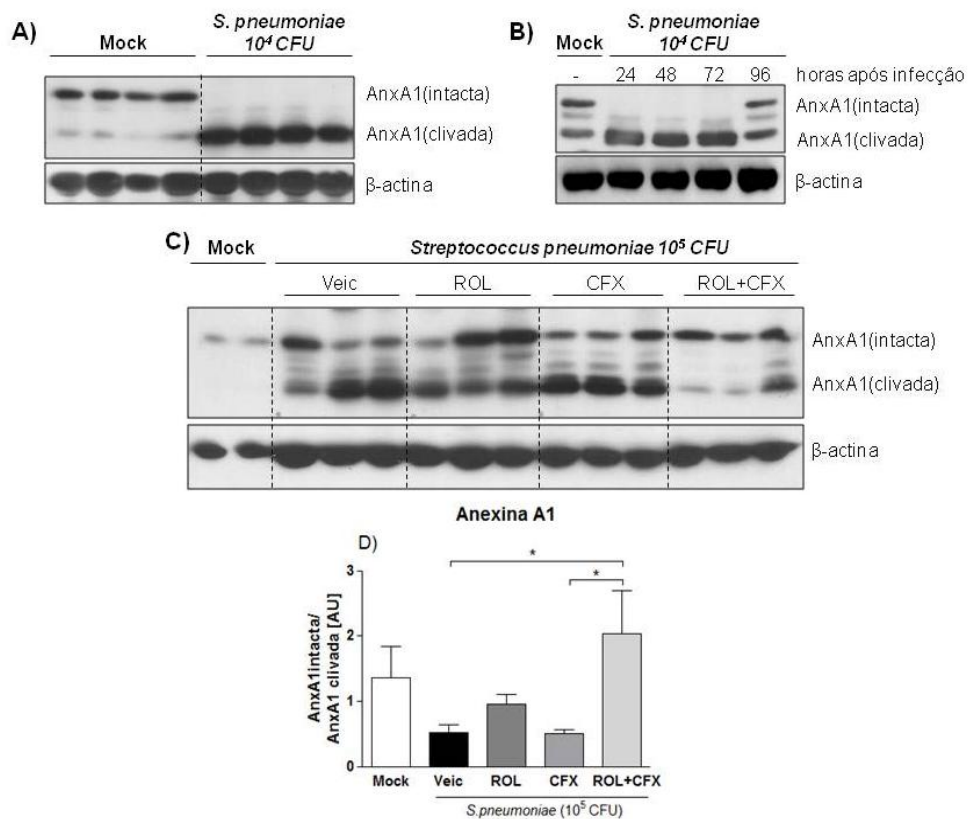


Figura 17 - Expressão de Anexina A1 em extratos celulares de pulmões de animais não infectados (Mock) e infectados com 10⁴ CFU de *S. pneumoniae* após 24 horas (A) e após 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção (B). Em C, expressão de Anexina A1 em animais não infectados (Mock) e infectados com 10⁵ CFU de *S. pneumoniae* tratados com o veículo (Veic), rolipram (ROL), ceftriaxona (CFX) e ambas as drogas (ROL+CFX) após 84h da infecção. Os blots são representativos de dois experimentos independentes. Para controle, as membranas foram normalizadas utilizando a medida da expressão de β-actina. O gráfico D mostra a razão entre Anexina A1 intacta e clivada para cada grupo. Os resultados foram representados com * para p<0.05 quando comparados aos grupos indicados (—).

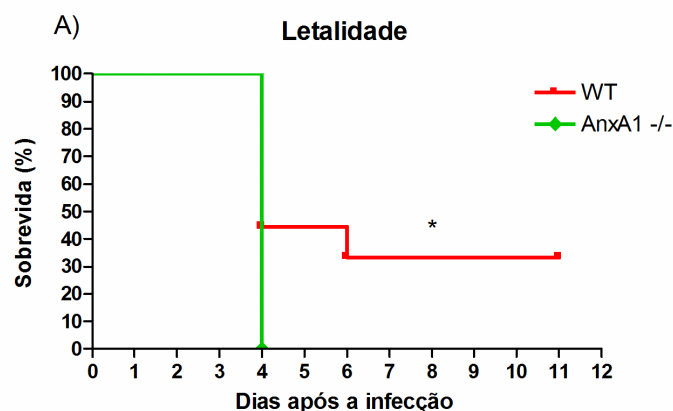


Figura 18 - Curvas de letalidade observadas após infecção com o inóculo de 10⁴ CFU de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 em camundongos deficientes para Anexina A1 (AnxA1^{-/-}) ou selvagens (WT). O resultado foi representado com * para p<0.05.

5 - Discussão

O pulmão é um órgão que possui uma relação íntima com o meio externo mantendo constante contato com partículas, antígenos e microrganismos. Além da sua importante função na realização das trocas gasosas, o pulmão possui diversos mecanismos de defesa que garantem um estado quiescente desse órgão em condições fisiológicas. Tais mecanismos incluem tosse, movimento mucociliar, as propriedades antimicrobianas da superfície da mucosa e a presença de células - do sistema imune ou não - capazes de detectar a presença de um patógeno e combater uma possível infecção (Whitsett e Alenghat, 2015). Em resposta a infecções, as ações de reconhecimento e consequente produção de mediadores pró-inflamatórios por células do sistema imune inato induzem uma resposta inflamatória capaz de eliminar o patógeno e por fim retornar a homeostase através do processo resolutivo e do reparo do tecido (Janeway *et al.* 2006). No entanto, a ativação excessiva do sistema imune ou uma resolução ineficaz podem acarretar dano tecidual irreversível e, até mesmo, morte do organismo infectado (Strieter, Belperio e Keane, 2002; Damjanovic *et al.*, 2013). Nesse sentido, a gravidade da pneumonia tem correlação direta com a resposta inflamatória desencadeada pelo patógeno nos pulmões e é caracterizada pelo intenso influxo de neutrófilos e acúmulo de exsudato que preenchem as vias aéreas levando a significativo dano pulmonar e diminuição das trocas gasosas (Dockrell, Whyte e Mitchell, 2012; Driver, 2012).

O presente trabalho padronizou um modelo experimental de pneumonia pela bactéria *Streptococcus pneumoniae*, a causa mais comum das chamadas pneumonias adquiridas na comunidade (PAC) (Remington e Sliagl, 2014). O modelo murino de pneumonia pneumocócica mimetizou vários aspectos da doença, dentre eles a resposta inflamatória desencadeada pela infecção. Foi demonstrado que a inflamação é um determinante importante de morbidade e letalidade durante a infecção: os resultados mostraram o caráter inóculo dependente da resposta inflamatória, perda de peso e letalidade dos animais. Além disso, o modelo utilizado reproduziu bem alguns sinais relacionados à pneumonia, tais como: intenso recrutamento e ativação de neutrófilos, congestão dos capilares alveolares com acúmulo de exsudato e células inflamatórias o

que contribui para o dano pulmonar, diminuição das trocas gasosas e pode progredir para insuficiência respiratória (McCullers e Tuomanen, 2001; Driver, 2012).

