

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E  
TOXICOLÓGICAS**

**MARINA GOMES MACHADO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA ANEXINA A1 E DO SEU  
RECEPTOR FPR2 EM UM MODELO MURINO DE PNEUMONIA  
PNEUMOCÓCICA**

Belo Horizonte

2018

**MARINA GOMES MACHADO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA ANEXINA A1 E DO SEU  
RECEPTOR FPR2 EM UM MODELO MURINO DE PNEUMONIA  
PNEUMOCÓCICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas Área de concentração: Análises Clínicas

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa - UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira - UFMG

Belo Horizonte

2018

M149a Machado, Marina Gomes.  
Avaliação do papel da proteína anexina A1 e do seu receptor  
FPR2 em um modelo murino de pneumonia pneumocócica / Marina  
Gomes Machado. – 2018.  
92 f. : il.

Orientadora: Lirlândia Pires de Sousa.  
Coorientador: Mauro Martins Teixeira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises  
Clínicas e Toxicológicas.

1. Pneumonia – Teses. 2. Streptococcus pneumoniae –  
Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Infecções respiratórias – Teses. 5.  
Imunologia – Teses. I. Sousa, Lirlândia Pires de. II. Teixeira, Mauro  
Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de  
Farmácia. IV. Título.

CDD:616.24



## FOLHA DE APROVAÇÃO

### **Avaliação do papel da proteína anexina A1 e do seu receptor FPR2 em um modelo murino de pneumonia pneumocócica**

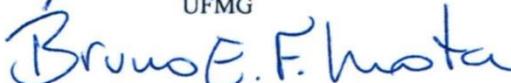
### **MARINA GOMES MACHADO**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Lirlândia Pires de Sousa – Orientadora (Participação à distância)  
UFMG

  
Prof. Mauro Martins Teixeira  
UFMG

  
Prof. Bruno Eduardo Fernandes Mota  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof. Caio Tavares Fagundes  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 7 de fevereiro de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos professores Lirlândia e Mauro por terem aceitado me orientar. À prof.<sup>a</sup> Lirlândia pelas ideias, pelas discussões científicas e pelo incentivo de sempre ir além, procurando entender e explicar cada resultado obtido. Ao prof. Mauro pela confiança e oportunidade de tocar outros projetos, por me permitir ir além dos objetivos propostos inicialmente e pela sensatez ao discutir resultados. Gostaria de agradecer imensamente a vocês, Mauro e a Landa, não só por me orientarem durante o desenvolvimento do projeto, mas também por contribuírem para meu crescimento pessoal. As conversas com vocês foram essenciais para definir meus próximos passos, obrigada!

À Luciana, que me “criou” e me jogou pro mundo em menos de um ano. Gostaria de te agradecer por tudo que você fez por mim ao longo desses 2 anos. Por cada conversa, por cada ideia, por empolgar tanto quanto eu ao pensarmos em algo novo para testar. Gostaria de agradecer também pelo “abandono”, suas idas para fora me fizeram crescer e me ensinaram a andar com minhas próprias pernas, mas sabendo que sua mão estava sempre estendida caso precisasse. Obrigada!

À Geovanna, que chegou no lab sem nenhuma experiência, mas cheia de boa vontade para aprender. Que dividiu comigo cada alegria e cada tristeza de experimentos que deram muito certo, ou muito errado. Gostaria de te agradecer muito pela companhia e ajuda nesses quase 2 anos, por todos experimentos que você ficou comigo até o final, pela seriedade que você encarou a iniciação científica e pelo respeito e amizade que construímos.

Aos meus amigos do SIB, que tornaram o dia a dia no lab muito mais leve, obrigada amigos pelos testes online, pelas conversas aleatórias e pelas discussões totalmente sem sentido, porém com muito embasamento.

Aos grupos do G3 e da Landa que me receberam de braços abertos no laboratório e me ajudaram muito com protocolos, experimentos, reagentes...

Ao Braulio, pelas inúmeras vezes que me ajudou em experimentos, pelas discussões científicas nas festinhas de família, pela ajuda na escrita, e pelo apoio e paciência nesta reta final.

À Polly, pela paciência em entender cada resultado para me ajudar com a análise estatística.

Ao Celso, pela ajuda com as análises histológicas e com as pranchas.

Aos meus pais, Márcio e Rita, por me guiarem e me apoiarem em todas as minhas decisões e pelo suporte dado para que eu pudesse concluir o mestrado.

Ao apoio técnico, Ilmãe, Hermes, Rose, Jamil, Gil, Ildinha por tornarem nosso trabalho possível. Por manterem o lab sempre organizado, prepararem soluções, autoclavarem materiais, auxiliarem no uso de equipamentos e por cuidarem dos animais.

Ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela oportunidade e à Andréia por toda ajuda com as matrículas e burocracias.

Agradeço também ao apoio financeiro das agências: CAPES, CNPq, FAPEMIG e PROGRAD.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Infecções no trato respiratório .....	17
1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	19
1.2.1. <u>Epidemiologia</u> .....	20
1.2.2. <u>Resposta imunológica</u> .....	22
1.2.3. <u>Prevenção e tratamento da infecção</u> .....	27
1.3. <b>Papel de Anexina A1 na inflamação</b> .....	30
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	34
2.1. <b>Objetivo geral</b> .....	35
2.1.1. <u>Objetivos específicos</u> .....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. <b>Animais</b> .....	36
3.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	36
3.3. <b>Infecção dos camundongos</b> .....	37
3.4. <b>Droga e esquema de tratamento</b> .....	37
3.5. <b>Acompanhamento da letalidade</b> .....	38
3.6. <b>Eutanásia e coleta das amostras para análise</b> .....	38
3.6.1. <u>Contagem de células e bactérias</u> .....	39
3.6.2. <u>Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO)</u> .....	40
3.6.3. <u>Dosagem de proteínas no BALF</u> .....	41
3.6.4. <u>Dosagem de citocinas por ELISA</u> .....	41
3.7. <b>Análise da função pulmonar</b> .....	42
3.8. <b>Ensaio de ROS</b> .....	42
3.9. <b>Avaliação histológica</b> .....	42
3.10. <b>Análises estatísticas</b> .....	43
4. RESULTADOS .....	44

<b>4.1. Animais deficientes para anexina A1 são mais susceptíveis à pneumonia por <i>Streptococcus pneumoniae</i></b> .....	44
4.1.1. <u>Anexina A1 é importante para a sobrevivência dos animais no modelo de pneumonia pneumocócica</u> .....	44
4.1.2. <u>Anexina A1 é importante para o controle do recrutamento celular e da carga bacteriana</u> .....	45
4.1.3. <u>Anexina A1 é importante para o controle da produção de citocinas</u> .....	46
4.1.4. <u>Anexina A1 é importante para o controle do dano tecidual, do infiltrado inflamatório e para a manutenção das funções pulmonares</u> ....	47
<b>4.2. Animais deficientes para FPR2/3 são mais susceptíveis à pneumonia por <i>Streptococcus pneumoniae</i></b> .....	50
4.2.1. <u>O receptor FPR2 é importante para a sobrevivência dos animais no modelo de pneumonia pneumocócica</u> .....	51
4.2.2. <u>O receptor FPR2 é importante para o controle do recrutamento celular e da carga bacteriana</u> .....	52
4.2.3. <u>O receptor FPR2 é importante para o controle dos níveis de citocinas</u> .....	53
4.2.4. <u>O receptor FPR2 é importante para o controle do infiltrado inflamatório e para a manutenção das funções pulmonares</u> .....	54
<b>4.3. Animais tratados com Ac2-26 apresentaram melhora no quadro de pneumonia pneumocócica grave</b> .....	57
4.3.1. <u>Animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução no recrutamento celular e na carga bacteriana</u> .....	57
4.3.2. <u>Animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução dos níveis de citocinas</u> .....	59
4.3.3. <u>Animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução do infiltrado inflamatório</u> .....	60
<b>4.4. Animais tratados com Ac2-26 e antibiótico apresentaram proteção à pneumonia pneumocócica grave</b> .....	61

<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	79
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dez principais causas de morte no mundo em 2015.....	18
Figura 2: Fatores de virulência de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	20
Figura 3: Porcentagem de morte entre crianças abaixo de 05 anos de idade devido à pneumonia- 2015.....	21
Figura 4: Reconhecimento do <i>S. pneumoniae</i> por receptores de reconhecimento de padrão - PRRs .....	25
Figura 5: Letalidade de animais Balb/C WT e AnxA1 KO infectados com <i>S. pneumoniae</i> ( $5 \times 10^4$ CFU) durante 10 dias.....	44
Figura 6: Avaliação do recrutamento celular e da carga bacteriana em animais Balb/C WT e AnxA1 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por <i>S. pneumoniae</i> .....	46
Figura 7: Produção de citocinas por animais Balb/C WT e AnxA1 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por <i>S. pneumoniae</i> .....	47
Figura 8: Dosagem de espécies reativas de oxigênio produzidas por células de Balb/C WT e AnxA1 KO <i>in vitro</i> .....	48
Figura 9: Quantificação de proteínas totais e análise do escore histológico do pulmão de animais Balb/C WT e AnxA1 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por <i>S. pneumoniae</i> .....	49
Figura 10: Avaliação da função pulmonar de animais Balb/C WT e AnxA1 KO após 24 e 72h de infecção com <i>S. pneumoniae</i> .....	50
Figura 11: Letalidade de animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO infectados com <i>S. pneumoniae</i> ( $5 \times 10^4$ CFU) durante 10 dias.....	51
Figura 12: Avaliação do recrutamento celular e da carga bacteriana em animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por <i>S. pneumoniae</i> .....	53
Figura 13: Produção de citocinas por animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por <i>S. pneumoniae</i> .....	54

Figura 14: Quantificação de proteínas totais e análise do escore histológico do pulmão de animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por <i>S. pneumoniae</i> .....	56
Figura 15: Avaliação da função pulmonar de animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO após 24 e 72h de infecção com <i>S. pneumoniae</i> .....	57
Figura 16: Recrutamento celular e carga bacteriana de animais Balb/C WT infectados com <i>S. pneumoniae</i> e tratados ou não com Ac2-26..	58
Figura 17: Produção de citocinas por animais Balb/C WT infectados com <i>S. pneumoniae</i> e tratados ou não com Ac2-26.....	60
Figura 18: Quantificação de proteínas totais e análise do escore histológico do pulmão de animais Balb/C WT após 24h de infecção com <i>S. pneumoniae</i> e 12h de tratamento com Ac2-26 6mg/Kg.....	61
Figura 19: Letalidade de animais Balb/C WT infectados com <i>S. pneumoniae</i> e tratados ou não com Ac2-26 e/ou antibiótico. ....	62
Figura 20: Papel da proteína anexina A1 e de seu receptor FPR2 e efeito do tratamento com Ac2-26 na resposta inflamatória em um modelo murino de pneumonia pneumocócica moderada..	79

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIM2	Absent in melanoma 2
ANOVA	Análise de variância
AnxA1	Anexina A1
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD</i>
ATCC 6303	American Type Culture Collection 6303 – cepa da bactéria <i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipo 3 adquirida da coleção de microrganismos Norte Americana
BALF	Fluido do lavado broncoalveolar
BSA	Albumina bovina sérica
Balb/C	Linhagem de camundongo
C57Bl/6	Linhagem de camundongo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFU	Unidade formadora de colônia
CXCL-()	Quimiocina ligante ( ) com motivo CXC
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
ENO	Enolase
EPM	Erro padrão da média
FPR()	<i>Formil peptide receptor()</i>
HETAB	<i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>
IFN-()	Interferon-()
IL-()	Interleucina-()
ITRI	Infecção no trato respiratório inferior
ITRS	Infecção no trato respiratório superior
KO	<i>Knockout/deficiente</i>

LytA	Autolisina
MCP-1 /CCL2	Proteína quimioatratadora de monócitos-1
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Proteína adaptadora de resposta primária à diferenciação mielóide
N	Número amostral
NaEDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NLRP()	<i>Nucleotide-binding domain and Leucine-rich-Repeat-containing protein</i> ()
NLRs	Receptores do tipo NOD
NOD()	Ligante de nucleotídeo e domínio de oligomerização ()
PavA	Proteína de adesão e virulência pneumocócica A
PBS	Tampão de salina fostato
PCV	Vacina conjugada de polissacarídeos
PiaA	Proteínas pneumocócica de aquisição de ferro A
PiuA	Proteína de captação de ferro A
PLY	Pneumolisina
PPSV	Vacina de polissacarídeo pneumocócico
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
PsaA	Proteína antígeno de superfície A
Psp()	Proteína de superfície pneumocócica ()
ROS	Espécie reativa de oxigênio
slgA	Imunoglobulina A secretora
THY	Meio de cultura Todd Hewitt acrescido de 0,5% de extrato de levedura
TLR()	Receptor do tipo Toll ()

TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
WT	<i>Wild Type/ selvagem</i>

## RESUMO

A pneumonia pneumocócica é a principal causa de pneumonia adquirida na comunidade e é responsável por altas taxas de mortalidade. A infecção pulmonar pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* caracteriza-se por um intenso infiltrado neutrofílico, que é importante para a eliminação bacteriana, mas também pode causar dano tecidual. Assim sendo, imunomoduladores como a anexina A1 (AnxA1), podem ser alvos terapêuticos interessantes. A AnxA1 é um mediador pró-resolutivo, mimetizado pelo peptídeo sintético Ac2-26, que ao se ligar ao receptor FPR2 induz a apoptose de neutrófilos seguido da remoção destas células pelo processo de eferocitose, dentre vários outros efeitos imunomoduladores. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel da AnxA1 e do receptor FPR2 na resposta inflamatória causada pela pneumonia pneumocócica. Para tal, camundongos selvagens (WT) e deficientes (KO) para AnxA1 ou FPR2/3 foram infectados por via intranasal com  $5 \times 10^4$  CFU de *S. pneumoniae* e eutanasiados em diferentes tempos após a infecção para a avaliação de parâmetros inflamatórios e de função pulmonar. Além disso, animais selvagens foram infectados com um inoculo maior -  $10^5$  CFU de *S. pneumoniae* intranasal - e tratados com 6mg/Kg de Ac2-26 e eutanasiados para avaliação de parâmetros inflamatórios. Foi observado que animais AnxA1 KO foram mais susceptíveis à infecção, apresentando uma resposta inflamatória mais intensa, maior carga bacteriana e função pulmonar reduzida quando comparados aos animais WT. De modo semelhante, os animais FPR2/3 KO apresentaram parâmetros similares aos observados nos animais AnxA1 KO, com inflamação mais intensa, carga bacteriana elevada, piora da função pulmonar e redução da sobrevivência quando comparados com animais WT. De modo coerente, os animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução dos parâmetros inflamatórios e das contagens bacterianas. Portanto, a deficiência de AnxA1 ou de FPR2/3 contribuiu para a intensificação da resposta inflamatória desencadeada por *S. pneumoniae* nos pulmões. Neste sentido, a administração de Ac2-26 teve um importante papel no controle da inflamação e da proliferação bacteriana. Assim, a modulação da resposta inflamatória parece ser benéfica em casos de pneumonia pneumocócica grave e o tratamento com

o peptideomimético da AnxA1 pode ser uma estratégia terapêutica importante para o tratamento de doenças cuja inflamação é exacerbada.

**Palavras-chave:** Inflamação, imunomodulação, *Streptococcus pneumoniae*, anexina A1

## ABSTRACT

Pneumococcal pneumonia is the leading cause of community acquired pneumonia and it is responsible for high mortality rates. Pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* is characterized by an intense inflammatory response, which is important to eliminate bacteria but can also cause intense tissue damage. In this regard, immunomodulators, like annexin A1 (AnxA1), may be interesting therapeutic targets. AnxA1 is a pro-resolving mediator, mimetized by the synthetic peptide Ac2-26, that by binding on FPR2 receptor, induces neutrophil apoptosis and enhances efferocytosis, among other immunomodulatory effects. Thus, our aim was to access the role of AnxA1 and its receptor FPR2 during the onset of inflammation in a murine model of pneumococcal pneumonia. For this, wild type (WT) and knockout (KO) mice for AnxA1 or FPR2/3 were infected with  $5 \times 10^4$  CFU of *Streptococcus pneumoniae* intranasally and euthanized in different time points post-infection (p.i.) for the assessment of inflammatory and functional parameters. In addition, wild type (WT) mice were infected intranasally with  $10^5$  CFU of *S. pneumoniae*, treated with 6mg/Kg of Ac2-26 and euthanized for inflammation and bacterial assessment. AnxA1 KO mice were more susceptible to the infection, by exhibiting more marked inflammatory response, more bacterial counts and reduced pulmonary function when compared to WT mice. Likewise, FPR2/3 KO mice presented similar parameters of AnxA1 KO, more inflammation, more bacterial counts, worsening of lung function and reduced survival when compared to the WT C57BL/6 mice. Additionally, treatment with Ac2-26 reduced bacterial counts and inflammation. Altogether, the absence of AnxA1 or FPR2/3 contributed to the exacerbated inflammatory response triggered by *S. pneumoniae* in the lungs. In this regard, AnxA1 active peptide plays an important role controlling inflammation and bacterial proliferation. Therefore, modulation of the inflammatory response can be beneficial during severe pneumococcal pneumonia and treatment with AnxA1 peptidomimetics can be an interesting strategy to control overwhelming inflammation

**Keywords:** Inflammation. Immunomodulation. *Streptococcus pneumoniae*. Annexin A1

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Infecções no trato respiratório**

Infecções no trato respiratório podem ser causadas por diferentes agentes etiológicos, como fungos, bactérias e vírus, sendo os últimos mais comumente associados às infecções nesse sítio. Como as vias aéreas superiores são mais acessíveis aos patógenos exógenos bem como aos microrganismos da microbiota oral, sua infecção ocorre de forma mais frequente quando comparada as infecções no trato respiratório inferior (ITRI). Por outro lado, as infecções no trato respiratório superior (ITRS) são brandas, autolimitadas e geralmente causadas por vírus, diferentemente das ITRIs que são geralmente graves com risco de óbito, requerem tratamento imediato e são mais comumente causadas por bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Um estudo realizado em 2015 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) apresentou como as principais causas de morte no mundo: isquemia coronariana, infarto e infecção no trato respiratório inferior (Figura 1). Além disso, dentre as infecções que acometem a população, a infecção no trato respiratório inferior é a infecção responsável pelo maior número de mortes, chegando a 3,2 milhões de mortes no ano de 2015 (“WHO | The top 10 causes of death”, 2017).