Diversos sinais e vias de sinalização coordenam todo o desenvolvimento da resposta inflamatória. Uma integração eficiente dos muitos sinais extracelulares e intracelulares é necessária para uma resposta adequada e autolimitante frente ao patógeno ou estímulo inflamatório (Maurice *et al.*, 2014). Dentre os mensageiros intracelulares envolvidos na inflamação, o cAMP tem um papel importante na modulação do processo inflamatório. As fosfodiesterases (PDEs) são as enzimas responsáveis por regular os níveis dos nucleotídeos cíclicos nas células e, em leucócitos, a PDE4 é a principal isozima catalisadora da hidrólise do cAMP para a sua forma inativa AMP. Inibidores seletivos de PDE4 são anti-inflamatórios eficientes levando à supressão da transcrição de genes de mediadores pró-inflamatórios (Kumar *et al.*, 2013), induzindo a apoptose de neutrófilos (Sousa *et al.*, 2010) e diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (Jin, Ding e Lin, 2012). Além disso, a inibição de PDE4 protege do dano tecidual em diversos modelos animais (Bao *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2011). Dessa forma, essa classe de drogas foi extensivamente estudada para o tratamento de doenças inflamatórias como a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), Alzheimer, entre outras (Garcia-Osta *et al.*, 2012); (Schafer e Day, 2013); (Wittmann e Helliwell, 2013). Entretanto, o seu uso durante a pneumonia pneumocócica não havia sido descrito.

A pneumonia é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento, sendo responsável por 15% das mortes infantis (OMS, 2014). Apesar da disponibilidade de antibióticos e vacinas, o número de hospitalizações devidas às doenças pneumocócicas continua alto. A hipótese estudada no presente trabalho foi de que a modulação da resposta inflamatória, através da inibição da PDE4, poderia ser benéfica durante a pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*. De fato, o tratamento com rolipram foi capaz de prevenir o dano pulmonar resultante da infecção e diminuir os níveis de mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento de neutrófilos para os pulmões.

Os neutrófilos são componentes essenciais do sistema imune inato e são as primeiras células a serem recrutadas para os pulmões durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Após a infecção com o inóculo de 10^4 CFU foi observado

grande produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas durante as primeiras horas. As quimiocinas CXCL2/MIP-2 e CXCL1/KC apresentaram-se aumentadas após 12, 24 e 48 horas da infecção, coincidindo com o intenso infiltrado neutrofílico com pico em 24 horas. Ao atingirem o parênquima pulmonar, os neutrófilos secretam espécies reativas de oxigênio, proteases e outras substâncias antimicrobianas importantes para a morte da bactéria (Hahn *et al.*, 2011). De fato, a depleção dos neutrófilos durante a pneumonia pneumocócica facilita a multiplicação dos pneumococos e aumenta a letalidade em camundongos infectados (Garvy e Harmsen, 1996; Hahn *et al.*, 2011). Entretanto, uma vez ativadas de forma exagerada, essas células podem levar a intenso dano tecidual aumentando a intensidade do processo inflamatório (Lehrer *et al.*, 1988). De forma interessante, alguns estudos correlacionam a maior susceptibilidade ao desenvolvimento de pneumonia em idosos, com o maior recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas e pulmões (Pignatti *et al.*, 2011; Menter *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que em modelos murinos, a resolução ou modulação da inflamação aguda desencadeada por *S. pneumoniae* está relacionada a um menor dano tecidual e aumento na sobrevivência dos animais infectados (Burns, Abadi e Pirofski, 2005; Marks *et al.*, 2007; Bou Ghanem *et al.*, 2015). Dessa forma, uma regulação fina do desenvolvimento e resolução da resposta inflamatória neutrofílica após e durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae* é necessária para o balanço entre *clearance* da bactéria e retorno à homeostase. Nesse sentido, uma única dose de rolipram foi capaz de diminuir os níveis das quimiocinas CXCL2/MIP-2 e CCL2/MCP-1, bem como o reduzir significativamente o recrutamento de neutrófilos para os pulmões e vias aéreas, sem alterar a capacidade de o hospedeiro lidar com a infecção.

Além do papel dos quimioatraentes, o recrutamento de neutrófilos para os pulmões e a ativação dessas células durante a infecção envolve ativação do endotélio e epitélio e expressão de receptores e moléculas adesão (Janeway *et al.* 2006). Nesse sentido, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 são importantes. Durante o modelo de pneumonia apresentado no presente trabalho, níveis elevados de ambas as citocinas foram observados após a infecção por *S. pneumoniae*. O reconhecimento de componentes bacterianos pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e a consequente produção de TNF- e IL-6 por macrófagos alveolares levam à ativação das células do endotélio e epitélio pulmonar pela iniciação da cascata de sinalização que

culmina com a ativação de NFκB (Koppe, Suttorp e Opitz, 2012). A ativação desse fator de transcrição resulta em maior expressão de proteínas como o receptor polimérico de imunoglobulina (pIgR) e o receptor do fator de ativação plaquetária (PAFR) (Mutoh *et al.*, 1994; Bruno e Kaetzel, 2005). Tais receptores, além de serem importantes na sinalização e ativação de vias pró-inflamatórias, estão relacionados ao estabelecimento e aumento de invasividade da bactéria (Bogaert, De Groot e Hermans, 2004) uma vez que os pneumococos utilizam proteínas da superfície bacteriana (a adesina CbpA e a proteína da parede celular ChoP) para se ligar a esses receptores, se estabelecer no epitélio pulmonar e invadir outros tecidos (Cundell *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000). Dessa forma, a produção exagerada desses mediadores é maléfica durante a pneumonia pneumocócica. O tratamento com rolipram também reduziu os níveis de ambas as citocinas o que reforça a hipótese de que a inibição da enzima PDE4 pode ser interessante estratégia farmacológica durante a pneumonia pneumocócica.