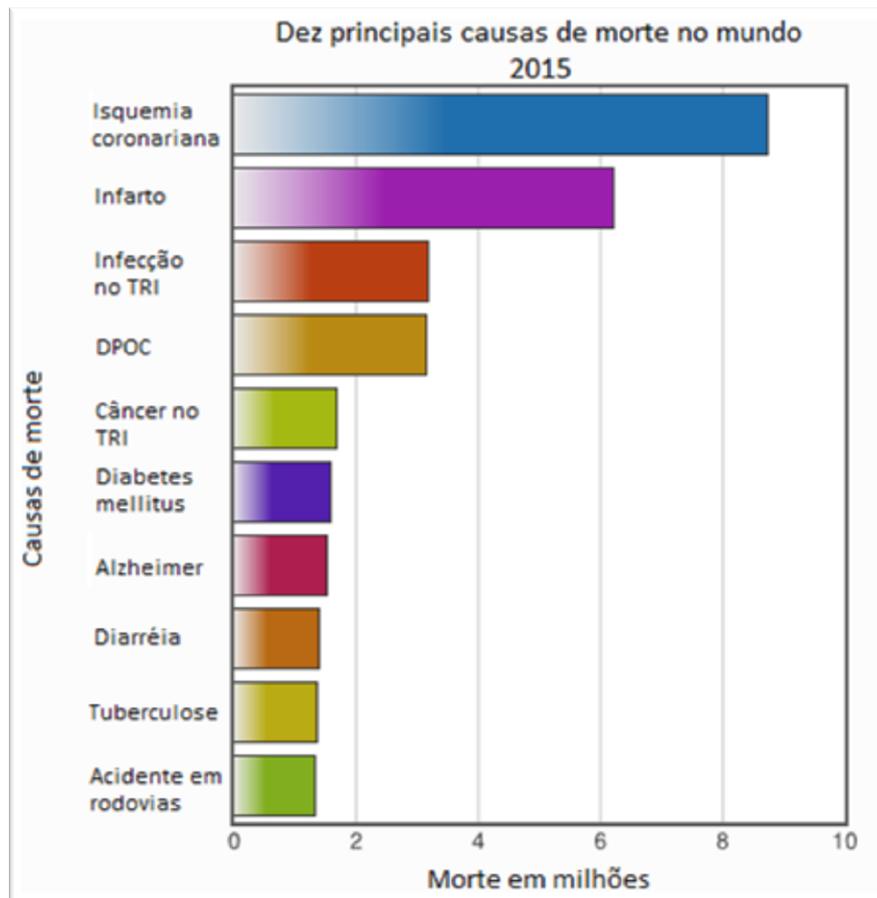


Figura 1: Dez principais causas de morte no mundo em 2015 (Adaptado de: "WHO | The top 10 causes of death," 2017).

Tendo em vista o impacto das infecções do trato respiratório inferior no índice de mortalidade mundial, o estudo das doenças que compõe esse quadro é de grande relevância. Dentre os sítios do trato respiratório inferior, os mais frequentemente acometidos na população são os pulmões, resultando em pneumonia. A pneumonia é caracterizada pela inflamação pulmonar envolvendo os alvéolos e é considerada uma doença grave com alto risco de mortalidade (FILHO, 2016). Tal doença pode ser causada por fungos, bactérias e vírus, sendo as bactérias os agentes mais comuns. Dentre estes diversos agentes potencialmente causadores de pneumonias, os principais responsáveis por causar pneumonia adquirida na comunidade, em ordem decrescente de incidência, são as bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Haemophilus influenzae b* (CORRÊA; LUNDGREN; SILVA, 2009). Sabendo-se que o *Streptococcus pneumoniae* é a principal causa de pneumonia adquirida na comunidade, o

estudo desse microrganismo é essencial para descobertas de possíveis intervenções terapêuticas a fim de contribuir para a redução da mortalidade causada por tais infecções.

## **1.2. *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* são caracterizados como cocos Gram-positivos, lanceolados ou ovais, medindo de 0,5 a 1,25  $\mu\text{m}$  de diâmetro, dispostos aos pares ou em cadeias curtas. É um microrganismo anaeróbico facultativo, capnofílico e fastidioso, necessitando de atmosfera rica em  $\text{CO}_2$  e meios nutritivos suplementados com sangue para crescer (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). As cepas virulentas dessa espécie bacteriana são, geralmente, encapsuladas com complexos polissacarídicos. Tais cápsulas estão envolvidas na patogenicidade do microrganismo por impedir que a bactéria fique presa ao muco nasal e por evadir a opsonização e a fagocitose (KADIOGLU *et al.*, 2008). Além disso, por serem altamente antigênicas, as cápsulas são utilizadas para classificar os sorotipos bacterianos. Até o início do ano de 2015, 95 sorotipos foram descritos (CROUCHER *et al.*, 2015). Além da capsula bacteriana, *Streptococcus pneumoniae* dispõe de muitos outros fatores de virulência (Figura 2). Dentre eles estão a proteína de superfície A (PspA), que impede a opsonização por C3 e a proteína de superfície C (PspC) que viabiliza a translocação bacteriana através do epitélio. A pneumolisina (Ply), responsável por inibir o batimento ciliar epitelial e por contribuir para a disseminação bacteriana (HIRST *et al.*, 2004). Proteínas que se ligam a metal (PsaA) são responsáveis pela resistência pneumocócica ao estresse oxidativo (KADIOGLU *et al.*, 2008).

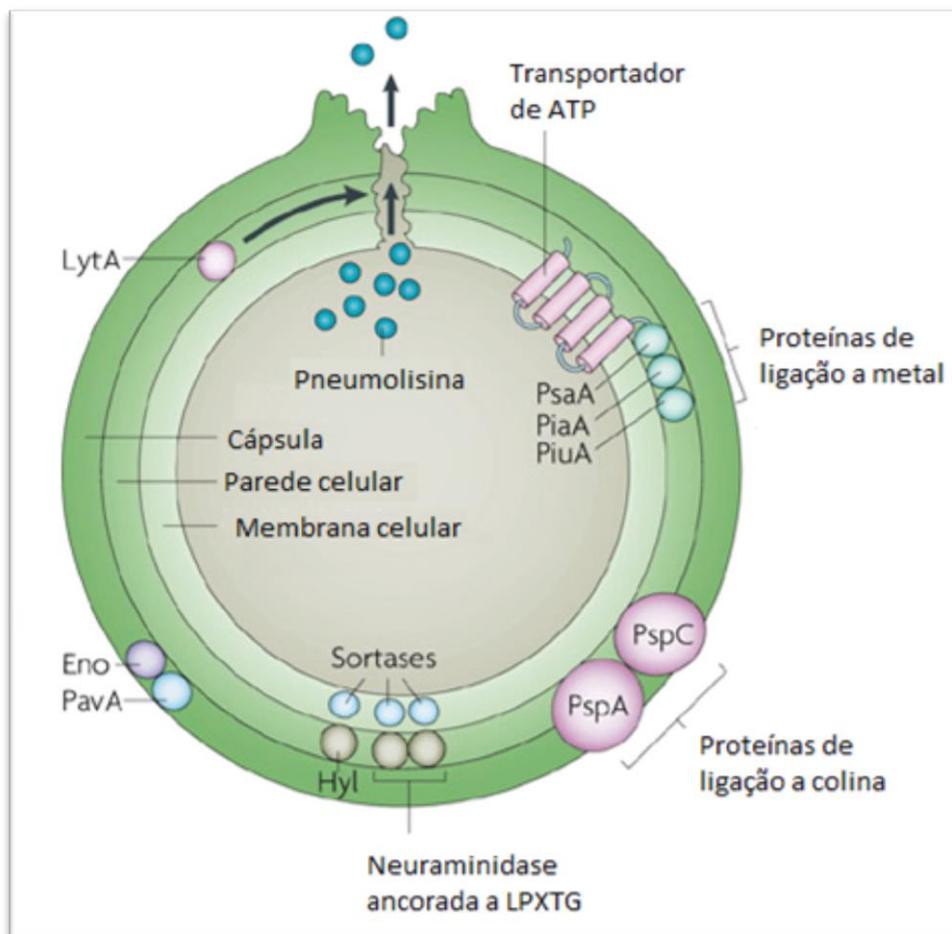


Figura 2: Fatores de virulência de *Streptococcus pneumoniae*. Dentre os principais fatores estão: Cápsula, proteínas de superfície A e C (PspA e PspC), neuroaminidase ancorada a LPXTG, hialuronato liase, adesão e virulência pneumocócica A (PavA), enolase (Eno), pneumolisina, autolisina (LytA) e proteínas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

Apesar dos diversos mecanismos de virulência, e em virtude da sua grande variedade de sorotipos, *Streptococcus pneumoniae* é mais frequentemente encontrado como colonizador da orofaringe.

### 1.2.1. Epidemiologia

As crianças com menos de 05 anos de idade apresentam as maiores taxas de colonização por *S. pneumoniae*, funcionando como reservatórios da bactéria (CDC, 2015). *S. pneumoniae* pode causar doença tanto por via exógena, através da sua transmissão entre indivíduos, como por via endógena, através da translocação deste microrganismo para outro sítio. Em situações

específicas, como um descontrole do sistema imunológico do hospedeiro ou ainda alguma ruptura de barreiras, *S. pneumoniae* pode migrar para os seios paranasais, o ouvido médio e para o pulmão, além de poder atingir a corrente sanguínea e as meninges. Embora *S. pneumoniae* tenha potencial de causar diversas doenças, esta bactéria é principalmente associada ao desenvolvimento de pneumonia, sendo tal doença a mais frequente entre os indivíduos infectados. A pneumonia é a infecção que mais mata crianças no mundo, contribuindo para 16% das mortes em crianças menores que 05 anos. Este número é maior que o número de mortes por AIDS, malária e sarampo juntos (“WHO | Causes of child mortality”, 2017). Em 2015 foi estimado pela OMS que 920.136 crianças morreram de pneumonia e a estimativa média de mortes anuais é quase 1 em 5 mortes de crianças com menos de 05 anos de idade, no mundo (“WHO | Pneumonia”, 2017). Devido ao calendário de vacinação, o índice de mortalidade causado pela pneumonia foi reduzido consideravelmente, porém em regiões subdesenvolvidas este índice continua alto e contribui para a pneumonia estar entre as principais causas de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade (Figura 3).

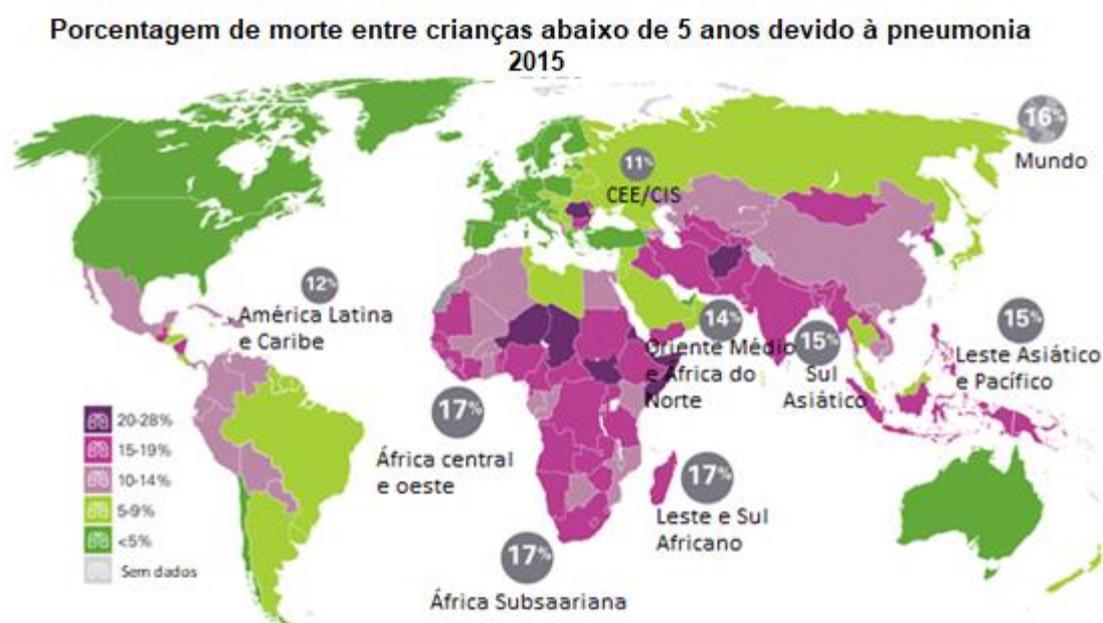


Figura 3: Porcentagem de morte entre crianças abaixo de 05 anos de idade devido à pneumonia- 2015 (Adaptado de: “UNICEF | Pneumonia claims the lives of the world’s most vulnerable children,” 2015).

Em idosos o índice de infecção chega a ser quatro vezes maior que em jovens e adultos, além deles terem maior risco de hospitalização e morte devido à infecção (STUPKA *et al.*, 2009). Apesar de diversos microrganismos como fungos, vírus e bactérias serem capazes de causar pneumonia, a bactéria *Streptococcus pneumoniae* é o principal agente causador dessa patologia e é responsável por 36% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade por adultos (“CDC | Pinkbook | Pneumococcal”, 2015). Além disso, no ano de 2015, das 3,2 milhões de mortes causadas por infecções no trato respiratório inferior, 55,4% foram devidas à pneumonia pneumocócica (TROEGER *et al.*, 2017).

### 1.2.2. Resposta imunológica

A pneumonia pneumocócica pode ser causada tanto pela transmissão do *S. pneumoniae* entre pessoas, via perdigotos, quanto por translocação da bactéria colonizadora do trato respiratório superior para os pulmões (“Pneumococcal Disease | Clinical | Transmission | CDC”, 2017). Para que a migração do trato respiratório superior para o inferior e a infecção sejam bem sucedidas, é necessário que a bactéria seja capaz de ultrapassar as barreiras físicas do hospedeiro, se aderir ao epitélio e evadir a resposta imune inicial (MURPHY, 2011). A interação das bactérias com as células epiteliais da orofaringe é mediada por adesinas proteicas de superfície (PavA). Para que a bactéria seja capaz de migrar, é essencial que ela produza protease IgA (sIgA) e pneumolisina (PLY). A protease IgA é responsável por clivar a IgA que medeia a ligação entre as bactérias e a mucina, permitindo assim, a evasão desta barreira humoral da mucosa. A pneumolisina é responsável por produzir poros nas células do hospedeiro, os quais permitem a translocação das bactérias por estas células (LAWRENCE *et al.*, 2015).