O papel dos inibidores de PDE4 e o aumento de cAMP durante as infecções é controverso. Em um modelo de infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae* foi observado um efeito deletério do tratamento com rolipram (Soares *et al.*, 2003). Soares e colaboradores sugeriram que o tratamento com rolipram prejudica a capacidade de defesa do hospedeiro frente a uma infecção por *K. pneumoniae*. Ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho, a administração de rolipram levou a um aumento no número de neutrófilos recrutados e no número de bactérias nas vias aéreas (Soares *et al.*, 2003). As diferenças observadas podem ser devidas à grande diferença entre bactérias Gram-negativas (como *K. pneumoniae*) e bactérias Gram-positivas (como *S. pneumoniae*). Os autores discutem que o aumento do número de neutrófilos poderia ser devido ao aumento dos níveis de outras citocinas e quimiocinas (as quais não foram analisadas no trabalho) após o tratamento com rolipram. O LPS presente na parede das bactérias Gram-negativas é um potente ativador do sistema imune e leva a uma resposta inflamatória bastante exacerbada (March *et al.*, 2013), dessa forma seria possível que o tratamento com rolipram não seria eficaz para controlar tal inflamação. Além disso, Soares e colaboradores verificaram um aumento nos níveis da citocina IL-10 após o tratamento com rolipram, o que poderia resultar em uma menor responsividade dos neutrófilos recrutados. Durante o presente estudo, não verificamos o mesmo aumento de

IL-10 após o tratamento com rolipram, o que poderia explicar, em parte, a diferença observada entre os trabalhos.

Outro trabalho, em contrapartida, mostrou que o tratamento com rolipram foi benéfico durante a infecção com *Pseudomonas aeruginosa* uma vez que diminuiu a aderência da bactéria na mucosa respiratória e preveniu o dano tecidual (Dowling *et al.*, 1997). Dessa forma, esse último estudo vai de acordo com os resultados encontrados durante o presente trabalho. No entanto, novos estudos utilizando outra bactéria Gram-negativa causadora de pneumonia, como por exemplo, *Haemophilus influenza*, seriam interessantes para comprovar a hipótese sugerida.

A modulação da resposta inflamatória no contexto das infecções tem sido apontada como promissora estratégia terapêutica, principalmente quando associada ao uso de antibióticos. (Spite *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2012; Hoogendijk *et al.*, 2012). A antibioticoterapia é o tratamento de escolha para as doenças pneumocócicas, inclusive a pneumonia (Esposito e Principi, 2013). Apesar do uso de antibióticos, a mortalidade associada à pneumonia adquirida na comunidade ainda permanece substancialmente elevada. Uma das razões está relacionada à liberação de componentes microbianos das bactérias mortas que podem hiperestimular o sistema imune e exacerbar a resposta inflamatória desencadeada nos pulmões (Karlstrom *et al.*, 2011; Ghoneim e Mccullers, 2014). Nesse sentido, a associação de terapia imunomodulatória pode ser benéfica. Uma vez que o tratamento com rolipram não reduziu a letalidade dos animais infectados, a próxima hipótese a ser investigada seria se a associação com um antimicrobiano poderia combinar o benefício da modulação da resposta inflamatória à redução do número de bactérias no pulmão dos animais. Para tanto, um modelo de pneumonia grave (10^5 CFU de *S. pneumoniae*) foi utilizado e observou-se que a associação de ceftriaxona, um antimicrobiano frequentemente usado na clínica, com rolipram foi capaz de melhorar a resposta do hospedeiro e prevenir dano tecidual. O tratamento com o antibiótico realizado de forma isolada diminuiu o número de bactérias presentes nas vias aéreas dos camundongos infectados, mas não diminuiu a inflamação ou o dano pulmonar associado. Em contrapartida, o tratamento combinado de ceftriaxona e rolipram melhorou o *clearance* bacteriano, diminuiu o recrutamento de neutrófilos e produção de mediadores pró-inflamatórios, e preveniu o dano pulmonar. Em adição, a combinação das drogas foi capaz de restaurar a função pulmonar dos camundongos infectados com

S. pneumoniae. As alterações observadas na mecânica pulmonar resultam do intenso exsudado inflamatório que preenche os alvéolos e do edema pulmonar que dificultam a inflação dos pulmões após a infecção (Light, 1999; Wright *et al.*, 1999). Dessa forma, a proposta do tratamento combinado de rolipram e ceftriaxona durante a infecção é interessante uma vez que a insuficiência respiratória é uma das causas de morte durante a pneumonia pneumocócica (Burgos *et al.*, 2014).

Além de diminuir a resposta inflamatória, prevenir dano e restaurar a função pulmonar, o tratamento combinado de rolipram e ceftriaxona aumentou a fagocitose das bactérias pelos macrófagos e aumentou a expressão da proteína Anexina A1 (AnxA1). A Anexina A1 é uma proteína regulada por glicocorticóide conhecida por seu papel antiinflamatório e pró-resolutivo. O papel dessa proteína durante as infecções é pouco explorado. Estudos recentes demonstraram que AnxA1 aumenta a fagocitose de bactérias e previne o dano tecidual em um modelo de sepse em camundongos (Gobbetti *et al.*, 2014). Em adição, a ausência do receptor para AnxA1 diminui a fagocitose e *clearance* bacteriano e o tratamento com o peptídeo Ac₂₋₅₀, que contém a porção ativa da AnxA1, previne o dano cardíaco e renal associados à sepse. Além disso, outro estudo demonstrou que na ausência de AnxA1 há formação exacerbada de granulomas durante a infecção com *Mycobacterium tuberculosis*, bem como menor controle da proliferação da bactéria (Vanessa *et al.*, 2014). Em reforço a esses dados, os resultados obtidos durante o presente trabalho sugerem que um possível mecanismo para o aumento da fagocitose observado após o tratamento com combinação das drogas pode ser via aumento na expressão e na estabilidade da proteína AnxA1. De fato, camundongos nocautes para Anexina A1 apresentaram 100% de letalidade durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae* o que sugere um papel importante dessa proteína durante a pneumonia. Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais AnxA1 contribui para a resposta contra *S. pneumoniae*.

Durante as primeiras horas da infecção por *Streptococcus pneumoniae*, o recrutamento massivo de neutrófilos armados com proteases leva a intensa clivagem da Anexina A1 para a sua forma inativa. Esse processo pode ser entendido como um mecanismo que neutraliza as funções antiinflamatórias da AnxA1 tais como a apoptose dos neutrófilos (Vago *et al.*, 2012) e desligamento dessas células do endotélio vascular (Perretti e D'acquisto, 2009). Essa hipótese é sustentada pelo estudo que mostra a

correlação direta entre a inflamação durante a fibrose cística e a clivagem de AnxA1 (Tsao *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado que AnxA1 mutada resistente a clivagem é capaz de manter sua ação antiinflamatória por mais tempo comparada com a sua forma não mutada (Pederzoli-Ribeil *et al.*, 2010). Em concordância com esses estudos, a cinética da expressão de Anexina A1 durante a infecção pode ser associada ao recrutamento de neutrófilos nos pulmões. Após 24 horas de infecção com 10^4 CFU de *S. pneumoniae* toda a Anexina A1 aparece clivada. Somente após 96 horas, tempo no qual o número de neutrófilos retornou ao basal, é possível observar a presença de AnxA1 intacta no pulmão dos animais infectados. O tratamento combinado de ceftriaxona e rolipram preveniu quase completamente a clivagem da Anexina A1 restaurando os níveis basais dessa proteína no pulmão. De forma interessante, um estudo recente mostrou que, durante a infecção de babuínos com *Streptococcus pneumoniae*, há desregulação da produção de mediadores pró-resolutivos específicos (SPMs) tais como a AnxA1, o que poderia estar correlacionado ao desenvolvimento de pneumonia grave (Dalli *et al.*, 2015). Nesse sentido, a inibição de PDE4 poderia restaurar parcialmente os programas de resolução alterados durante a pneumonia pneumocócica que estariam levando a uma resposta inflamatória exacerbada. Em acordo com essa hipótese, Chiang e colaboradores (Chiang *et al.*, 2012) demonstraram que a enzima PDE4 aumentada em macrófagos infectados com a bactéria *Escherichia coli* tem sua expressão diminuída quando estas células foram incubadas com resolvina D5 (um mediador lipídico pró-resolutivo). Dessa forma, pode ser sugerido que as vias de sinalização ativadas pelos mediadores pró-resolutivos estão relacionadas ao controle da PDE4 e dessa forma essa rede de sinais pode ser alterada farmacologicamente para uma melhor recuperação durante a pneumonia pneumocócica.

Esses resultados indicam que a associação de rolipram com ceftriaxona como estratégia terapêutica imunomodulatória, pode ser benéfica através do estabelecimento de um balanço entre um *clearance* bacteriano eficiente nos pulmões e proteção ao dano pulmonar causado pela infecção com *S. pneumoniae*.

6 – Conclusão

Os dados apresentados demonstram a importância da inflamação na patogenia da infecção por *Streptococcus pneumoniae* e como a modulação da via de PDE4 pode representar uma estratégia promissora de tratamento da pneumonia. O bloqueio seletivo da PDE4, principalmente em associação ao tratamento com antimicrobiano, mostrou-se capaz de diminuir a inflamação, controlar o dano e disfunção pulmonar relacionado à pneumonia e aumentar a fagocitose de bactérias possivelmente devido ao aumento na expressão e estabilidade da Anexina A1. Estudos mais aprofundados serão necessários como prova de conceito para elucidar se tratamentos, como o sugerido no presente trabalho, são também benéficos para humanos com pneumonia pneumocócica.

Referências Bibliográficas

ABEYTA, M.; HARDY, G. G.; YOTHER, J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, p. 218-25, Jan 2003. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496169>>.

AHL, J. et al. High incidence of septic shock caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3--a retrospective epidemiological study. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 492, 2013. ISSN 1471-2334 (Electronic)

1471-2334 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24148181>>.

ALBIGER, B. et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 633-44, Mar 2007. ISSN 1462-5814 (Print)

1462-5814 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17004992>>.

ANDRADE, A. L. et al. Population-based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in Goiania, Brazil. **Vaccine**, v. 30, n. 10, p. 1901-9, Feb 27 2012. ISSN 1873-2518 (Electronic)

0264-410X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178522>>.

ANGEL, C. S.; RUZEK, M.; HOSTETTER, M. K. Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect Dis**, v. 170, n. 3, p. 600-8, Sep 1994. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8077717>>.

ARNOLD, F. W. et al. Hospitalization for community-acquired pneumonia: the pneumonia severity index vs clinical judgment. **Chest**, v. 124, n. 1, p. 121-4, Jul 2003. ISSN 0012-3692 (Print)

0012-3692 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853513>>.

AUSTRIAN, R. A brief history of pneumococcal vaccines. **Drugs Aging**, v. 15 Suppl 1, p. 1-10, 1999. ISSN 1170-229X (Print)
1170-229X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690790>>.

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. ISSN 0022-1899 (Print)
0022-1899 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588176>>.

BAO, F. et al. A selective phosphodiesterase-4 inhibitor reduces leukocyte infiltration, oxidative processes, and tissue damage after spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 28, n. 6, p. 1035-49, Jun 2011. ISSN 1557-9042 (Electronic)
0897-7151 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21355819>>.

BENDER, J. M. et al. Pneumococcal necrotizing pneumonia in Utah: does serotype matter? **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 9, p. 1346-52, May 1 2008. ISSN 1537-6591 (Electronic)
1058-4838 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419434>>.

BHOWMICK, R. et al. Systemic disease during Streptococcus pneumoniae acute lung infection requires 12-lipoxygenase-dependent inflammation. **J Immunol**, v. 191, n. 10, p. 5115-23, Nov 15 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24089193>>.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 144-54, Mar 2004. ISSN 1473-3099 (Print)
1473-3099 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998500>>.

BOU GHANEM, E. N. et al. The alpha-Tocopherol Form of Vitamin E Reverses Age-Associated Susceptibility to Streptococcus pneumoniae Lung Infection by Modulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. **J Immunol**, v. 194, n. 3, p. 1090-9, Feb 1 2015. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512603>>.

BRANDILEONE, M. C. et al. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 5, p. 567-74, May 2006. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585644> >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 5 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782> >.

BROWN, J. S. et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 26, p. 16969-74, Dec 24 2002. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477926> >.

BRUNO, M. E.; KAETZEL, C. S. Long-term exposure of the HT-29 human intestinal epithelial cell line to TNF causes sustained up-regulation of the polymeric Ig receptor and proinflammatory genes through transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **J Immunol**, v. 174, n. 11, p. 7278-84, Jun 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905574> >.

BURGOS, J. et al. Risk factors for respiratory failure in pneumococcal pneumonia: the importance of pneumococcal serotypes. **Eur Respir J**, v. 43, n. 2, p. 545-53, Feb 2014. ISSN 1399-3003 (Electronic) 0903-1936 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845720> >.

BURNS, T.; ABADI, M.; PIROFSKI, L. A. Modulation of the lung inflammatory response to serotype 8 pneumococcal infection by a human immunoglobulin m monoclonal antibody to serotype 8 capsular polysaccharide. **Infect Immun**, v. 73, n. 8, p. 4530-8, Aug 2005. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040964> >.

CAIERAO, J. et al. Serotypes and genotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* before and after PCV10 implementation in southern Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111129, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356595> >.