Após a evasão das barreiras primárias, ao atingir o trato respiratório inferior, as bactérias são reconhecidas por macrófagos alveolares e posteriormente por neutrófilos, os quais desencadeiam respostas imunológicas contra o patógeno. Os macrófagos alveolares são as primeiras células de combate à infecção e com a ajuda do sistema do complemento, são responsáveis por fagocitar e eliminar as bactérias. Apesar da variação da

eficácia do sistema do complemento contra os diversos sorotipos bacterianos, ele é fundamental para a opsonização e consequente fagocitose bacteriana (HYAMS *et al.*, 2010). Estudos realizados em camundongos deficientes para as três diferentes vias do sistema do complemento mostraram que todas têm papel importante no reconhecimento e opsonização do patógeno. A via Clássica do complemento é ativada pela ligação de C1q na superfície do patógeno ou pela ligação ao complexo anticorpos-patógeno. A via da Lectina é ativada pela ligação de ficolinas ao patógeno. A via Alternativa é ativada pela hidrólise de C3 e consequente ligação ao patógeno (BROWN; HAMMERSCHMIDT; ORIHUELA, 2015). Todas as vias do complemento resultam em liberação de fragmentos C5a e C3a - os quais recrutam e ativam leucócitos -, opsonização e reconhecimento bacteriano por fagócitos - aumentando a capacidade dos fagócitos de eliminarem a bactéria -, e lise osmótica bacteriana através da formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Concomitantemente a ação do sistema do complemento, *S. pneumoniae* é também reconhecido pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) da imunidade inata, presentes não somente nos leucócitos, mas também nas células epiteliais. Os PRRs são responsáveis por sinalizar a presença de patógenos ou moléculas associadas ao dano tecidual e desencadear uma resposta imune. Na resposta contra *Streptococcus pneumoniae*, os principais PRRs envolvidos são os receptores da família Toll (TLR2, TLR9 e TLR4) e os receptores da família NOD (NOD2, NLRP3 e AIM2) (Figura 4) (KOPPE; SUTTORP; OPITZ, 2012). O TLR2 reconhece ácido lipoteicoico e lipoproteínas, o TLR9 reconhece DNA bacteriano contendo CpG não metilado e o TLR4 reconhece a pneumolisina (TOMLINSON *et al.*, 2014). TLR2 participa na eliminação bacteriana em estágios mais avançados da infecção. Porém ele também ativa a produção de mediadores pró-inflamatórios, os quais danificam a integridade da barreira epitelial promovendo a translocação bacteriana. Tal receptor também está envolvido no recrutamento de neutrófilos e produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL2 (TOMLINSON *et al.*, 2014). TLR9 parece não ser essencial para a produção de citocinas. Porém esse receptor é importante para habilidade dos macrófagos alveolares de fagocitarem e matarem as bactérias,

sendo assim crucial na eliminação bacteriana (ALBIGER *et al.*, 2007). A ativação do TLR4 também reduz a carga bacteriana, através do reconhecimento de PLY e consequente produção de citocinas e quimiocinas (IL-6, IL-1 $\beta$  e CXCL1) além do recrutamento de neutrófilos (KOPPE; SUTTORP; OPITZ, 2012). A molécula adaptadora MyD88 recrutada pelos receptores do tipo toll é essencial para a produção de citocinas e quimiocinas e para reduzir a multiplicação e a disseminação bacteriana. Como MyD88 faz parte da via de sinalização de diversos receptores (TLR2, TLR4, TLR9, receptores de IL-1 e IL-18), e sua atividade não é redundante à atividade de outra molécula adaptadora, ela se torna crucial na resposta contra a infecção por *S. pneumoniae* (KOPPE; SUTTORP; OPITZ, 2012).

Os NLRs são outro grupo de receptores envolvidos no reconhecimento de *S. pneumoniae*. O receptor NOD2, integrante deste grupo, é responsável pela detecção de fragmentos de peptidoglicano, os quais são apresentados após a fagocitose da bactéria por macrófagos. Como resultado do reconhecimento de tais fragmentos tem-se a ativação de NF- $\kappa$ B e a indução da produção de CCL2, culminando na indução da produção de citocinas e no recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção, respectivamente. Além disso, o reconhecimento da pneumolisina pelo inflamassoma e do peptidoglicano pelo NOD2 resultam em resposta inflamatória com produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  por leucócitos (TOMLINSON *et al.*, 2014). Portanto, por desencadear uma resposta inflamatória envolvendo a produção de citocinas e recrutamento de macrófagos, a ativação do receptor NOD2 contribui para a eliminação bacteriana. Como mencionado, além da capacidade do inflamassoma de reconhecer pneumolisina, este complexo reconhece também DNA bacteriano, e em ambos os casos uma resposta inflamatória é desencadeada. O NLRP3 reconhece pneumolisina e induz a produção de IL-1 $\beta$ /IL-18 por macrófagos e células dendríticas. Apesar de crucial, o papel exercido pelo NLRP3 é semelhante à função do AIM2 no inflamassoma, visto que através do reconhecimento do DNA bacteriano ele também recruta ASC e medeia a produção de IL-1 $\beta$ /IL-18 em macrófagos infectados (FANG *et al.*, 2011). Porém, estas respostas variam de acordo com o sorotipo bacteriano, visto que o inflamassoma reconhece de forma distinta a ampla gama existente de

sorotipos, resultando em diferentes respostas. Portanto, de maneira geral, pode-se afirmar que NOD2, NLRP3 e AIM2 são cruciais na resposta inata frente ao *S. pneumoniae*. Além da proteína AIM2, descrita anteriormente, o DHX9, outro sensor de DNA citoplasmático, parece estimular a produção de CXCL1, IL-6 e TNF- $\alpha$  dependente de NF- $\kappa$ B, por outro lado os demais sensores de DNA citoplasmático, como o DHX36, DDX41, dentre outros, parecem estimular a produção de IFN tipo I via IRF3/7 (KOPPE; SUTTORP; OPITZ, 2012). O IFN do tipo I produzido após o reconhecimento do DNA bacteriano regula a produção de CCL5 de maneira autócrina, nos macrófagos infectados, e de maneira parácrina, nas células vizinhas, resultando no recrutamento de linfócitos T (KOPPE *et al.*, 2012). Além dos linfócitos T, neutrófilos e macrófagos também são recrutados através da produção e liberação de quimiocinas, como CXCL9 e CXCL10, porém estas são induzidas pela produção de IFN do tipo III e estão associadas ao dano agudo pulmonar causado pelo intenso recrutamento de leucócitos (SEYOUM; YANO; PIROFSKI, 2011).

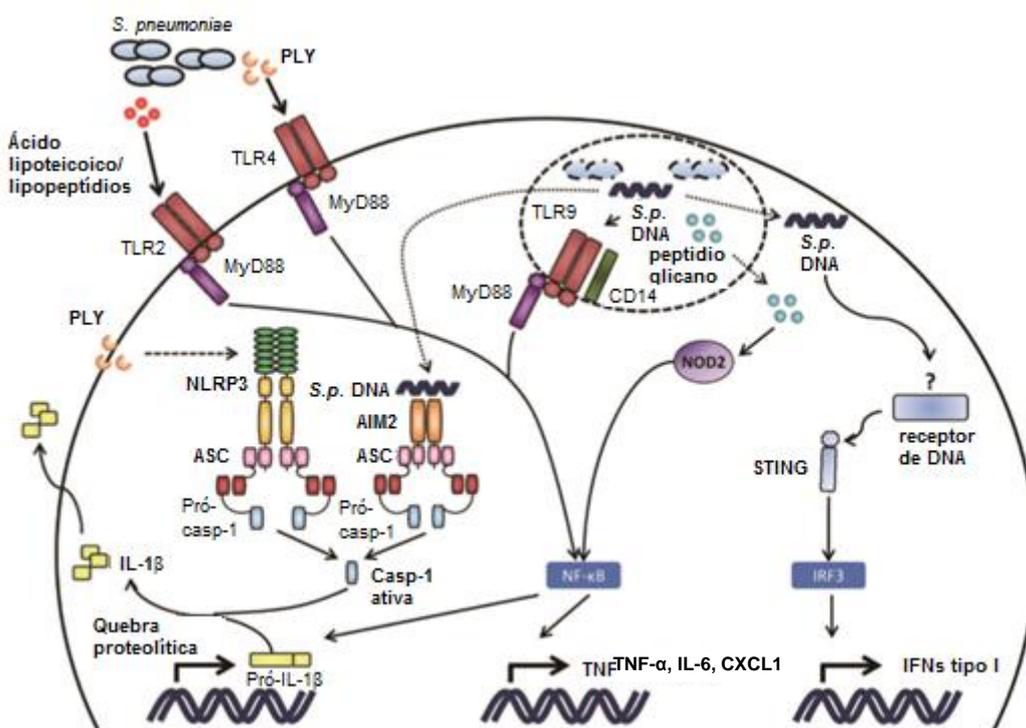


Figura 4: Reconhecimento do *S. pneumoniae* por receptores de reconhecimento de padrão - PRRs (Adaptado de: Koppe, Suttorp, & Opitz, 2012). *S. pneumoniae*, seus produtos e seu DNA são reconhecidos pelos TLRs, NLRs, AIM2 e outros receptores de DNA. Após o reconhecimento são iniciadas cascatas de sinalização que culminam na produção de citocinas pró-inflamatórias.

A ativação dos receptores de reconhecimento de padrões e a produção de mediadores pró-inflamatórios, culmina na migração de leucócitos para os pulmões. Como citado anteriormente, inicialmente o *Streptococcus pneumoniae* ativa os macrófagos alveolares que são essenciais para o reconhecimento e a fagocitose da bactéria, controlando assim o número de bactérias nas primeiras horas da infecção pulmonar. Porém a eficiência dessas células é inóculo-dependente. Em inóculos muito altos a resposta não é tão eficiente e não é capaz de controlar a replicação bacteriana a ponto de impedir a infecção do tecido (CAMBERLEIN *et al.*, 2015). Nesse sentido, os neutrófilos passam a ser recrutados por quimiocinas produzidas via ativação de PRRs em macrófagos e células epiteliais para o sítio infectado, e passam a serem as células responsáveis pelo controle da infecção por *S. pneumoniae*. Esse controle se dá através da produção de proteases e moléculas antimicrobianas, além das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (CRAIG *et al.*, 2009). As NETs são fibras de DNA contendo proteínas nucleares e citoplasmáticas que são liberadas após um estímulo. Apesar de contribuir para a morte de diversos patógenos, a presença prolongada das NETs e proteases podem danificar o tecido infectado (PECHOUS, 2017). Além disso, os neutrófilos quando em contato com *S. pneumoniae* produzem espécies reativas de oxigênio, na tentativa de eliminar o patógeno, porém, devido à resistência do patógeno à este mecanismo de morte, ROS passa a ser mais importante no contexto de dano tecidual (MARRIOTT *et al.*, 2008; YESILKAYA *et al.*, 2013).

De forma mais tardia, linfócitos T migram para o pulmão na tentativa de controlar a proliferação de *S. pneumoniae* no tecido. Os linfócitos T CD4+ são recrutados mais precocemente, quando comparados aos demais linfócitos, pela toxina PLY e contribuem para a proteção do hospedeiro ao produzir citocinas pró-inflamatórias com atividade antibacteriana, como IFN- $\gamma$  (HIRST *et al.*, 2004). Durante a resolução da infecção e eliminação bacteriana, células T reguladoras são recrutadas e produzem IL-10. Esta citocina anti-inflamatória, conhecida por regular a resposta imune excessiva, pode também influenciar a resposta humoral e o recrutamento de APCs, dificultando a eliminação bacteriana (KHAN *et al.*, 2002; NEILL *et al.*, 2012; VAN DER POLL *et al.*, 1996).

Portanto, a resposta inflamatória na pneumonia pneumocócica é, de maneira geral, aguda e composta principalmente por componentes do sistema imune inato. Tendo em vista a agilidade da resposta e a exacerbação da mesma em casos de descontrole da proliferação bacteriana, a resposta imune passa a possuir um papel dual. Sendo ela essencial para o controle da infecção e eliminação bacteriana. Porém, se a inflamação for exacerbada, ocorre um acúmulo de leucócitos no pulmão que debilitam o controle da infecção, além de causarem danos teciduais. Nestes casos, a exacerbação da resposta imune pode resultar tanto no preenchimento dos alvéolos pulmonares, causando insuficiência respiratória, quanto na danificação tecidual resultando em bacteremia, ocasionando a morte do hospedeiro.

### 1.2.3. Prevenção e tratamento da infecção

#### 1.2.3.1 Vacinação

A prevenção da infecção por *Streptococcus pneumoniae* pode ser realizada por uma ampla gama de vacinas. Atualmente existem quatro vacinas distintas no mercado, as quais cobrem 7, 10, 13 e 23 sorotipos distintos. As vacinas conjugadas às proteínas carreadoras imunogênicas para pneumococos (PCV) incluem até 13 sorotipos e a vacinação é recomendada nos primeiros dois anos de vida, para idosos acima de 65 anos e para população de risco. Em idosos e adultos a taxa de eficácia da vacina é de 45% pra pneumonia pneumocócica e de 75% para doenças invasivas (proteção relativa aos sorotipos contidos na vacina) (“HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - PREVNAR 13”, 2017). Existe também uma vacina não conjugada, que abrange 23 sorotipos distintos, a PPSV23. A PPSV23 é uma vacina de polissacarídeo pneumocócico recomendada para adultos e idosos em condições favoráveis à infecção pela bactéria, como doenças crônicas e exposição frequente ao agente (“Pneumococcal Vaccination | CDC”, [S.d.]). Apesar de agentes de saúde se referirem à PPSV23 como vacina para pneumonia, esta denominação não é adequada, visto que sua eficácia (57-75%) só foi comprovada para doenças invasivas, como bacteremia e meningite (“HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - PNEUMOVAX 23”, 2014).

No Brasil, a vacina para *S. pneumoniae* (PCV-10) foi introduzida no calendário do SUS em 2010 e desde então houve uma redução de aproximadamente 20% nos casos de crianças hospitalizadas por pneumonia. Porém em indivíduos acima de 65 anos, foi observado um aumento no número de hospitalizações causadas por pneumonia (ANDRADE *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016). Sendo assim, apesar da vacinação ser um importante método de combate à infecção e à transmissão da pneumonia, outros métodos de combate se fazem necessários, visto que a pneumonia pneumocócica ainda acomete uma grande parcela da população. Atualmente tem sido estudado o desenvolvimento de vacinas de proteína, as quais podem proteger da maioria ou até de todos os sorotipos de *S. pneumoniae* causadores de doenças (ODUTOLA *et al.*, 2017).

#### 1.2.3.2 Tratamento:

Para que o tratamento seja eficaz e específico o ideal é que além do diagnóstico clínico, a identificação bacteriana também seja realizada. O diagnóstico clínico consiste na avaliação dos sintomas (tosse, falta de ar, expectoração e dor torácica), nas manifestações sistêmicas (febre, sudorese, cefaleia) e no exame físico. Sendo recomendada também uma radiografia de tórax para avaliar o nível de comprometimento tecidual e a gravidade da doença. A identificação bacteriana consiste em encontrar cocos Gram positivos lanceolados dispostos em cadeias nas amostras coletadas. Além disso, é necessário realizar o cultivo desta amostra e verificar colônias  $\alpha$ -hemolíticas, susceptíveis à optoquina e sensíveis aos sais biliares (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Porém as diretrizes brasileiras para pneumonia preconizam que para pacientes ambulatoriais não é necessário a identificação do patógeno, visto que a realização destes exames de alto custo/tempo não implicam em melhor resposta ao tratamento. Porém em casos de pneumonia grave é indicada a identificação etiológica do patógeno (CORRÊA; LUNDGREN; SILVA, 2009).

Assim que o diagnóstico clínico for realizado, o tratamento empírico deve ser iniciado. Este tratamento deve levar em consideração estudos epidemiológicos regionais, a fim de evitar o uso de determinados antibióticos

em áreas de grande prevalência de bactérias resistentes e indicar um tratamento capaz de abranger as principais bactérias observadas na região. No Brasil, em 2004, foram relatadas 27,9% de cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, 65% à cotrimoxazol, 14,6% à eritromicina (BRANDILEONE, 2006). Em casos de pacientes com CAP, o tratamento indicado é o uso de amoxicilina oral. Em casos de pacientes com pneumonia grave ou hospitalizados, o tratamento deverá ser endovenoso com algum macrolídeo (como por exemplo, clindamicina) (CORRÊA; LUNDGREN; SILVA, 2009). Além disso, em casos de cepas resistentes é recomendada a combinação de um macrolídeo (azitromicina) com uma cefalosporina de terceira geração (ceftriaxona) (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Além dos tratamentos com antibiótico, as diretrizes brasileiras para pneumonia preconizam que pacientes em estado grave e com choque séptico, que não estão respondendo ao tratamento devem receber reposição volêmica adequada e podem receber corticosteroide sistêmico (CORRÊA; LUNDGREN; SILVA, 2009).

Além disso, estudos realizados apontaram que a classe do antibiótico preconizado para o tratamento da pneumonia pneumocócica grave deve ser escolhida com cuidado. Visto que antibióticos bacteriolíticos, por exemplo, a amoxicilina e a ceftriaxona, ao lisarem a parede bacteriana, liberam fragmentos que aumentam o reconhecimento bacteriano por TLR2 e resultam no acúmulo de neutrófilos, gerando maior dano tecidual (KARLSTRÖM *et al.*, 2011). Por outro lado, antibióticos bacteriostáticos, como por exemplo, os macrolídeos, são capazes de reduzir a carga bacteriana sem afetar a migração neutrofílica, portanto estes medicamentos devem ser priorizados (GHONEIM; MCCULLERS, 2014). Em pacientes com pneumonia pneumocócica grave, mesmo com a intervenção de antibióticos, a infecção pode ser fatal, assim como em pacientes que não recebem tratamento. Isso ocorre devido ao fato do patógeno desencadear uma inflamação exacerbada/descontrolada, que passa a ser independente da sua presença no organismo. Esta resposta é capaz de causar falência múltipla dos órgãos com consequente morte (CALBO; GARAU, 2010).

Tendo em vista que a resposta inflamatória excessiva é um grande contribuinte para o aumento da mortalidade nestas infecções, a busca de novos alvos terapêuticos é de extrema importância para a redução desses índices. Dessa forma o controle da inflamação exacerbada por meio do uso de imunomoduladores tem sido alvo de diversos estudos. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a inibição da fosfodiesterase-4 ou a redução do recrutamento neutrofílico com um antagonista de CXCR1/2, foram capazes de regular a resposta inflamatória tanto na pneumonia pneumocócica, quanto na pneumonia secundária à infecção por influenza, sem prejudicar a eliminação bacteriana (TAVARES *et al.*, 2015, 2017). Neste contexto, mediadores pró-resolutivos tem chamado atenção para sua utilização como imunomoduladores. Uma vez que estes mediadores são produzidos de maneira endógena, os efeitos colaterais associados à sua administração tendem a serem reduzidos. Em adição, os mediadores pró-resolutivos possuem capacidade de controlar a inflamação, além de serem capazes de promover o reparo tecidual e a eliminação de patógenos (BASIL; LEVY, 2016).

### **1.3. Papel de Anexina A1 na inflamação**

O processo inflamatório, em seu percurso clássico, é caracterizado por três fases principais. Sendo a primeira delas, o reconhecimento do estímulo, o qual desencadeia a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios. Seguido pelo pico da inflamação, ponto no qual é observado maiores níveis de mediadores pró-inflamatórios e maior infiltrado celular inflamatório. Por último, a terceira fase compreende a resolução deste processo, fase caracterizada pela produção de mediadores pró-resolutivos e infiltrado de células mononucleares com características resolutivas (ALESSANDRI *et al.*, 2013).

A resolução da inflamação, etapa em que ocorre o restabelecimento da homeostase, é guiada por mediadores pró-resolutivos. Dentre os mediadores pró-resolutivos, têm-se lipoxinas, anexina A1, maresinas, resolvinas, protectinas, entre outros. Estes mediadores agem via receptores específicos e inibem vias de sobrevivência, estimulam a apoptose de neutrófilos, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulam a transmigração de monócitos e aumentam a capacidade dos macrófagos em fagocitar debris e células apoptóticas (SUGIMOTO, MICHELLE A *et al.*, 2016)

Anexina A1 (AnxA1), conhecida também como lipocortina 1, é um mediador pró-resolutivo regulado por glicocorticoide, pertencente à família das Anexinas, a qual inclui outros 12 membros. Esta proteína, de 37kDa, é composta por 346 aminoácidos formando 4 sequências repetidas. A porção N-terminal desta proteína, assim como das demais proteínas desta família, confere a ela exclusiva atividade biológica (SUN KANG; SUNG-HOU KIM; HUBER, 1993). Em condições fisiológicas, anexina A1 está presente em grânulos de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e em alguns subtipos de linfócitos (GOULDING *et al.*, 1990; MORAND *et al.*, 1995). A proteína não é detectável no plasma, porém pode ser encontrada em vários tecidos, como pulmão, medula óssea e intestino. Após o estímulo por glicocorticoides em células específicas (como macrófagos), em poucos minutos, a AnxA1 é fosforilada e liberada para o meio extracelular. De forma mais tardia, glicocorticoides podem tanto estimular a síntese de mRNA de anexina A1, como inibir este processo. A atuação a nível gênico é dependente do tipo celular no qual o glicocorticoide age, como por exemplo, em monócitos ele induz a produção de AnxA1 e em linfócitos ele inibe sua produção (D'Acquisto *et al.*, 2008; Perretti & Flower, 1996). Além do glicocorticoide, outras substâncias, como a citocina IL-6, também controlam a expressão gênica de anexina A1 (DE COUPADE *et al.*, 2001; SOLITO, EGGLE *et al.*, 1998).

Após ser expressa e secretada para o meio extracelular, a porção N-terminal da AnxA1 liga-se ao receptor de formil peptídeo 2 (FPR2). FPR é uma família de receptores acoplados a proteína G composta de sete domínios transmembranares. Até o momento foram identificados 3 membros desta família em humanos, sendo eles FPR1, FPR2/ALX e FPR3 e em camundongos a família é composta por 8 membros, sendo os principais: FPR1, homólogo ao FPR1 humano e FPR2 e FPR3, os quais são estruturalmente semelhantes ao FPR2/ALX humano. De forma geral, o receptor FPR1 reconhece peptídeos N-formilados e desencadeia respostas pró-inflamatórias (DORWARD *et al.*, 2015). O receptor FPR2/ALX reconhece com baixa afinidade fMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine), estímulo bacteriano pró inflamatório, e reconhece com alta afinidade a lipoxina A4 (LXA4) e a AnxA1, estímulos pró-resolutivos (COORAY *et al.*, 2013). O receptor FPR3 está distribuído em

pequenas vesículas intracelulares e reconhece somente o F2L (peptídeo derivado da proteína de ligação à heme), entretanto, pouco se sabe sobre sua função (RABIET *et al.*, 2011). Os receptores FPRs são expressos principalmente em leucócitos (com mais relevância em neutrófilos e monócitos/macrófagos), células endoteliais e epiteliais. E devido ao fato da anexina A1 ser secretada, esta pode agir de modo parácrino ou autocrino.

Foi demonstrado que a região N-terminal da AnxA1 composta de 26 aminoácidos (Ac2-26) é suficiente para mimetizar sua ação extracelular, visto que este peptídeo também se liga com alta afinidade ao receptor FPR2 e ativa a mesma via de sinalização da anexina A1 (PERRETTI, M *et al.*, 2001). Porém, devido a seu tamanho, o Ac2-26 tem certa promiscuidade e se liga também ao receptor FPR1 (ERNST *et al.*, 2004). No entanto o Ac2-26 se liga fracamente ao FPR1 e gera uma resposta de baixa intensidade similar à resposta desencadeada pela sua ligação ao FPR2 (COORAY *et al.*, 2013; DORWARD *et al.*, 2015). Portanto, apesar do peptídeo Ac2-26 não se ligar exclusivamente ao FPR2, sua principal via de ação é pela ativação deste receptor (GAVINS *et al.*, 2012)

Além de ativar o receptor FPR2, a proteína AnxA1 também se liga a outras proteínas, como por exemplo, a integrina  $\alpha_4\beta_1$  e neste caso, esta interação inibe a migração de monócitos, efeito oposto daquele desencadeado pela ligação ao FPR2 (SOLITO, E *et al.*, 2000).

Ao ser secretada, a AnxA1 pode ser clivada pela elastase neutrofílica e pela proteinase 3, gerando uma isoforma de 33kDa e outros fragmentos de peptídeos N-terminais. Acredita-se que a clivagem da AnxA1 seja um mecanismo de inativação da proteína e pode estar associado a um perfil inflamatório, porém ainda não foi elucidado se estes fragmentos possuem alguma função biológica específica (RESCHER *et al.*, 2006; TSAO *et al.*, 1998; VONG *et al.*, 2007).

Anexina A1 é um proteína pró-resolutiva endógena, capaz de regular a inflamação sem bloquear a fase pró-inflamatória (DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012). Este conceito é muito importante visto que a regulação de um processo inflamatório exacerbado é essencial para reestabelecer a homeostase e por outro lado o bloqueio do processo inflamatório pode

prejudicar a eliminação do patógeno em questão. Sendo assim, a AnxA1 regula negativamente a transmigração de neutrófilos, induz a apoptose de neutrófilos ativados e promove a fagocitose desses neutrófilos apoptóticos pelo processo de eferocitose (SUGIMOTO, MICHELLE AMANTÉA *et al.*, 2016). Além disso, AnxA1 tem sido associada também ao recrutamento de monócitos, ao reparo tecidual e à fagocitose de partículas de látex e zymosan (LEONI *et al.*, 2015; PATEL, DEVANG M *et al.*, 2011; YONA *et al.*, 2006).

Diversos estudos mostraram o papel benéfico da AnxA1 em modelos murinos ou em experimentos *in vitro* de tuberculose, sepse, pleurisia, dano pulmonar agudo, câncer de cabeça e pescoço e hepatite C (GARCIA PEDRERO *et al.*, 2004; GOBBETTI *et al.*, 2014; HIRAMOTO *et al.*, 2015; LIAO *et al.*, 2017; VAGO *et al.*, 2016; VANESSA *et al.*, 2015). Esta melhora se dá principalmente pela capacidade da proteína de reduzir o infiltrado neutrofílico, sem alterar a capacidade destas células de realizarem sua função. Por outro lado, outros trabalhos descrevem o papel prejudicial da AnxA1 em modelos de infecção por Influenza, câncer de laringe, câncer gastrointestinal e câncer de mama (ARORA *et al.*, 2016; GASTARDELO *et al.*, 2014; MORAES *et al.*, 2017; SATO *et al.*, 2011). Esta piora se deve ao fato da anexina A1 contribuir para a replicação e proliferação viral, para a proliferação celular e metástase. Uma vez que a anexina A1 tem apresentado papel dual no contexto inflamatório, o estudo da sua função frente a estímulos específicos é essencial para predizer se a intervenção com esta proteína terá potencial benéfico ou não.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

*S. pneumoniae* é responsável por alta taxa de infecção e de mortalidade. Aliado a isso, a vacinação e o tratamento com antibiótico não são 100% eficazes. Além disso, a resposta inflamatória exacerbada desencadeada pela infecção contribui para a gravidade da doença. Tem sido sugerido o uso de terapias anti-inflamatórias associadas aos antibióticos, porém elas apresentam muitos efeitos colaterais e baixa eficácia (CORRÊA; LUNDGREN; SILVA, 2009).

Sendo assim, conhecer e entender as moléculas envolvidas na regulação do processo pró-inflamatório é essencial. Recentemente, moléculas envolvidas na fase de resolução da inflamação têm sido estudadas no contexto pró-inflamatório e têm demonstrado importância neste processo. Portanto o estudo de moléculas pró-resolutivas endógenas tem chamado atenção por oferecer uma oportunidade terapêutica diferente (PERRETTI, MAURO *et al.*, 2015).

A anexina A1, proteína pró-resolutiva endógena, é capaz de modular a resposta inflamatória, promover a resolução da inflamação e também promover reparo tecidual (LEONI *et al.*, 2015; SUGIMOTO, MICHELLE AMANTÉA *et al.*, 2016). Para exercer tais funções a ligação de AnxA1 ao FPR2 é essencial, porém tal proteína também pode agir de modo intracelular ou se ligando a outras proteínas (BELVEDERE *et al.*, 2014; SOLITO, E *et al.*, 2000).

Levando em conta que a resposta inflamatória exacerbada na pneumonia pneumocócica contribui de forma importante para os altos índices de mortalidade e que a AnxA1 tem como função modular a inflamação, promover resolução e reparar o tecido, o estudo desta proteína no processo inflamatório desencadeado por *S. pneumoniae* pode abrir novos caminhos para a compreensão da doença e para seu tratamento. Além disso, o estudo de seu receptor se faz importante uma vez que seu modo de ação não é 100% dependente de FPR2 e ainda, este receptor também pode ser um potencial alvo terapêutico.

## 2.1. Objetivo geral:

Estudar o papel da proteína anexina A1 e a contribuição de seu receptor FPR2 no modelo murino de pneumonia pneumocócica. Com posterior avaliação do efeito do tratamento com o peptídeo Ac2-26 em animais infectados com *S. pneumoniae*.

### 2.1.1. Objetivos específicos:

- 1- Avaliar o papel da proteína anexina A1 e de seu receptor FPR2 em animais AnxA1 KO, Balb/C WT, FPR2/3 KO e C57Bl/6 WT infectados com  $5 \times 10^4$  CFU de *S. pneumoniae* quanto a:
  - a. Letalidade causada pela infecção
  - b. Parâmetros inflamatórios e carga bacteriana dos animais infectados
  - c. Dano tecidual causado pela infecção
  - d. Função pulmonar dos animais infectados
- 2- Avaliar o efeito do tratamento com Ac2-26 em animais Balb/C WT infectados com  $10^5$  /  $5 \times 10^5$  CFU de *S. pneumoniae* sobre:
  - a. Parâmetros inflamatórios e carga bacteriana
  - b. Dano tecidual
  - c. Letalidade de animais tratados com Ac2-26 em associação ou não com antibiótico

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Os experimentos com animais foram realizados em camundongos BALBc e C57BL/6 machos de 8 a 10 semanas, fornecidos pelo Biotério central da UFMG. Foram utilizados também camundongos deficientes para Anexina A1 cedidos pela Prof.<sup>a</sup> Patrícia Martins do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil (HANNON *et al.*, 2003) e camundongos deficientes para FPR2/3 cedidos pelo Prof. Mauro Perretti do William Harvey Research Institute, Londres, Inglaterra (DUFTON *et al.*, 2010). A deleção genética apenas em FPR2 não foi possível devido a presença de um de seus exons entre o gene codificante para FPR3, sendo assim, os animais deficientes para FPR2, são também deficientes para FPR3 (FLOWER D 'ACQUISTO *et al.*, 2011).

As matrizes cedidas foram mantidas no Biotério de Imunofarmacologia do ICB – UFMG e os animais utilizados foram machos de 8 a 10 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas microisoladoras, em estantes para animais com filtros de entrada e saída de ar, 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).

#### 3.2. *Streptococcus pneumoniae*

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303, sorotipo 3, cedida pela Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira do Instituto Butantã, São Paulo, Brasil. O cultivo das bactérias foi realizado em caldo de cultura Todd Hewitt acrescido de 0.5% de extrato de levedura (THY) e Ágar Sangue (THY acrescido de 5% de sangue). No dia anterior à infecção, as bactérias foram plaqueadas e incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO<sub>2</sub>, por 12 horas. Em seguida, as bactérias foram transferidas para 10mL de caldo de cultura e incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO<sub>2</sub> até atingir a fase exponencial de crescimento - densidade óptica (D.O) de 0.4 (600 nm). Após centrifugação e duas lavagens com 10 mL de

salina 0.9% estéril apirogênica, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de salina estéril e a partir dessa suspensão de bactérias, diluições em salina estéril foram realizadas, de forma que 40µL de solução contivesse os inóculos de  $5 \times 10^4$  ou  $10^5 / 5 \times 10^5$  CFU. Em todos os experimentos o inóculo foi confirmado através do plaqueamento da suspensão de bactérias em diferentes diluições e contagem das colônias após 12 horas de incubação a 37°C em atmosfera rica em CO<sub>2</sub>.

### 3.3. Infecção dos camundongos

A via de infecção utilizada foi a intranasal. Os animais foram anestesiados pela via subcutânea com uma solução contendo 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina. Após a anestesia os camundongos foram divididos em grupos a serem infectados com *Streptococcus pneumoniae* e grupos controles (mock - não infectados). Os animais infectados com *Streptococcus pneumoniae* receberam 40 µL do inóculo da bactéria contendo  $5 \times 10^4$  CFU – pneumonia moderada – ou  $10^5 / 5 \times 10^5$  CFU – pneumonia grave –. Utilizando ponteiras estéreis, a solução contendo a bactéria foi gotejada lentamente nas narinas dos animais, de modo que eles aspiraram todo o volume correspondente aos inóculos. Todo o procedimento de infecção foi realizado no fluxo laminar e todos os animais foram monitorados até se recuperarem da sedação causada pelo anestésico.

### 3.4. Droga e esquema de tratamento

Para a avaliação do efeito do peptídeo Ac2-26 (sintetizado pela GenScript) durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae*, os camundongos foram tratados com 6mg/kg do peptídeo ou com veículo – salina estéril em 0,5% de DMSO - via intraperitoneal. Para avaliação dos parâmetros inflamatórios, os animais foram tratados 12 horas após a infecção e eutanasiados após 24 horas. Para avaliação da letalidade os animais foram tratados 12, 24, 36, 48 e 60 horas pós-infecção. Para avaliação da associação do efeito do peptídeo Ac2-26 com um antibiótico usado na clínica durante a pneumonia pneumocócica, os animais foram tratados também com 10mg/Kg

de ceftriaxona sódica (Eurofarma) 60 e 72 horas pós-infecção e a letalidade foi acompanhada. Um grupo de animais infectados e tratados apenas com o antibiótico no mesmo esquema terapêutico foi utilizado para efeito comparativo.

### **3.5. Acompanhamento da letalidade**

Os animais infectados foram pesados e acompanhados durante 10 dias para a observação da letalidade. Animais que atingiram 85% do seu peso corporal inicial foram eutanasiados de acordo com as regras do comitê de ética animal (“Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal”, 2016).

### **3.6. Eutanásia e coleta das amostras para análise**

Para todos os experimentos os animais foram anestesiados com uma solução de 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina. E posteriormente foram eutanasiados pelo método de exsanguinação, para a coleta de sangue do plexo braquial, para posterior contagem de bactérias e dosagem de citocinas (RAUPP, 2013). Após a eutanásia, os animais foram submetidos à exposição da traqueia para a realização do lavado broncoalveolar (BAL). O lavado consiste na introdução de uma cânula de 1.7 mm na traqueia do animal, a qual é posteriormente conectada a uma seringa de 1mL com PBS. Este 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 lavado broncoalveolar foi utilizado para contagem de células, contagem de bactérias e dosagem de proteínas e citocinas. Após a realização do BAL, os animais tiveram os seus pulmões perfundidos com uma seringa de 5mL de PBS conectada a uma agulha de 21G. O ventrículo esquerdo foi cortado e os 5 mL de PBS foram injetados no ventrículo direito até o pulmão inflar e a solução de PBS sangue sair pelo ventrículo esquerdo. O lobo esquerdo foi coletado para histologia e os lobos direitos foram processados para o ensaio de MPO (atividade da mieloperoxidase).