CALBO, E.; GARAU, J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, n. 2, p. 107-13, Feb 2010. ISSN 1872-7913 (Electronic)

0924-8579 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005681>>.

CALIX, J. J. et al. Differential occurrence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 11E between asymptomatic carriage and invasive pneumococcal disease isolates reflects a unique model of pathogen microevolution. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 794-9, Mar 2012. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22267713>.

CHIANG, N. et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 524-8, Apr 26 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22538616>>.

CONFALONIERI, M. et al. Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: a preliminary randomized study. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 3, p. 242-8, Feb 1 2005. ISSN 1073-449X (Print)

1073-449X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557131>>.

CORRALES-MEDINA, V. F.; MUSER, D. M. Immunomodulatory agents in the treatment of community-acquired pneumonia: a systematic review. **J Infect**, v. 63, n. 3, p. 187-99, Sep 2011. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763343>>.

CORRÊA, R.A.; LUNDGREN, F.L.C; PEREIRA-SILVA, J.L. Diretriz LFeSGT. Diretrizes brasileiras para a pneumonia adquirida na comunidade em adultos imunocompetentes - 2009. *J. Bras Pneumol.* 2009;35(6): 574-601

CUNDELL, D. R. et al. PAF receptor anchors *Streptococcus pneumoniae* to activated human endothelial cells. **Adv Exp Med Biol**, v. 416, p. 89-94, 1996. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131132>>.

CUNDELL, D. R. et al. Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 435-8, Oct 5 1995. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7566121> >.

D'AMICO, M. et al. Lipocortin 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by affecting local leukocyte recruitment. **FASEB J**, v. 14, n. 13, p. 1867-9, Oct 2000. ISSN 0892-6638 (Print)
0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023969> >.

DAGAN, R. et al. Seasonality of antibiotic-resistant streptococcus pneumoniae that causes acute otitis media: a clue for an antibiotic-restriction policy? **J Infect Dis**, v. 197, n. 8, p. 1094-102, Apr 15 2008. ISSN 0022-1899 (Print)
0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419528> >.

DALLI, J. et al. Proresolving Lipid Mediator Profiles in Baboon Pneumonia are Regulated by Inhaled Carbon Monoxide. **Am J Respir Cell Mol Biol**, Jan 8 2015. ISSN 1535-4989 (Electronic)
1044-1549 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568926> >.

DAMJANOVIC, D. et al. Marked improvement of severe lung immunopathology by influenza-associated pneumococcal superinfection requires the control of both bacterial replication and host immune responses. **Am J Pathol**, v. 183, n. 3, p. 868-80, Sep 2013. ISSN 1525-2191 (Electronic)
0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831294> >.

DE LENCASTRE, H. et al. Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of Streptococcus pneumoniae colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. **Microb Drug Resist**, v. 5, n. 1, p. 19-29, Spring 1999. ISSN 1076-6294 (Print)
1076-6294 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10332718> >.

DIAMANT, Z.; SPINA, D. PDE4-inhibitors: a novel, targeted therapy for obstructive airways disease. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 24, n. 4, p. 353-60, Aug 2011. ISSN 1522-9629 (Electronic)

1094-5539 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255672>>.

DOCKRELL, D. H.; WHYTE, M. K.; MITCHELL, T. J. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. **Chest**, v. 142, n. 2, p. 482-91, Aug 2012. ISSN 1931-3543 (Electronic)

0012-3692 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871758>>.

DOMINGUES, C. M. et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **Lancet Respir Med**, v. 2, n. 6, p. 464-71, Jun 2014. ISSN 2213-2619 (Electronic)

2213-2600 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726406>>.

DONKOR, E. S. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 7, 2013. ISSN 2235-2988 (Electronic)

2235-2988 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471303>>.

DOS SANTOS, G.; KUTUZOV, M. A.; RIDGE, K. M. The inflammasome in lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 303, n. 8, p. L627-33, Oct 15 2012. ISSN 1522-1504 (Electronic)

1040-0605 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22904168>>.

DOSHI, S. M. et al. The impact of statin and macrolide use on early survival in patients with pneumococcal pneumonia. **Am J Med Sci**, v. 345, n. 3, p. 173-7, Mar 2013. ISSN 1538-2990 (Electronic)

0002-9629 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23111390>>.

DOWLING, R. B. et al. The effect of rolipram, a type IV phosphodiesterase inhibitor, on *Pseudomonas aeruginosa* infection of respiratory mucosa. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282, n. 3, p. 1565-71, Sep 1997. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9316873> >.

DRIVER, C. Pneumonia part 1: Pathology, presentation and prevention. **Br J Nurs**, v. 21, n. 2, p. 103-6, Jan 26-Feb 8 2012. ISSN 0966-0461 (Print)

0966-0461 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306639>>.

ERDOGAN, S. et al. The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. **Res Vet Sci**, v. 84, n. 1, p. 18-25, Feb 2008. ISSN 0034-5288 (Print) 0034-5288 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17397885> >.

ESPOSITO, S. et al. Antibiotic therapy for pediatric community-acquired pneumonia: do we know when, what and for how long to treat? **Pediatr Infect Dis J**, v. 31, n. 6, p. e78-85, Jun 2012. ISSN 1532-0987 (Electronic) 0891-3668 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466326> >.

ESPOSITO, S.; PRINCIPI, N. Pharmacotherapy for pneumococcal infections: an update. **Expert Opin Pharmacother**, v. 14, n. 1, p. 65-77, Jan 2013. ISSN 1744-7666 (Electronic) 1465-6566 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23256539> >.

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. ISSN 1744-8395 (Electronic) 1476-0584 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170992> >.

FELDMAN, C.; ANDERSON, R. New insights into pneumococcal disease. **Respirology**, v. 14, n. 2, p. 167-79, Mar 2009. ISSN 1440-1843 (Electronic) 1323-7799 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19272081> >.

_____. Bacteraemic pneumococcal pneumonia: current therapeutic options. **Drugs**, v. 71, n. 2, p. 131-53, Jan 22 2011. ISSN 0012-6667 (Print) 0012-6667 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21275443> >.

_____. Recent advances in our understanding of *Streptococcus pneumoniae* infection. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 82, 2014. ISSN 2051-7599 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25343039> >.

FRANCO, C. M. et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal Streptococcus pneumoniae isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, n. 1, p. 77-9, Jan 2010. ISSN 1532-0987 (Electronic) 0891-3668 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935117> >.

FULLER, J. D.; MCGEER, A.; LOW, D. E. Drug-resistant pneumococcal pneumonia: clinical relevance and approach to management. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 24, n. 12, p. 780-8, Dec 2005. ISSN 0934-9723 (Print) 0934-9723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16344922> >.

GARCIA-OSTA, A. et al. Phosphodiesterases as therapeutic targets for Alzheimer's disease. **ACS Chem Neurosci**, v. 3, n. 11, p. 832-44, Nov 21 2012. ISSN 1948-7193 (Electronic) 1948-7193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23173065> >.

GARCIA, C. C. et al. Complement C5 activation during influenza A infection in mice contributes to neutrophil recruitment and lung injury. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64443, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696894> >.

GARVY, B. A.; HARMSEN, A. G. The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice. **Inflammation**, v. 20, n. 5, p. 499-512, Oct 1996. ISSN 0360-3997 (Print) 0360-3997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894714> >.

GHONEIM, H. E.; MCCULLERS, J. A. Adjunctive corticosteroid therapy improves lung immunopathology and survival during severe secondary pneumococcal pneumonia in mice. **J Infect Dis**, v. 209, n. 9, p. 1459-68, May 1 2014. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273183> >.

GOBBETTI, T. et al. Nonredundant protective properties of FPR2/ALX in polymicrobial murine sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 52, p. 18685-90, Dec 30 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512512> >.

HAHN, I. et al. Cathepsin G and neutrophil elastase play critical and nonredundant roles in lung-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* in mice. **Infect Immun**, v. 79, n. 12, p. 4893-901, Dec 2011. ISSN 1098-5522 (Electronic) 0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911460> >.

HAMAMOTO, M. et al. Phosphodiesterase type 4 inhibitor prevents acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in a rat model. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 25, n. 5, p. 833-8, May 2004. ISSN 1010-7940 (Print) 1010-7940 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15082290> >.

HARRIS, M. et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. **Thorax**, v. 66 Suppl 2, p. ii1-23, Oct 2011. ISSN 1468-3296 (Electronic) 0040-6376 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903691> >.

HAUSDORFF, W. P. et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 100-21, Jan 2000. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10619740 >.

HAUSDORFF, W. P.; FEIKIN, D. R.; KLUGMAN, K. P. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 2, p. 83-93, Feb 2005. ISSN 1473-3099 (Print) 1473-3099 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15680778> >.

HOOGENDIJK, A. J. et al. R-roscovitine reduces lung inflammation induced by lipoteichoic acid and *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Med**, v. 18, p. 1086-95, 2012. ISSN 1528-3658 (Electronic) 1076-1551 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22692577 >.

HOUSLAY, M. D. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 2, p. 91-100, Feb 2010. ISSN 0968-0004 (Print)

0968-0004 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864144> >.

HUSSAIN, M. et al. A longitudinal household study of Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal carriage in a UK setting. **Epidemiol Infect**, v. 133, n. 5, p. 891-8, Oct 2005. ISSN 0950-2688 (Print)

0950-2688 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16181510> >.

HYAMS, C. et al. The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. **Infect Immun**, v. 78, n. 2, p. 704-15, Feb 2010. ISSN 1098-5522 (Electronic)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19948837> >.

JANEWAY, C.A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6ª ed. Artmed, 2006

JIN, S. L.; DING, S. L.; LIN, S. C. Phosphodiesterase 4 and its inhibitors in inflammatory diseases. **Chang Gung Med J**, v. 35, n. 3, p. 197-210, May-Jun 2012. ISSN 2309-835X (Electronic)

2072-0939 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735051> >.

KADIOGLU, A. et al. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 288-301, Apr 2008. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18340341 >.

KARLSTROM, A. et al. Toll-like receptor 2 mediates fatal immunopathology in mice during treatment of secondary pneumococcal pneumonia following influenza. **J Infect Dis**, v. 204, n. 9, p. 1358-66, Nov 2011. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900488> >.

KIRBY, A. C.; RAYNES, J. G.; KAYE, P. M. The role played by tumor necrosis factor during localized and systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect Dis**, v. 191, n. 9, p. 1538-47, May 1 2005. ISSN 0022-1899 (Print)
0022-1899 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809914> >.

KOEGELENBERG, C. F.; DIACON, A. H.; BOLLIGER, C. T. Parapneumonic pleural effusion and empyema. **Respiration**, v. 75, n. 3, p. 241-50, 2008. ISSN 1423-0356 (Electronic)
0025-7931 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367849> >.

KOO, M. S. et al. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces innate immunity and improves isoniazid clearance of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs of infected mice. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17091, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364878> >.

KOPPE, U.; SUTTORP, N.; OPITZ, B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 4, p. 460-6, Apr 2012. ISSN 1462-5822 (Electronic)
1462-5814 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212419> >.

KUMAR, N. et al. Phosphodiesterase 4-targeted treatments for autoimmune diseases. **BMC Med**, v. 11, p. 96, 2013. ISSN 1741-7015 (Electronic)
1741-7015 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23557064> >.

LEHRER, R. I. et al. Neutrophils and host defense. **Ann Intern Med**, v. 109, n. 2, p. 127-42, Jul 15 1988. ISSN 0003-4819 (Print)
0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3289431> >.

LETIEMBRE, M. et al. Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 8397-401, Dec 2005. ISSN 0019-9567 (Print)
0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16299338> >.

LIGHT, R. B. Pulmonary pathophysiology of pneumococcal pneumonia. **Semin Respir Infect**, v. 14, n. 3, p. 218-26, Sep 1999. ISSN 0882-0546 (Print)

0882-0546 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501309> >.

MALLEY, R. Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. **J Mol Med (Berl)**, v. 88, n. 2, p. 135-42, Feb 2010. ISSN 1432-1440 (Electronic)

0946-2716 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20049411> >.

MALLEY, R. et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1966-71, Feb 18 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569171> >.

MAMMADOV, E. et al. Protective effects of phosphodiesterase-4-specific inhibitor rolipram on acute ischemia-reperfusion injury in rat kidney. **Urology**, v. 80, n. 6, p. 1390 e1-6, Dec 2012. ISSN 1527-9995 (Electronic)

0090-4295 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23010343> >.

MANDELL, L. A. et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. **Clin Infect Dis**, v. 44 Suppl 2, p. S27-72, Mar 1 2007. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17278083> >.

MANNING, C. D. et al. Suppression of human inflammatory cell function by subtype-selective PDE4 inhibitors correlates with inhibition of PDE4A and PDE4B. **Br J Pharmacol**, v. 128, n. 7, p. 1393-8, Dec 1999. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602317> >.

MANTESE, O. C. et al. [Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of *Streptococcus pneumoniae*]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 79, n. 6, p. 537-42, Nov-Dec 2003. ISSN 0021-7557 (Print)

0021-7557 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685452> >.