### 3.6.1. Contagem de células e bactérias

#### 3.6.1.1- Contagem de bactérias no lavado broncoalveolar

Após a realização do lavado broncoalveolar (BAL), 100µl do fluido recuperado passou por diluições seriadas e foram plaqueados em três placas de ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO<sub>2</sub> por 15 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 (BALF).

#### 3.6.1.2- Contagem de bactérias no sangue

Foram retirados 100µl de sangue do plexo braquial dos camundongos, do qual 50ul foi plaqueado puro e os outros 50ul passou por diluições seriadas as quais foram plaqueadas em três placas de ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera rica em CO<sub>2</sub> por 15 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.

#### 3.6.1.3 - Contagem total e diferencial de células

O fluido do BAL recuperado foi submetido à centrifugação a 4°C a 300g por 8 minutos. O sobrenadante foi recolhido e congelado, para posterior dosagem de citocinas por ELISA, enquanto o pellet foi ressuspendido em 100 µL de BSA (Albumina sérica bovina) 3% em PBS. A 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 ressuspendidas 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) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células em cada contagem.

### 3.6.2. Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos nos pulmões pode ser correlacionado com a atividade da enzima MPO, a qual está presente em altos níveis em neutrófilos e, por isso é usada como indicador da presença dessas células (Russo *et al.* 2009). Para isso, 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 NaPO<sub>4</sub>, 0.015 M de NaEDTA) utilizando para tanto um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Após centrifugação por 10 minutos, a 4°C a 9400 g, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi submetido à lise de hemácias através da adição de 0,75 mL de NaCl 0.2%, seguida de 0.75 mL de uma solução de NaCl 1.6% com glicose 5%. A solução final foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos, a 4°C a 9400 g. O sobrenadante foi novamente desprezado e foram adicionados 0.8 mL de Tampão 2 (0.05 M de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e 0.5% de HETAB em pH 5.4) ao pellet, o qual foi novamente homogeneizado.

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

### 3.6.3. Dosagem de proteínas no BALF

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

### 3.6.4. Dosagem de citocinas por ELISA

O sobrenadante do lavado broncoalveolar foi utilizado para a dosagem das citocinas CXCL1, TNF- $\alpha$ , CXCL2 e IL-10. E o soro dos animais foi utilizado para dosar TNF- $\alpha$  e IL-6. O protocolo utilizado foi estabelecido no kit de ELISA murino da R&D Systems, em placa de 96 poços. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, e adicionados à placa de 96 poços para que a sensibilização ocorresse overnight à 4° C. A placa foi lavada 3 vezes e em seguida, foi realizado o bloqueio da reação com 1% de albumina bovina diluída em PBS por 2 horas à temperatura ambiente, para evitar a ligação inespecífica durante o ensaio. Após o bloqueio, a placa foi lavada e 50ul de amostra foi adicionado a cada poço e incubado overnight. No dia seguinte, após a lavagem, os anticorpos de detecção (diluídos em 0.1% de BSA/PBS) foram adicionados à placa e esta foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingen” - 1:4000) e revelada com o substrato OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride - Sigma) com 0.006% peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.

### **3.7. Análise da função pulmonar**

A função pulmonar dos animais selvagens e deficientes para AnxA1 e FPR2 foi realizada pela análise de parâmetros espirométricos. Os camundongos foram anestesiados com uma injeção subcutânea de cetamina e xilazina (15 mg/kg xilazina e 200 mg/kg cetamina) para manutenção da respiração espontânea sob anestesia. Após a traqueostomia, os camundongos foram canulados e alocados em um pletismógrafo corporal com ventilação controlada, conectado a um computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, North Carolina - USA). O protocolo de medições foi iniciado com o respirador automático ligado em uma frequência respiratória de 160.

### **3.8. Ensaio de ROS**

Neutrófilos do peritônio de camundongos WT e AnxA1 KO estimulados por 6h com 3mL de tioglicolato 4% foram coletados e contados. Após a contagem, os neutrófilos foram ressuspensos em meio RPMI sem fenol e foram plaqueados  $5 \times 10^5$  neutrófilos por poço em uma placa de 96 poços. Logo em seguida foi adicionado  $5 \times 10^5$  bactérias (*S. pneumoniae* 6303) em triplicata nos poços contendo tanto células WT quanto células AnxA1 KO. Três poços contendo células WT e outros três contendo células AnxA1 KO não receberam o estímulo. Posteriormente, foi adicionado 10uM de luminol em cada um dos poços e a placa foi colocada no luminômetro (Auto Lumat LB953 model, EG & G Berthold) por 2 horas a 37°C. A quimiluminescência foi avaliada a cada minuto e gravada em f.c.m. (fótons contados por minuto).

### **3.9. Avaliação histológica**

Após a eutanásia dos animais os pulmões esquerdos foram recolhidos e fixados em solução de formol 10% tamponado. As amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo e fixadas em lâminas histológicas. Em

seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As análises das lâminas foram realizadas por patologista experiente, sem conhecimento prévio sobre os grupos experimentais, em microscópio óptico nas objetivas de 10 e 40 vezes, para determinação do padrão inflamatório. O grau de inflamação foi quantificado usando um escore semi-quantitativo da gravidade das alterações observadas. Os pontos foram distribuídos da seguinte forma: 0-5 para inflamação do parênquima e 0-5 para o infiltrado de polimorfonuclear (0-ausente, 1-mínimo, 2-pouco, 3-moderado, 4-intenso e 5-muito intenso); 0-4 inflamação das vias aéreas e 0-4 inflamação vascular (0-ausência de células inflamatórias, 1- presença de poucas células inflamatórias, 2- presença de inflamação significativa e focalizada, 3- Presença de inflamação disseminada, 4- Inflamação significativa e disseminada). O total do escore histopatológico representa 18 pontos. Campos de imagens representativos de cada grupo foram capturados e fotografados no Microscópio Olympus Bx41 nas objetivas de 5 e 20x.

### 3.10. Análises estatísticas

Antes das análises estatísticas os conjuntos de dados foram submetidos à análise de distribuição e normalidade (*Kolmogorov-Smirnov test*). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou apenas como média. As médias foram comparadas utilizando-se análise de variância two-way ANOVA e one-way ANOVA. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney ou o teste qui-quadrado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de  $p < 0.05$ . Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad PRISM 6. 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 com  $p < 0.05$  foram representadas graficamente com um asterisco (\*); diferenças com  $p < 0.01$  foram representadas com dois asteriscos (\*\*); diferenças com  $p < 0.001$  foram representadas com dois asteriscos (\*\*\*) e com  $p < 0.0001$  com três asteriscos (\*\*\*\*).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Animais deficientes para anexina A1 são mais susceptíveis à pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa apresentaram uma associação entre a redução dos níveis de proteína anexina A1 no pulmão de animais com pneumonia pneumocócica grave e a maior susceptibilidade desses animais à infecção (TAVARES *et al.*, 2015). Com o intuito de avaliar esta associação e o envolvimento do receptor de AnxA1, FPR2, na susceptibilidade à infecção por *S. pneumoniae* foram estudados animais deficientes para a proteína e seu receptor, e foi testada a eficácia do tratamento com um peptídeo sintético da AnxA1- Ac2-26.

#### 4.1.1. Anexina A1 é importante para a sobrevivência dos animais no modelo de pneumonia pneumocócica

Animais foram infectados com  $5 \times 10^4$  CFU de *S. pneumoniae* e acompanhados durante 10 dias quanto a letalidade. Os animais AnxA1 KO apresentaram maior susceptibilidade à infecção e apenas 10% dos animais sobreviveram. Já os animais WT apresentaram 70% de sobrevivência, indicando maior resistência à infecção quando comparados com os animais AnxA1 KO (Figura 5). Sendo assim, a deficiência para AnxA1 foi prejudicial para a sobrevivência dos animais.

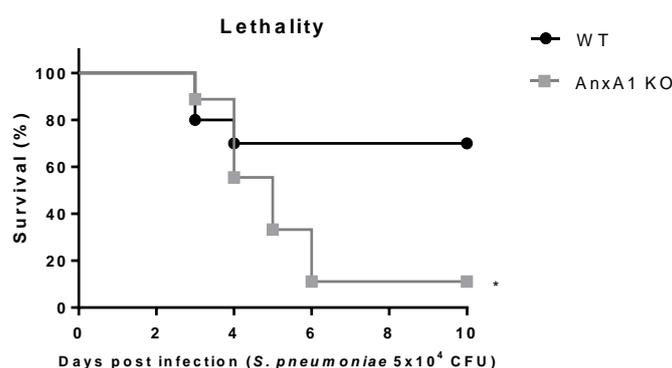


Figura 5: Letalidade de animais Balb/C WT e AnxA1 KO infectados com *S. pneumoniae* ( $5 \times 10^4$  CFU) durante 10 dias. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência de 8 ou mais animais por grupo e a diferença foi representada com \* para  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2. Anexina A1 é importante para o controle do recrutamento celular e da carga bacteriana

Devido à maior susceptibilidade dos animais AnxA1 KO observada na maior letalidade desses animais frente a infecção pelo *S. pneumoniae*, estudos cinéticos foram realizados para elucidar os possíveis fatores responsáveis pela menor sobrevivência destes animais. Animais Balb/C WT e AnxA1 KO foram eutanasiados 24, 48 e 72h pós infecção, sendo o ponto de 72h equivalente ao ponto de início da letalidade. Nos pontos de 24h e 72h foi observado um maior recrutamento de leucócitos (Figura 6A) e neutrófilos (Figura 6B) para o espaço alveolar nos animais AnxA1 KO quando comparados com os animais WT. De maneira similar, no ponto mais tardio, foi observado um maior recrutamento de mononucleares (Figura 6C) nos animais deficientes para anexina A1. Complementar ao dado de neutrófilos no BALF, os animais AnxA1 KO apresentaram maior atividade de mieloperoxidase no pulmão, enzima produzida principalmente por neutrófilos, no tempo de 48h quando comparados aos animais Balb/C WT (Figura 6D). Apesar do infiltrado de células fagocíticas ter sido mais expressivo nos animais AnxA1 KO, estes animais tiveram maior carga bacteriana nos tempos de 24h e 48h (Figura 6E), e conseqüentemente apresentaram bacteremia mais precoce que os animais Balb/C WT (Figura 6F).

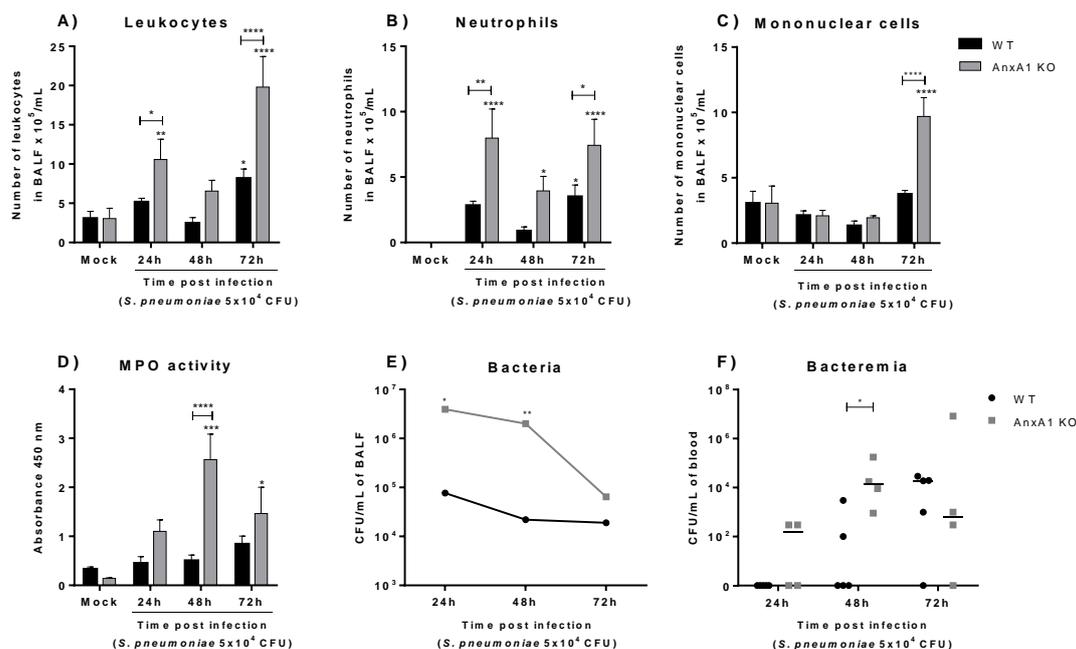


Figura 6: Avaliação do recrutamento celular e da carga bacteriana em animais Balb/C WT e AnxA1 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por *S. pneumoniae*. Contagens de células totais (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) presentes no BALF. Medida da atividade de mieloperoxidase no pulmão (D). Número de bactérias presente no BALF (E) e no sangue (F). Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo e foram representados com \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado. No gráfico E as comparações foram feitas entre WT e KO nos respectivos tempos.

#### 4.1.3. Anexina A1 é importante para o controle da produção de citocinas

Para avaliar parâmetros inflamatórios desencadeados pela pneumonia pneumocócica, foram dosadas citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), quimiocinas envolvidas no recrutamento neutrofílico (CXCL1 e CXCL2) e uma citocina anti-inflamatória (IL-10). Os animais AnxA1 KO apresentaram maiores níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 7A) nos tempos de 24h e 48h quando comparados aos animais Balb/C WT. De forma mais tardia, os animais deficientes para AnxA1 apresentaram maiores níveis de CXCL2 (Figura 7B), CXCL1 (Figura 7C) e IL-10 (Figura 7D) nos tempos de 48h e 72h quando comparados aos animais Balb/C WT. Além disso, os níveis de citocina sérica usada como indicativo de sepse, IL-6, estavam elevados em ambos os animais no tempo de 72h (Figura 7E).

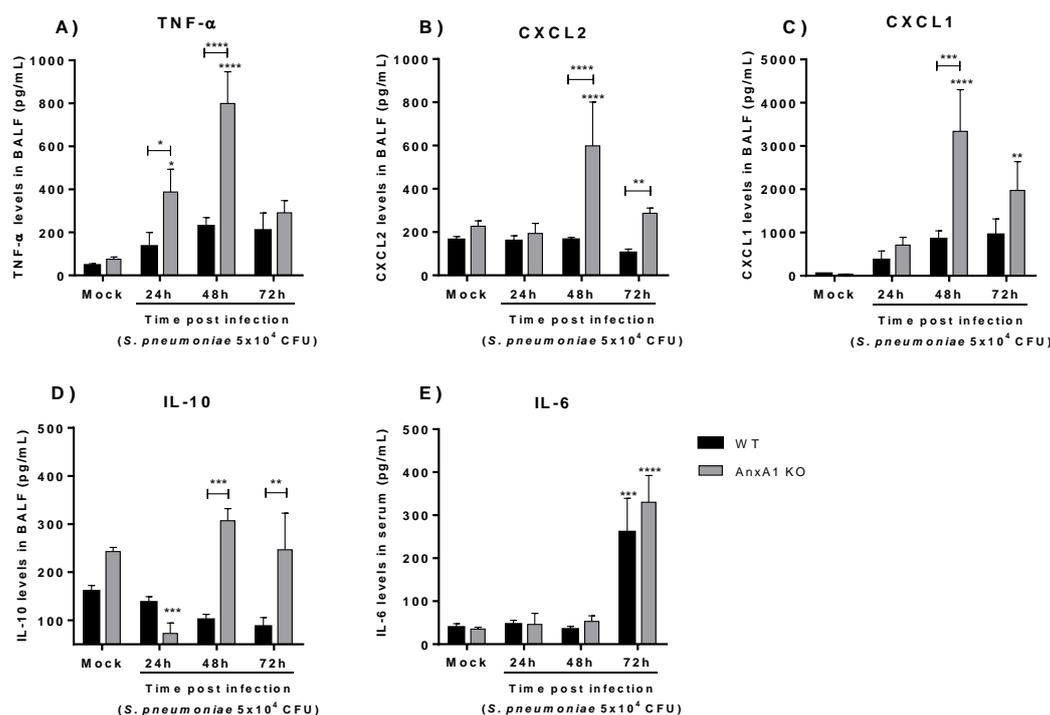


Figura 7: Produção de citocinas por animais Balb/C WT e AnxA1 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por *S. pneumoniae*. Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  (A), CXCL2 (B), CXCL1 (C) e IL-10 presentes no BALF, e IL-6 presente no soro(D). Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo e foram representados com \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado.

#### 4.1.4. Anexina A1 é importante para o controle do dano tecidual, do infiltrado inflamatório e para a manutenção das funções pulmonares

Visando avaliar a atividade neutrófilica e sua capacidade em causar dano após estímulo com *S. pneumoniae*, espécies reativas de oxigênio foram dosadas *in vitro*. Foi observado que a estimulação de neutrófilos, tanto de animais deficientes quanto dos selvagens, com *S. pneumoniae* induz a liberação imediata de ROS. Porém os neutrófilos de animais AnxA1 KO após estímulo produziram quantidades maiores de ROS que neutrófilos de animais Balb/C WT (Figura 8A e B).