MARCH, C. et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56847, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457627> >.

MARKS, M. et al. Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice. **Infect Immun**, v. 75, n. 4, p. 1586-97, Apr 2007. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296760> >.

MARRIOTT, H. M. et al. Interleukin-1beta regulates CXCL8 release and influences disease outcome in response to *Streptococcus pneumoniae*, defining intercellular cooperation between pulmonary epithelial cells and macrophages. **Infect Immun**, v. 80, n. 3, p. 1140-9, Mar 2012. ISSN 1098-5522 (Electronic)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158745> >.

MARTIN-LOECHES, I. et al. Combination antibiotic therapy with macrolides improves survival in intubated patients with community-acquired pneumonia. **Intensive Care Med**, v. 36, n. 4, p. 612-20, Apr 2010. ISSN 1432-1238 (Electronic)

0342-4642 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19953222> >.

MAURICE, D. H. et al. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 4, p. 290-314, Apr 2014. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687066> >.

MCCULLERS, J. A.; TUOMANEN, E. I. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Front Biosci**, v. 6, p. D877-89, Aug 1 2001. ISSN 1093-9946 (Print)

1093-4715 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502489> >.

MCNEELA, E. A. et al. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 11, p. e1001191, 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085613> >.

MENTER, T. et al. Characterization of the inflammatory infiltrate in Streptococcus pneumoniae pneumonia in young and elderly patients. **Pathobiology**, v. 81, n. 3, p. 160-7, 2014. ISSN 1423-0291 (Electronic)
1015-2008 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751977> >.

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 5, p. 411-8, May 2010. ISSN 1469-0691 (Electronic)
1198-743X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132250> >.

MURRAY, P.R et.al. Microbiologia Médica. 6ª Edição. Editora Elsevier/Medicina Nacionais, 2010. 960 pgs.

MOFFITT, K. L.; MALLEY, R. Next generation pneumococcal vaccines. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 3, p. 407-13, Jun 2011. ISSN 1879-0372 (Electronic)
0952-7915 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514128> >.

MORTALITY, G. B. D.; CAUSES OF DEATH, C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 385, n. 9963, p. 117-71, Jan 10 2015. ISSN 1474-547X (Electronic)
0140-6736 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530442> >.

MUSHER, D. M. Infections caused by Streptococcus pneumoniae: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. **Clin Infect Dis**, v. 14, n. 4, p. 801-7, Apr 1992. ISSN 1058-4838 (Print)
1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1576274> >.

MUSHER, D. M.; THORNER, A. R. Community-acquired pneumonia. **N Engl J Med**, v. 371, n. 17, p. 1619-28, Oct 23 2014. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25337751> >.

MUTOH, H. et al. Platelet-activating factor (PAF) positively auto-regulates the expression of human PAF receptor transcript 1 (leukocyte-type) through NF-kappa B.

Biochem Biophys Res Commun, v. 205, n. 2, p. 1137-42, Dec 15 1994. ISSN 0006-291X (Print)
0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7802642> >.

OLLIVER, M. et al. Immunomodulatory effects of vitamin D on innate and adaptive immune responses to *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect Dis**, v. 208, n. 9, p. 1474-81, Nov 1 2013. ISSN 1537-6613 (Electronic)
0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922371> >.

OMS. Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age. World Health Organization website, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib/en/> Acesso em Fevereiro 2015.

OMS, Pneumonia. World Health Organization website, 2014. Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>>. Acesso em Janeiro 2015.

OTTOSEN, J.; EVANS, H. Pneumonia: challenges in the definition, diagnosis, and management of disease. **Surg Clin North Am**, v. 94, n. 6, p. 1305-17, Dec 2014. ISSN 1558-3171 (Electronic)
0039-6109 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25440125> >.

PEDERZOLI-RIBEIL, M. et al. Design and characterization of a cleavage-resistant Annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4288-96, Nov 18 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705760> >.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104500> >.

PIGNATTI, P. et al. Age-related increase of airway neutrophils in older healthy nonsmoking subjects. **Rejuvenation Res**, v. 14, n. 4, p. 365-70, Aug 2011. ISSN 1557-8577 (Electronic)

1549-1684 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595513> >.

PITTET, L. F.; POSFAY-BARBE, K. M. Pneumococcal vaccines for children: a global public health priority. **Clin Microbiol Infect**, v. 18 Suppl 5, p. 25-36, Oct 2012. ISSN 1469-0691 (Electronic)

1198-743X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22862432> >.

Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 82, n. 12, p. 93-104, Mar 23 2007. ISSN 0049-8114 (Print)

0049-8114 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17380597> >.

POE, S. L. et al. STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. **Mucosal Immunol**, v. 6, n. 1, p. 189-99, Jan 2013. ISSN 1935-3456 (Electronic)

1933-0219 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22785228> >.

POEHLING, K. A. et al. Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. **JAMA**, v. 295, n. 14, p. 1668-74, Apr 12 2006. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609088> >.

RABE, K. F. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Br J Pharmacol**, v. 163, n. 1, p. 53-67, May 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232047> >.

RADIN, J. N. et al. beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of Streptococcus pneumoniae. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7827-35, Dec 2005. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16299272> >.

REIS, J. N. et al. Transmission of Streptococcus pneumoniae in an urban slum community. **J Infect**, v. 57, n. 3, p. 204-13, Sep 2008. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672297> >.

REMINGTON, L. T.; SLIGL, W. I. Community-acquired pneumonia. **Curr Opin Pulm Med**, v. 20, n. 3, p. 215-24, May 2014. ISSN 1531-6971 (Electronic) 1070-5287 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614242> >.

RIJNEVELD, A. W. et al. TNF-alpha compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. **J Immunol**, v. 167, n. 9, p. 5240-6, Nov 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673538> >.

RUSSO, R. C. et al. Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 40, n. 4, p. 410-21, Apr 2009. ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836137> >.

SAÚDE, M. D. Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/intro_pneumococica10_val_04_02_10_ver_final.pdf, Data de acesso: 15/08/2013 2010.

SCHAFER, P. H.; DAY, R. M. Novel systemic drugs for psoriasis: mechanism of action for apremilast, a specific inhibitor of PDE4. **J Am Acad Dermatol**, v. 68, n. 6, p. 1041-2, Jun 2013. ISSN 1097-6787 (Electronic) 0190-9622 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680197> >.

SCHRODER, N. W. et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. **J Biol Chem**, v. 278, n. 18, p. 15587-94, May 2 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594207> >.

SCOTT, J. A. et al. Serogroup-specific epidemiology of Streptococcus pneumoniae: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. **Clin Infect Dis**, v. 22, n. 6, p. 973-81, Jun 1996. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8783696> >.

SEZGI, C.; SENYIGIT, A. [A new alternative treatment in COPD: phosphodiesterase-4 inhibitors]. **Tuberk Toraks**, v. 59, n. 3, p. 285-90, 2011. ISSN 0494-1373 (Print) 0494-1373 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087527> >.

SHARIF, O. et al. The scavenger receptor CD36 downmodulates the early inflammatory response while enhancing bacterial phagocytosis during pneumococcal pneumonia. **J Immunol**, v. 190, n. 11, p. 5640-8, Jun 1 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23610144 >.

SOARES, A. C. et al. Impaired host defense to Klebsiella pneumoniae infection in mice treated with the PDE4 inhibitor rolipram. **Br J Pharmacol**, v. 140, n. 5, p. 855-62, Nov 2003. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585803> >.

SONG, J. Y.; NAHM, M. H.; MOSELEY, M. A. Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. **J Korean Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 4-15, Jan 2013. ISSN 1598-6357 (Electronic) 1011-8934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341706> >.

SORBARA, M. T.; PHILPOTT, D. J. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. **Immunol Rev**, v. 243, n. 1, p. 40-60, Sep 2011. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884166> >.

SOUSA, L. P. et al. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 4, p. 396-405, Aug 15 2009. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422809> >.

SOUSA, L. P. et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **J Leukoc Biol**, v. 87, n. 5, p. 895-904, May 2010. ISSN 1938-3673 (Electronic)
0741-5400 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103769> >.

SPINA, D. The potential of PDE4 inhibitors in respiratory disease. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 3, n. 3, p. 231-6, Sep 2004. ISSN 1568-010X (Print)
1568-010X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15379590> >.

SPITE, M. et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1287-91, Oct 29 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19865173 >.

STEEL, H. C. et al. Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 490346, 2013. ISSN 1466-1861 (Electronic)
0962-9351 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453422> >.

STRIETER, R. M.; BELPERIO, J. A.; KEANE, M. P. CXC chemokines in angiogenesis related to pulmonary fibrosis. **Chest**, v. 122, n. 6 Suppl, p. 298S-301S, Dec 2002. ISSN 0012-3692 (Print)
0012-3692 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475804> >.

SUBBIAN, S. et al. Phosphodiesterase-4 inhibition alters gene expression and improves isoniazid-mediated clearance of Mycobacterium tuberculosis in rabbit lungs. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002262, Sep 2011. ISSN 1553-7374 (Electronic)
1553-7366 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949656> >.

TELLERIA-ORRIOLS, J. J. et al. TLR2-TLR4/CD14 polymorphisms and predisposition to severe invasive infections by Neisseria meningitidis and Streptococcus pneumoniae. **Med Intensiva**, v. 38, n. 6, p. 356-62, Aug-Sep 2014. ISSN 1578-6749 (Electronic)

0210-5691 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24144680>>.

TOMLINSON, G. et al. TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. **J Immunol**, v. 193, n. 7, p. 3736-45, Oct 1 2014. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25172490>>.

TORPHY, T. J. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, n. 2, p. 351-70, Feb 1998. ISSN 1073-449X (Print) 1073-449X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476844>>.

TSAO, F. H. et al. Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 18, n. 1, p. 120-8, Jan 1998. ISSN 1044-1549 (Print) 1044-1549 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9448053>>.

TUOMANEN, E. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, n. 1, p. 35-9, Feb 1999. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10047549>>.

The United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO), Pneumonia: The forgotten killer of children. OMS report, 2006. Disponível em : <
[http://www.childinfo.org/files/Pneumonia The Forgotten Killer of Children.pdf](http://www.childinfo.org/files/Pneumonia%20The%20Forgotten%20Killer%20of%20Children.pdf)>.
Acesso em Janeiro de 2015.

VAGO, J. P. et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 2, p. 249-58, Aug 2012. ISSN 1938-3673 (Electronic) 0741-5400 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493082>>.

VANCE, R. E.; ISBERG, R. R.; PORTNOY, D. A. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. **Cell Host Microbe**, v. 6, n. 1, p. 10-21, Jul 23 2009. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616762> >.

VANDER TOP, E. A.; PERRY, G. A.; GENTRY-NIELSEN, M. J. A novel flow cytometric assay for measurement of in vivo pulmonary neutrophil phagocytosis. **BMC Microbiol**, v. 6, p. 61, 2006. ISSN 1471-2180 (Electronic)
1471-2180 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16836747> >.

VANESSA, K. H. et al. Absence of Annexin A1 impairs host adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis in vivo. **Immunobiology**, Dec 10 2014. ISSN 1878-3279 (Electronic)
0171-2985 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533809> >.

VILAR, J. et al. Radiology of bacterial pneumonia. **Eur J Radiol**, v. 51, n. 2, p. 102-13, Aug 2004. ISSN 0720-048X (Print)
0720-048X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246516> >.

WARTHA, F. et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect Streptococcus pneumoniae against neutrophil extracellular traps. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 1162-71, May 2007. ISSN 1462-5814 (Print)
1462-5814 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217430> >.

WATKINS, R. R.; LEMONOVICH, T. L. Diagnosis and management of community-acquired pneumonia in adults. **Am Fam Physician**, v. 83, n. 11, p. 1299-306, Jun 1 2011. ISSN 1532-0650 (Electronic)
0002-838X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21661712> >.

WHITSETT, J. A.; ALENGHAT, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. **Nat Immunol**, v. 16, n. 1, p. 27-35, Jan 2015. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25521682> >.

WITTMANN, M.; HELLIWELL, P. S. Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases. **Dermatol Ther**

(Heidelb), v. 3, n. 1, p. 1-15, Jun 2013. ISSN 2193-8210 (Print). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888251> >.

WITZENRATH, M. et al. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. **J Immunol**, v. 187, n. 1, p. 434-40, Jul 1 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646297> >.

WRIGHT, T. W. et al. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of Pneumocystis carinii pneumonia. **J Clin Invest**, v. 104, n. 9, p. 1307-17, Nov 1999. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10545529> >.

YENDE, S. et al. Preinfection systemic inflammatory markers and risk of hospitalization due to pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 172, n. 11, p. 1440-6, Dec 1 2005. ISSN 1073-449X (Print) 1073-449X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166617> >.

ZAR, H. J. et al. Pneumonia in low and middle income countries: progress and challenges. **Thorax**, v. 68, n. 11, p. 1052-6, Nov 2013. ISSN 1468-3296 (Electronic) 0040-6376 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956020> >.

ZHANG, J. R. et al. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. **Cell**, v. 102, n. 6, p. 827-37, Sep 15 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030626> >.