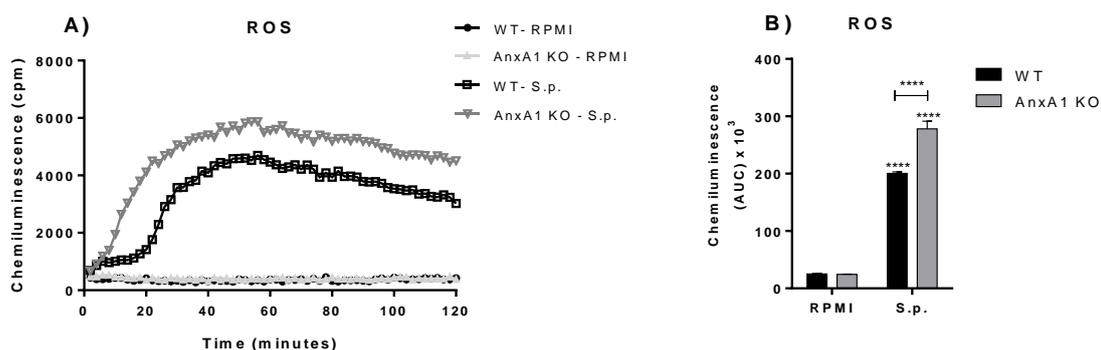


Figura 8: Dosagem de espécies reativas de oxigênio produzidas por células de Balb/C WT e AnxA1 KO *in vitro*. Quantificação de ROS produzidas por neutrófilos de animais Balb/C WT e AnxA1KO após estímulo com *S. pneumoniae*, MOI = 1. Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM. N = 3 com \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados com o grupo controle (RPMI) ou com o grupo indicado.

Em adição à avaliação do dano tecidual gerado nos animais AnxA1 KO, proteínas foram quantificadas no lavado broncoalveolar, como uma medida indireta de edema. Foi observado que animais AnxA1 KO apresentaram maior concentração de proteína (Figura 9A) no tempo de 48h quando comparado aos animais Balb/C WT. Além disso, foi analisado o infiltrado inflamatório pulmonar e atribuído a ele pontuações de acordo com a intensidade e sua localização. Animais infectados apresentaram aumento do infiltrado inflamatório ao longo do tempo. Porém os animais deficientes para AnxA1 apresentaram um aumento mais expressivo da inflamação no tempo de 48h (Figura 9B e setas nas pranchas representativas). No tempo de 72h o infiltrado inflamatório se igualou entre os animais AnxA1 KO e os animais Balb/C WT (Figura 9B). Este resultado foi observado devido à substituição de áreas inflamadas por áreas necrosadas nos pulmões dos animais AnxA1 KO, indicado pela cabeça de seta na Figura 9. Uma vez que a necrose foi observada somente no grupo de animais AnxA1 KO após 72h de infecção, este parâmetro não foi contabilizado no escore, apesar de ter sido avaliado e registrado.

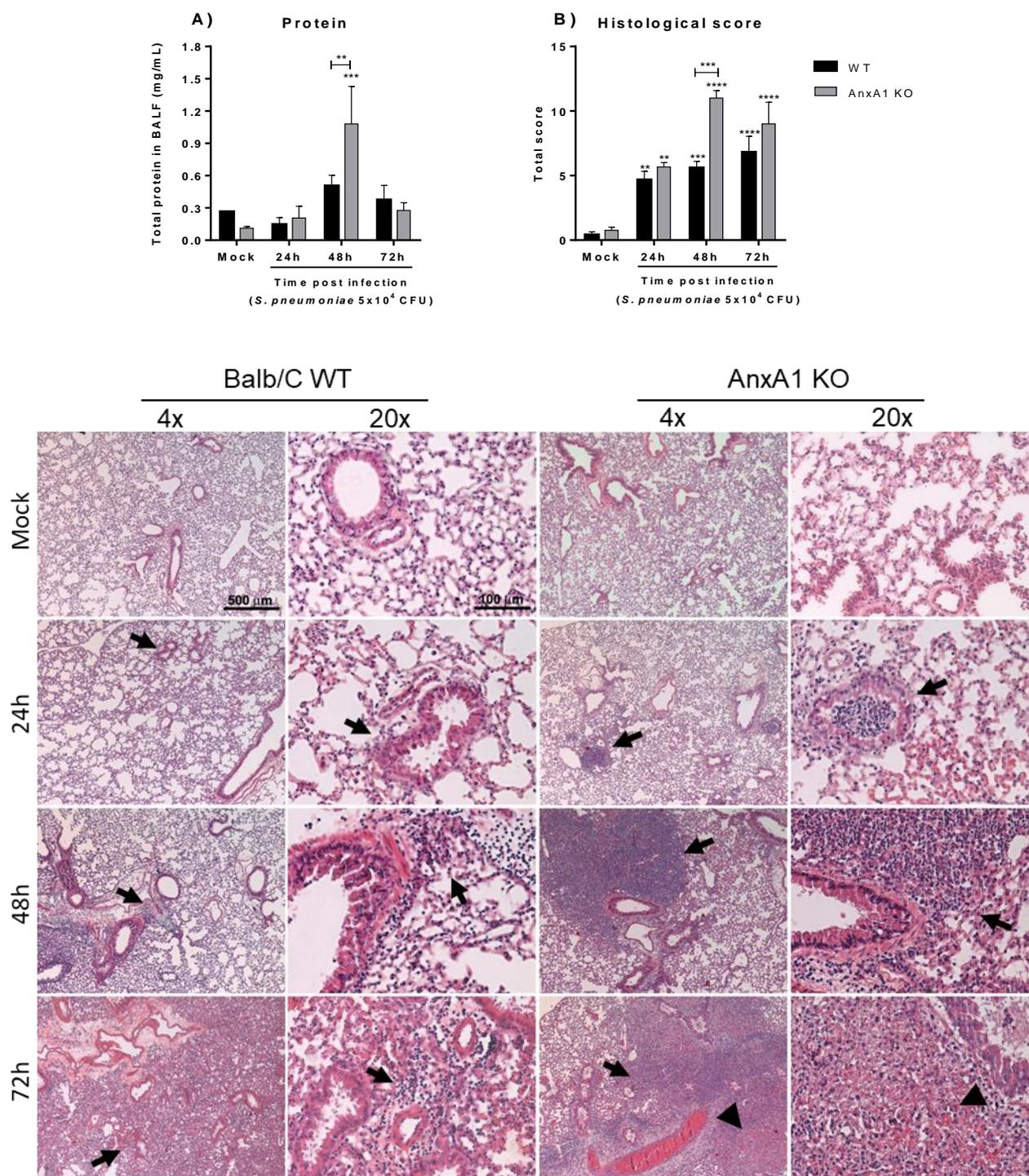


Figura 9: Quantificação de proteínas totais e análise do escore histológico do pulmão de animais Balb/C WT e AnxA1 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por *S. pneumoniae*. Dosagem da quantidade total de proteína no espaço alveolar (A) e escore histológico do infiltrado inflamatório pulmonar (B). Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo e foram representados com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado. Imagens representativas dos pulmões de animais controles e infectados com *S. pneumoniae*. Cabeça de seta indicando área de necrose tecidual e seta indicando infiltrado inflamatório.

Com intuito de avaliar as alterações funcionais resultantes da inflamação exacerbada a mecânica pulmonar foi avaliada e foram analisados os parâmetros de resistência pulmonar, complacência dinâmica e volume de ar expirado forçado em 100 milissegundos. De acordo com as alterações histológicas, os animais deficientes para AnxA1 também apresentaram aumento da resistência pulmonar, redução da complacência dinâmica e redução do volume de ar expirado forçado quando comparados aos animais Balb/C WT e aos seus controles.

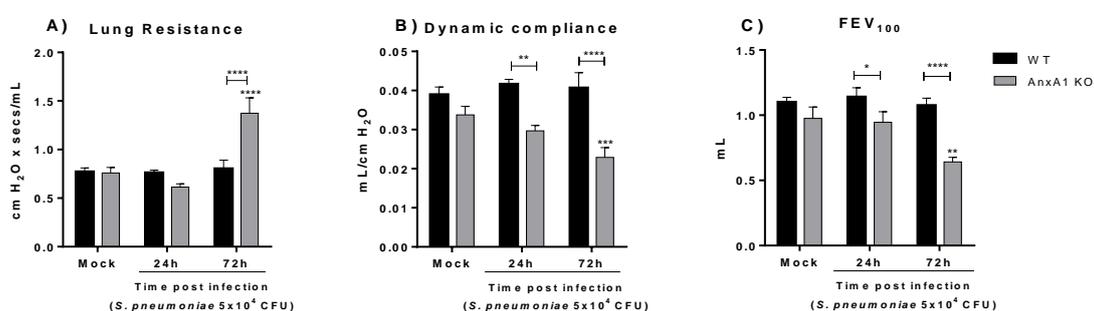


Figura 10: Avaliação da função pulmonar de animais Balb/C WT e AnxA1 KO após 24 e 72h de infecção com *S. pneumoniae*. Resistência (A), complacência dinâmica (B) e volume forçado de ar expirado nos primeiros 100 ms (C) após 24h e 72h de infecção com *S. pneumoniae*. Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo e foram representados com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado.

#### 4.2. Animais deficientes para FPR2/3 são mais susceptíveis à pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*

Sabe-se que a proteína anexina A1 pode atuar de maneira intracelular, sem a necessidade de se ligar e ativar seu receptor. No entanto, a maioria das funções imunomoduladoras e pró-resolutivas descritas até o momento para AnxA1 são dependentes da sua ligação ao receptor FPR2 (PERRETTI, MAURO; D'ACQUISTO, 2009). Para avaliar se o papel da proteína AnxA1 no modelo de pneumonia pneumocócica seria dependente do receptor FPR2, animais FPR2/3 KO foram infectados com *S. pneumoniae* e os parâmetros inflamatórios foram analisados. A deleção genética apenas em FPR2 não foi possível devido a presença de um de seus exons entre o gene codificante para FPR3, sendo assim, os animais deficientes para FPR2, são também deficientes

para FPR3 (FLOWER D 'ACQUISTO *et al.*, 2011). Visto que existem poucos estudos sobre o receptor FPR3, que sua função não está bem estabelecida e que ele é fracamente ativado pelo seu único ligante (F2L), a deleção deste receptor parece não ter importância biológica para o modelo estudado (RABIET *et al.*, 2011).

#### 4.2.1. O receptor FPR2 é importante para a sobrevivência dos animais no modelo de pneumonia pneumocócica

Camundongos C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO foram infectados com  $5 \times 10^4$  CFU de *S. pneumoniae* e acompanhados durante 10 dias para letalidade. Os animais deficientes para FPR2/3 apresentaram início da letalidade no dia 3 enquanto para animais C57Bl/6 selvagens o início da letalidade foi no dia 4. Após 7 dias de infecção 100% dos animais FPR2/3 KO morreram, por outro lado, apenas 40% dos animais C57Bl/6 WT morreram após a infecção (Figura 11). Isto indica que animais deficientes para FPR2/3 apresentam maior susceptibilidade à infecção por *S. pneumoniae* quando comparados com os animais C57Bl/6 selvagens.

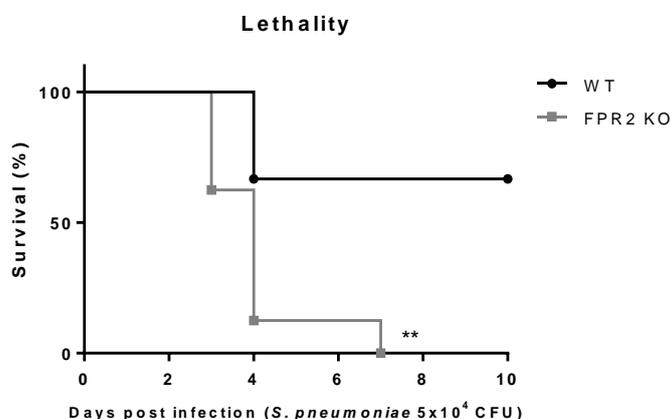


Figura 11: Letalidade de animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO infectados com *S. pneumoniae* ( $5 \times 10^4$  CFU) durante 10 dias. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência de 8 ou mais animais por grupo e a diferença foi representada com \*\* para  $p < 0,01$ .

#### 4.2.2. O receptor FPR2 é importante para o controle do recrutamento celular e da carga bacteriana

Objetivando compreender as possíveis alterações que resultaram na maior susceptibilidade dos animais deficientes para FPR2/3 frente a uma infecção por *S. pneumoniae*, uma cinética da infecção foi realizada. Para isso, animais C57Bl/6 selvagens e animais deficientes para FPR2/3 foram infectados com  $5 \times 10^4$  CFU de *S. pneumoniae* e eutanasiados após 24h, 48h e 72h de infecção. Sendo o último ponto equivalente ao ponto de início da letalidade. Nesta cinética foi observado que os animais FPR2/3 KO apresentaram maior número total de leucócitos (Figura 12A), refletindo o maior número de neutrófilos (Figura 12B) no lavado broncoalveolar nos tempos de 48h e 72h quando comparados com os animais C57Bl/6 WT e com seus controles não infectados. Não houve aumento de células mononucleares, nem diferença entre os grupos estudados (Figura 12C). Similar à contagem de neutrófilos no BALF, animais deficientes para FPR2/3 apresentaram maior atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar após 48h de infecção (Figura 12D). Por outro lado, o maior infiltrado de neutrófilos não resultou em diminuição da carga bacteriana, pelo contrário, a contagem de bactérias no BALF foi maior no tempo de 72h nos animais FPR2/3 KO quando comparados aos animais C57Bl/6 WT (Figura 12E). Conseqüentemente, estes animais também apresentaram bacteremia nos tempos de 48h e 72h, diferente dos animais C57Bl/6 WT, os quais não apresentaram bactéria no sangue em nenhum ponto da cinética (Figura 12F).

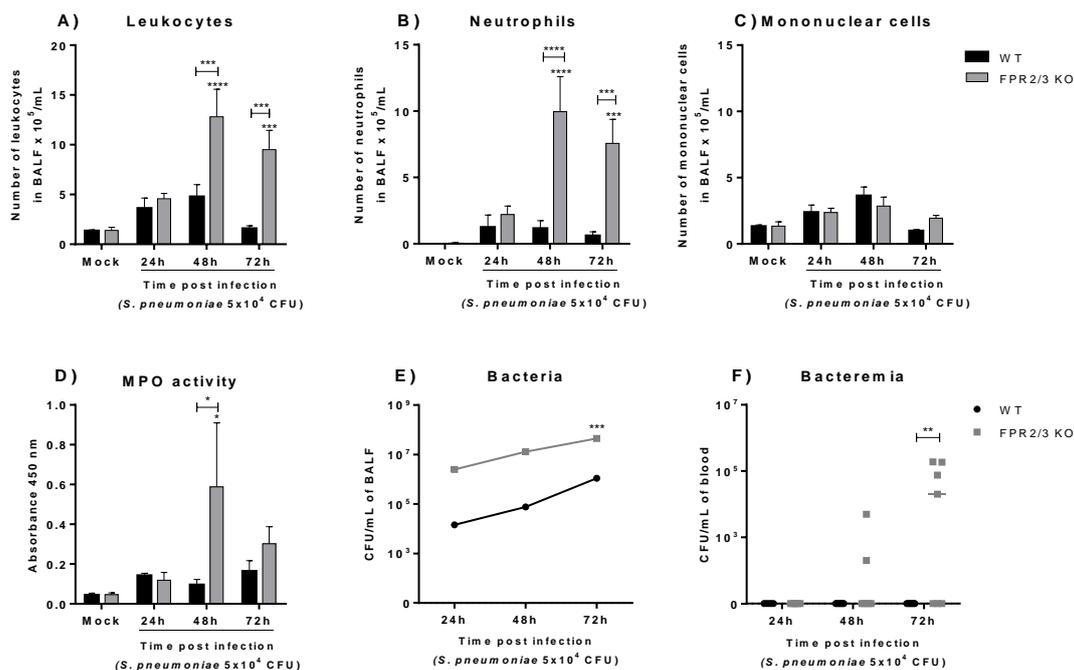


Figura 12: Avaliação do recrutamento celular e da carga bacteriana em animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por *S. pneumoniae*. Contagens de células totais (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) presentes no BALF. Medida da atividade de mieloperoxidase no pulmão (D). Número de bactérias presente no BALF (E) e no sangue (F). Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo e foram representados com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado. No gráfico E as comparações foram feitas entre WT e KO nos respectivos tempos.

#### 4.2.3. O receptor FPR2 é importante para o controle dos níveis de citocinas

Visando compreender o recrutamento celular observado tanto nos animais C57Bl/6 WT quanto nos animais FPR2/3 KO ao longo da cinética, foram dosadas citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), quimiocinas (CXCL1 e CXCL2) e uma citocina anti-inflamatória (IL-10). Animais FPR2/3 KO apresentaram um aumento na produção de TNF- $\alpha$ , CXCL2 e CXCL1 ao longo do tempo, sendo este aumento mais expressivo no tempo de 72h. Por outro lado, nos animais C57Bl/6 WT foi observada apenas uma tendência a aumentar os níveis de TNF- $\alpha$ . Sendo assim, os animais deficientes para FPR2/3 apresentaram maiores níveis de TNF- $\alpha$ , CXCL2 e CXCL1 no BALF quando comparados com os animais C57Bl/6 selvagens. De forma similar, foi observado nos animais FPR2/3 KO um aumento expressivo nos níveis de IL-10

no BALF no tempo de 72h após infecção, ao comparar com animais C57Bl/6 WT, os quais apresentaram níveis próximos ao limite mínimo de detecção. Este resultado está associado ao maior número de bactérias no BALF nos animais KO em 72h. Além disso, os níveis de IL-6 no soro estão mais altos nos animais FPR2/3 KO do que nos animais C57Bl/6 WT, indo de encontro ao fato da maioria dos animais FPR2/3 KO estarem com bacteremia e IL-6 ser um marcador de sepse (FAIX, 2013).

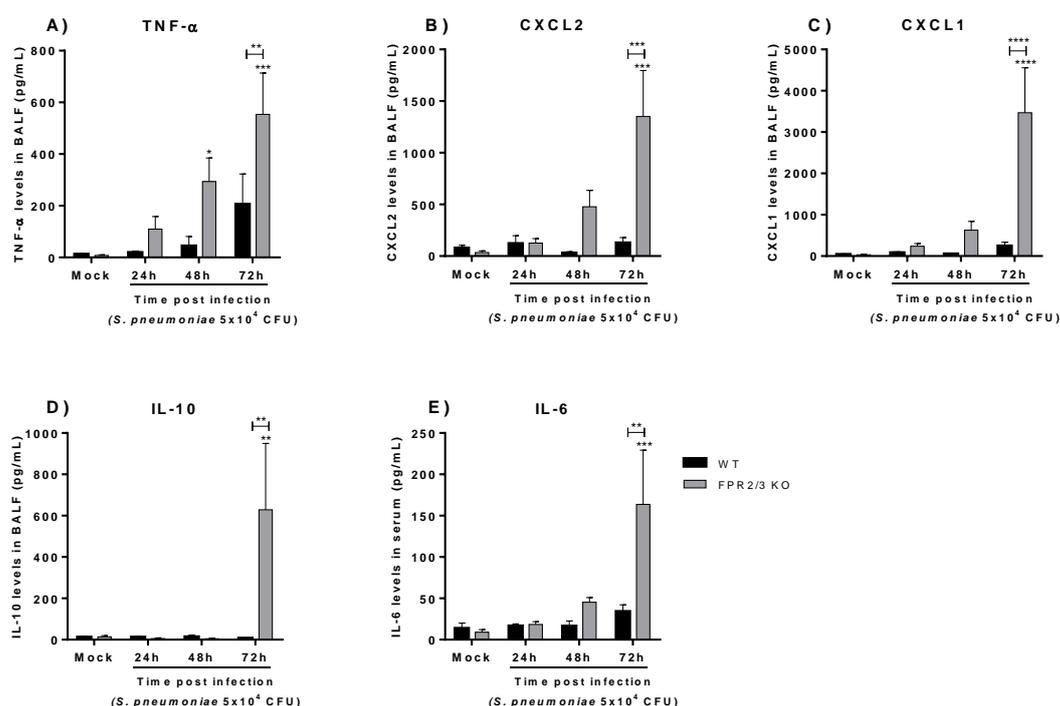
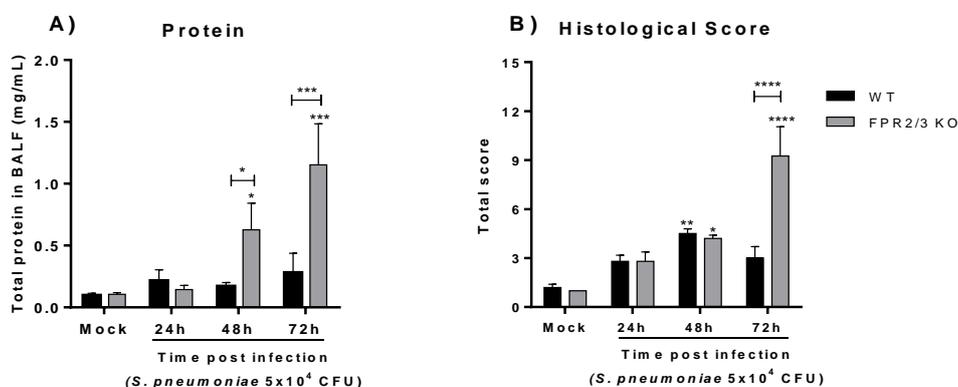


Figura 13: Produção de citocinas por animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por *S. pneumoniae*. Dosagem das citocinas TNF-α (A), CXCL2 (B), CXCL1 (C) e IL-10 presentes no BALF, e IL-6 presente no soro(D). Os resultados apresentam a média ± EPM de 5 animais por grupo e foram representados com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado.

#### 4.2.4. O receptor FPR2 é importante para o controle do infiltrado inflamatório e para a manutenção das funções pulmonares

Visando avaliar o dano tecidual causado pela infecção por *S. pneumoniae*, foi realizado a dosagem de proteína total no lavado broncoalveolar e o escore histológico dos pulmões dos animais após 24, 48 e

72h de infecção. Foi observado que a quantidade de proteína nos animais C57Bl/6 WT se manteve igual nos quatro grupos. Por outro lado, os animais FPR2/3 KO apresentaram elevação nas quantidades de proteína no lavado broncoalveolar ao longo do tempo. Além do aumento de proteína ao longo do tempo nos animais FPR2/3 KO, estes também apresentaram maiores quantidade de proteína nos tempos de 48h e 72h, quando comparados aos animais C57Bl/6 WT (Figura 14 A). Quando analisado o tecido pulmonar, os animais C57Bl/6 WT apresentaram um aumento de infiltrado inflamatório no tempo de 48h, porém no tempo de 72h este infiltrado foi reduzido. De modo similar, os animais deficientes para FPR2/3 apresentaram também um aumento no infiltrado inflamatório com 48h, mas diferente dos animais C57Bl/6 selvagens, este aumento foi intensificado no tempo de 72h (Figura 14B e setas nas pranchas representativas). Além do aumento expressivo do infiltrado inflamatório nos animais deficientes quando comparado aos animais selvagens, também foi observado apenas nestes animais a presença de necrose tecidual indicado pela cabeça de seta (Figura 14).



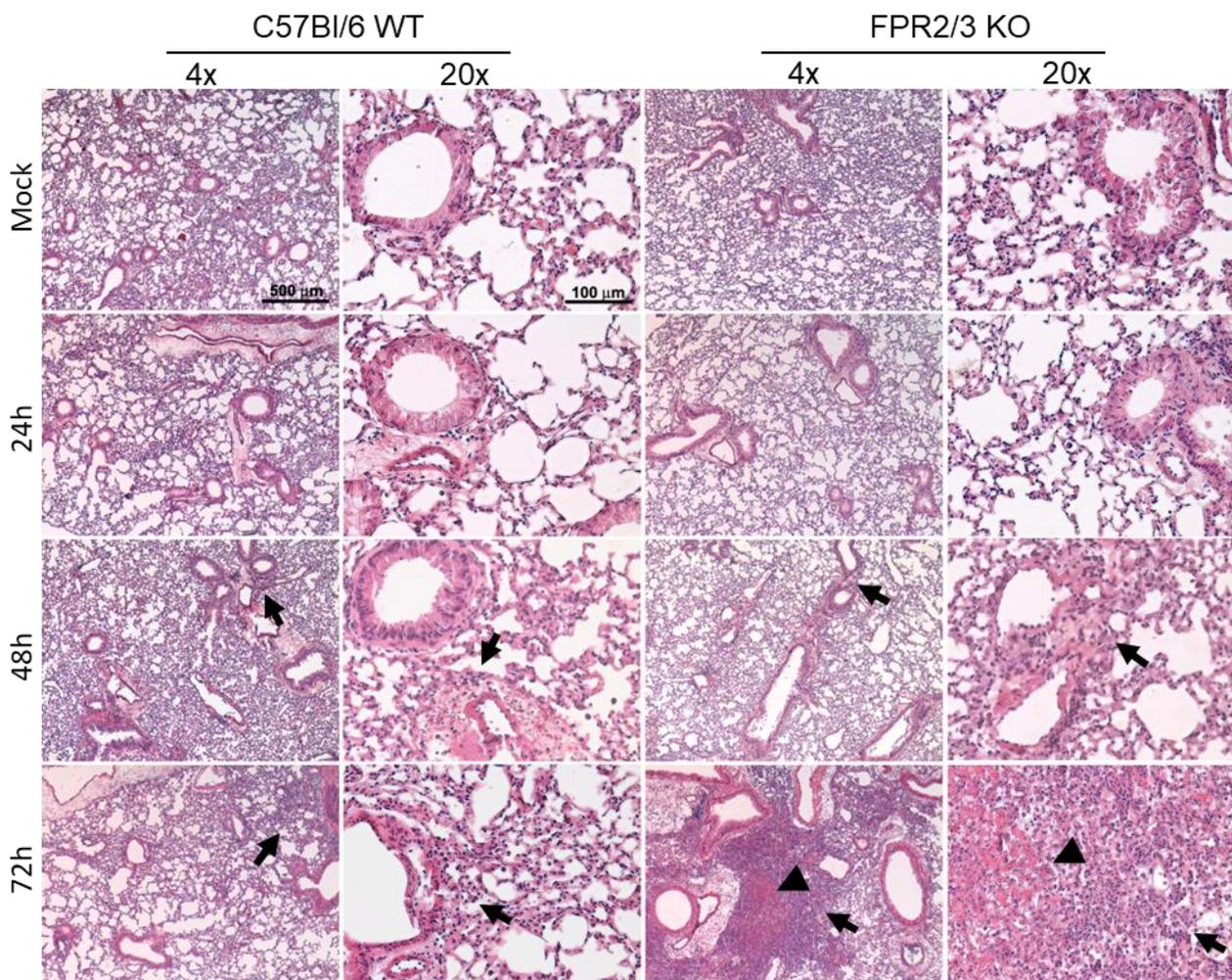


Figura 14: Quantificação de proteínas totais e análise do escore histológico do pulmão de animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção por *S. pneumoniae*. Dosagem da quantidade total de proteína no espaço alveolar (A) e escore histológico da inflamação pulmonar (B). Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo e foram representados com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado. Imagens representativas dos pulmões de animais controles e infectados com *S. pneumoniae*. Cabeça de seta indicando área de necrose tecidual e seta indicando infiltrado inflamatório.

Com intuito de analisar o impacto da inflamação excessiva na fisiologia pulmonar, a função pulmonar foi avaliada e os parâmetros analisados foram: resistência, complacência dinâmica e volume forçado de ar expirado nos primeiros 100 ms. Para isso animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO foram infectados com  $5 \times 10^4$  CFU de *S. pneumoniae* e a mecânica pulmonar foi avaliada. Animais deficientes para FPR2/3 apresentaram maior resistência pulmonar tanto no tempo de 24h quanto no tempo de 72h (Figura 15A). Já a complacência dinâmica e o volume forçado de ar expirado foram menores nos

animais FPR2/3 KO no tempo de 72h quando comparados com os animais C57Bl/6 WT e com seus respectivos controles (Figura 15B e C).

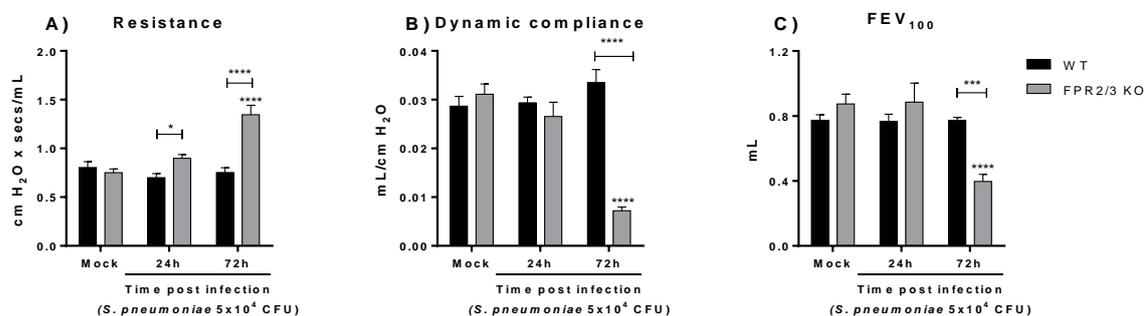


Figura 15: Avaliação da função pulmonar de animais C57Bl/6 WT e FPR2/3 KO após 24 e 72h de infecção com *S. pneumoniae*. Resistência (A), complacência dinâmica (B) e volume forçado de ar expirado nos primeiros 100 ms (C). Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo e foram representados com \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado.

#### 4.3. Animais tratados com Ac2-26 apresentaram melhora no quadro de pneumonia pneumocócica grave.

Após avaliar o papel da proteína AnxA1 no modelo murino de pneumonia pneumocócica e verificar sua importância para o controle da inflamação, da proliferação bacteriana e do dano tecidual via receptor FPR2, foi realizado o tratamento de animais infectados com o peptídeo sintético Ac2-26 que é capaz de mimetizar a ação da AnxA1 ao se ligar ao receptor FPR2.

##### 4.3.1. Animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução no recrutamento celular e na carga bacteriana

Para avaliar a eficácia do tratamento com Ac2-26 em animais Balb/C WT com pneumonia pneumocócica grave foram analisados parâmetros similares aos anteriores, utilizados para caracterizar a susceptibilidade dos animais deficientes para AnxA1 e para FPR2/3. Animais infectados com 10<sup>5</sup> CFU de *S. pneumoniae* foram tratados 12h após a infecção e eutanasiados após 24h. Os animais infectados e tratados com veículo apresentaram um aumento expressivo no número de leucócitos e neutrófilos, por outro lado o tratamento com Ac2-26 foi capaz de reduzir o infiltrado leucocitário (Figura 16A) e neutrófilico do BALF (Figura 16B). Não houve alteração na contagem de

células mononucleares no BALF (Figura 16C). Além disso, os animais tratados com veículo apresentaram alta atividade de mieloperoxidase quando comparados com o controle (Figura 16D). Neste caso, os animais tratados com Ac2-26 apresentaram apenas uma tendência em reduzir a atividade enzimática da mieloperoxidase. De maneira interessante, apesar da redução no infiltrado inflamatório, o número de bactérias presentes no lavado broncoalveolar dos animais tratados com Ac2-26 foi reduzido (Figura 16E), indo de encontro aos resultados obtidos nos experimentos com FPR2/3 KO e AnxA1 KO. Além disso, devido ao tempo de eutanásia, nenhum animal apresentou bacteremia (dado não mostrado).

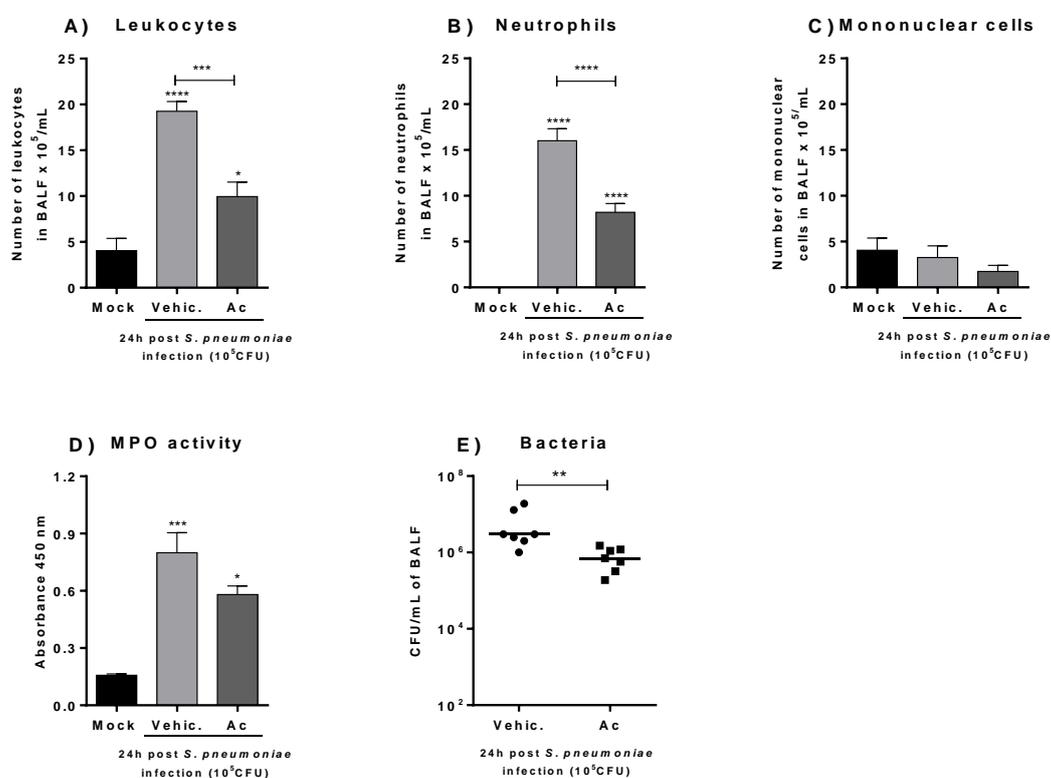


Figura 16: Recrutamento celular e carga bacteriana de animais Balb/C WT infectados com *S. pneumoniae* e tratados ou não com Ac2-26. Contagens de células totais (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) presentes no BALF após 24h de infecção e 12h de tratamento com Ac2-26 6mg/Kg. Medida da atividade de mieloperoxidase no pulmão (D) e número de bactérias presente no BALF (E). Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 7 animais por grupo e foram representados com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado.

#### 4.3.2. Animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução dos níveis de citocinas

Para compreender a redução do infiltrado inflamatório e da carga bacteriana em animais tratados com Ac2-26, os níveis de citocinas produzidas foram avaliados. Os animais tratados com veículo apresentaram altos níveis de TNF- $\alpha$  e CXCL1 quando comparados com os animais controle (mock), enquanto o tratamento com Ac2-26 foi capaz de reduzir os níveis tanto de TNF- $\alpha$  (Figura 17A) quanto de CXCL1 (Figura 17B). Do mesmo modo, os animais infectados e tratados com veículo apresentaram aumento nos níveis de CXCL2, diferente dos animais tratados com Ac2-26, os quais não tiveram aumento dessa quimiocina quando comparados ao controle (Figura 17C). Além disso, os níveis de IL-10 no BALF não se alteraram após a infecção (Figura 17D). De maneira similar, os níveis de IL-6 no soro também não foram alterados após a infecção, apesar de apresentarem uma tendência de elevação nos animais infectados e tratados com veículo (Figura 17E), sendo também coerente com o fato de não haver bacteremia nestes animais. Assim como no BALF, o tratamento com Ac2-26 também foi capaz de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  no soro dos animais infectados (Figura 17F).

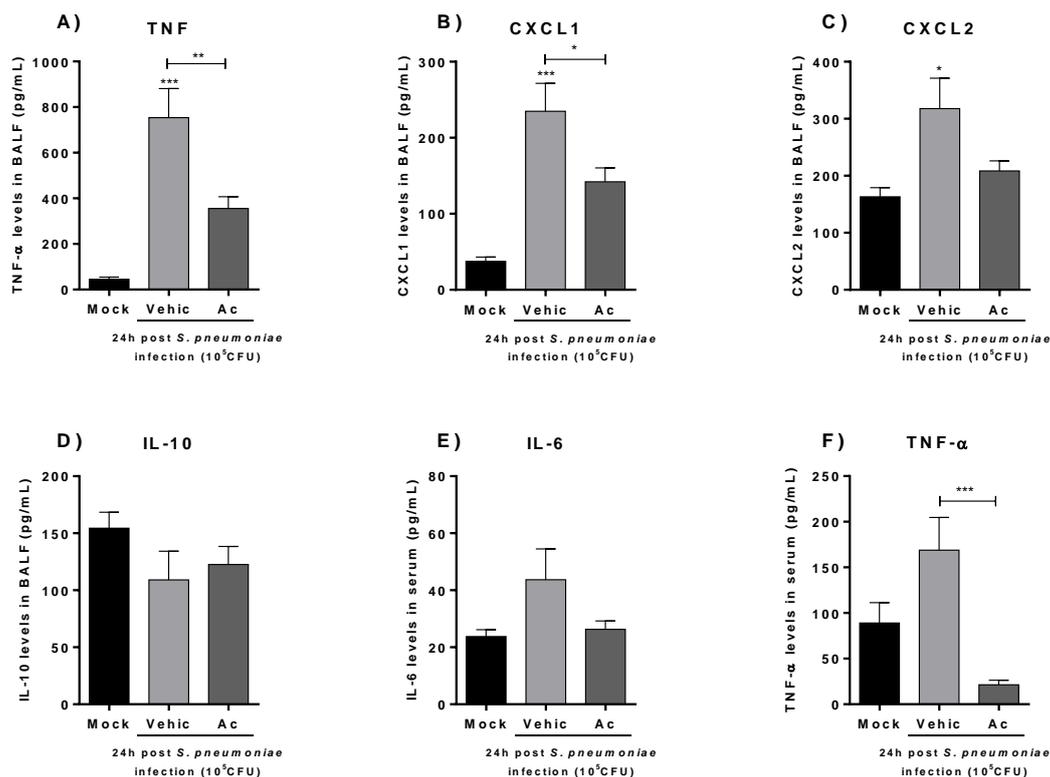


Figura 17: Produção de citocinas por animais Balb/C WT infectados com *S. pneumoniae* e tratados ou não com Ac2-26. Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  (A), CXCL1 (B), CXCL2 (C) e IL-10 (D) presentes no BALF, e IL-6 (E) e TNF- $\alpha$  (F) presentes no soro após 24h de infecção e 12h de tratamento com Ac2-26 6mg/Kg. Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 7 animais por grupo e foram representados com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado.

#### 4.3.3. Animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução do infiltrado inflamatório

Com intuito de avaliar o dano tecidual, proteínas presentes no lavado broncoalveolar foram quantificadas e o escore histológico foi estabelecido de acordo com o infiltrado inflamatório presente nos pulmões dos animais. Animais infectados e tratados com veículo apresentaram aumento na concentração de proteína no BALF. O tratamento com Ac2-26 não modificou esse parâmetro (Figura 18A). Do mesmo modo, ambos os grupos apresentaram aumento do infiltrado inflamatório quando comparados com o grupo controle (Figura 18B e setas nas pranchas representativas). Porém, o recrutamento celular foi reduzido de forma considerável nos animais tratados com Ac2-26 ao compará-

los com os animais tratados com veículo, como demonstrado nos cortes histológicos abaixo (Figura 18B).

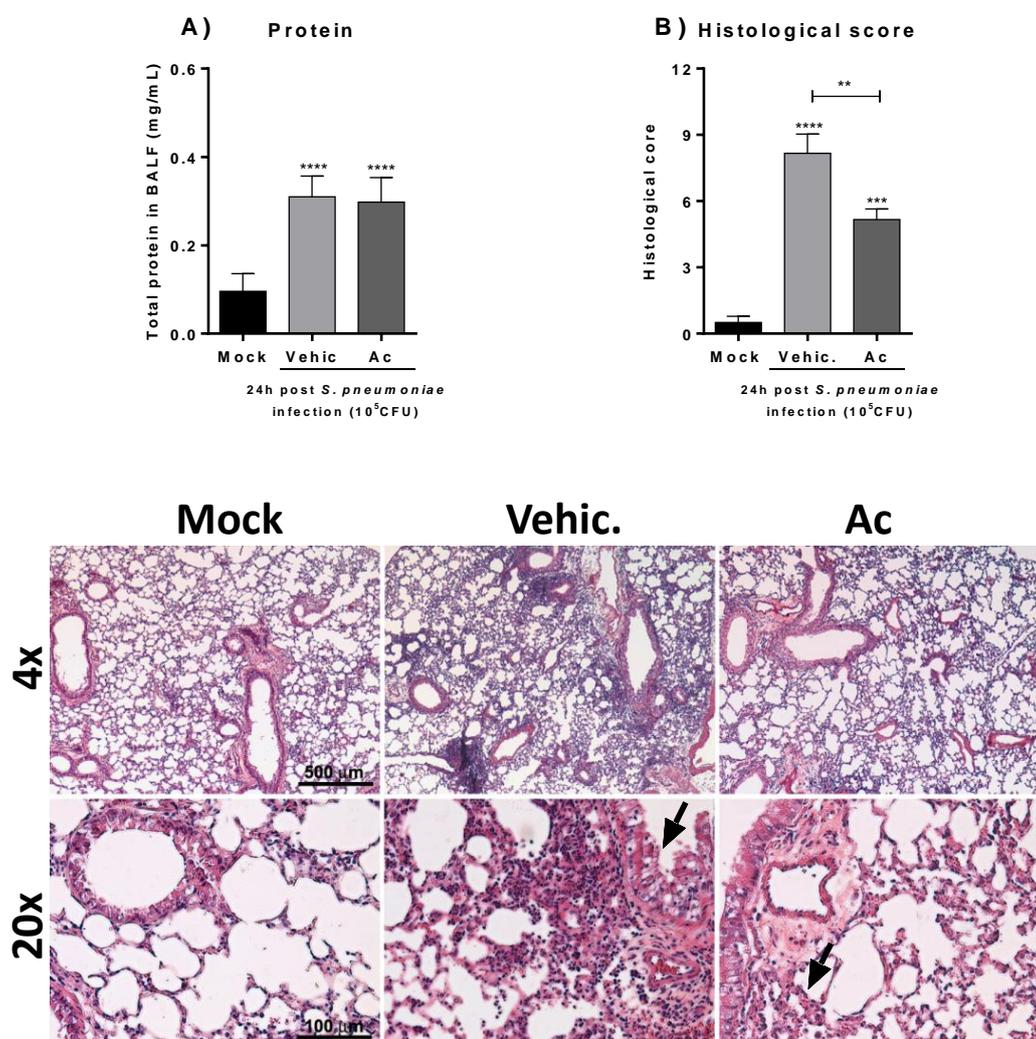


Figura 18: Quantificação de proteínas totais e análise do escore histológico do pulmão de animais Balb/C WT após 24h de infecção com *S. pneumoniae* e 12h de tratamento com Ac2-26 6mg/Kg. Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 7 animais por grupo e foram representados com \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados com o grupo controle (Mock) ou com o grupo indicado. Imagens representativas do escore histológico com setas indicando infiltrado inflamatório.

#### 4.4. Animais tratados com Ac2-26 e antibiótico apresentaram proteção à pneumonia pneumocócica grave

Visando avaliar a eficácia do tratamento na letalidade que se segue a infecção pelo pneumococo, animais foram infectados com um inóculo letal de *S. pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  CFU), tratados com Ac2-26 12, 24, 36, 48 e 60h após a

infecção, e/ou com antibiótico 60 e 72h após a infecção e acompanhados por 10 dias. Apesar dos animais tratados com Ac2-26 terem apresentado um atraso na mortalidade, não houve diferença na sobrevivência ao se comparar com o veículo. Por outro lado, tanto o tratamento com antibiótico sozinho, quanto com o antibiótico associado ao Ac2-26 resultaram na proteção dos animais. Sendo que os animais tratados com antibiótico associado ao A2-26 foram os que apresentaram maior proteção à infecção grave por *S. pneumoniae*.

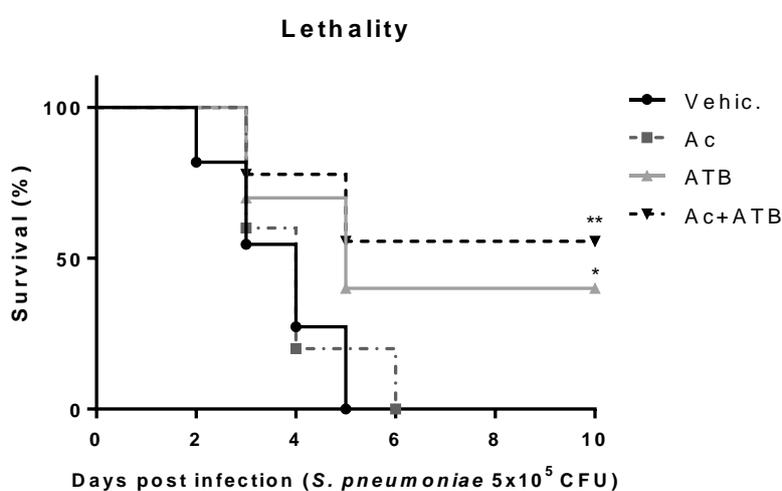


Figura 19: Letalidade de animais Balb/C WT infectados com *S. pneumoniae* e tratados ou não com Ac2-26 e/ou antibiótico. Animais foram tratados 12, 24, 36, 48 e 60h após infecção com 6mg/Kg de Ac2-26 e tratados ou não com o antibiótico ceftriaxona 10mg/Kg após 60 e 72h de infecção. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência de 8 ou mais animais por grupo e a diferença foi representada com \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparados com o grupo veículo (vehic).

## 5. DISCUSSÃO

As infecções do trato respiratório inferior foram apontadas como a terceira principal causa de morte no mundo em 2015 (“WHO | The top 10 causes of death”, 2017). Dentre as infecções fatais do trato respiratório inferior, a pneumonia é a principal, sendo responsável por 16% das mortes de crianças menores que 5 anos (“WHO | Causes of child mortality”, 2017). As pneumonias podem ser causadas por fungos, bactérias e vírus, sendo as bactérias os agentes mais comuns. A bactéria *Streptococcus pneumoniae* é o principal agente responsável pela pneumonia adquirida na comunidade, sendo responsável por 36% dos casos em adultos e 30-50% dos casos em crianças (“CDC | Pinkbook | Pneumococcal”, 2015; RUDAN *et al.*, 2008). Devido ao fato de *S. pneumoniae* apresentar mais de 95 sorotipos e de existirem vacinas que abrangem no máximo 23 sorotipos, tal bactéria continua contribuindo para os altos índices de infecção.

A pneumonia pneumocócica é geralmente uma infecção pulmonar aguda caracterizada por um intenso infiltrado neutrofílico (DOCKRELL; WHYTE; MITCHELL, 2012). Esta resposta inflamatória inicial, composta principalmente de neutrófilos, pode ser auto resolutiva, resultando na eliminação do patógeno e no restabelecimento da homeostase. Porém em casos de pneumonia pneumocócica grave, em que é necessária a hospitalização do paciente, o intenso infiltrado neutrofílico passa a ser prejudicial para o organismo. Quando a migração de neutrófilos ocorre de forma exacerbada, as substâncias liberadas por estas células passam a danificar o tecido e não necessariamente contribuem para um aumento da capacidade de combater o patógeno (STEEL *et al.*, 2013). Sendo assim, em muitos casos somente a eliminação bacteriana através do uso de antibióticos não é suficiente, visto que o tecido pulmonar está sendo danificado pelas células recrutadas, facilitando assim a disseminação bacteriana e a falência pulmonar.

Considerando que a resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *S. pneumoniae* já está bem descrita e que terapias anti-inflamatórias apresentam muitos efeitos colaterais, o estudo de moléculas pró-resolutivas endógenas, como a anexina A1, tem chamado atenção por oferecer uma oportunidade terapêutica diferente das que conhecemos atualmente

(PERRETTI, MAURO *et al.*, 2015). Assim, a utilização de moléculas pro-resolutivas constitui-se em uma estratégia para promover a resolução do processo inflamatório que se baseia na capacidade de agonismo de moléculas endógenas em vez de inibição de mediadores inflamatórios - estratégia anti-inflamatória.

A anexina A1 é capaz de modular a resposta inflamatória por meio da inibição da produção de mediadores pro-inflamatórias e moléculas de adesão, promoção da resolução da inflamação ao estimular a apoptose de neutrófilos, a migração de monócitos, o processo de eferocitose, a fagocitose de partículas e finalmente, promover reparo tecidual (LEONI *et al.*, 2015; PATEL, D. M. *et al.*, 2011; SUGIMOTO, MICHELLE AMANTÉA *et al.*, 2016). Assim como a proteína AnxA1, o peptídeo Ac2-26 também tem capacidade de exercer tais funções pró-resolutivas e ambos agem principalmente ao se ligarem ao receptor FPR2 (COORAY *et al.*, 2013).

Sendo assim, o estudo aqui apresentado analisou a participação tanto da AnxA1 quanto de seu receptor FPR2 no modelo de pneumonia pneumocócica moderada. Além disso, foi também avaliado o efeito do tratamento com Ac2-26 no modelo de pneumonia pneumocócica grave.

O estudo da anexina A1, proteína pró-resolutiva endógena, no modelo de pneumonia pneumocócica moderada apresentou resultados condizentes com aqueles oriundos da literatura referente a infecções bacterianas (TAVARES *et al.*, 2015; TZELEPIS *et al.*, 2015; VANESSA *et al.*, 2015). Indicando que neste modelo a AnxA1 também foi capaz de modular a resposta inflamatória. Foi observado que os animais deficientes para AnxA1 são mais susceptíveis à pneumonia pneumocócica moderada, apresentando 10% de sobrevivência *versus* 70% de sobrevivência dos animais selvagens para o gene da Anxa1. Este resultado vai de acordo com o encontrado para tuberculose, no qual animais deficientes para AnxA1 também apresentaram maior susceptibilidade (TZELEPIS *et al.*, 2015). Apesar dos animais AnxA1 KO terem apresentado menor sobrevivência, não houve diferença no tempo inicial de letalidade, isso pode nos indicar que esta proteína seja mais importante em tempos mais tardios da infecção. A fim de compreender esta maior susceptibilidade dos animais deficientes para AnxA1, alguns parâmetros

inflamatórios foram analisados. Ao avaliar o infiltrado leucocitário no espaço alveolar, os animais AnxA1 KO apresentaram maior número de leucócitos e neutrófilos 24h e 72h após a infecção, indicando que a AnxA1 é importante para o controle do recrutamento celular não só após 72h de infecção, como também em tempos iniciais. Além disso, os animais AnxA1 KO apresentaram infiltrado neutrofílico característico de animais com pneumonia pneumocócica grave (TAVARES *et al.*, 2015). Este aumento na migração de neutrófilos em animais AnxA1 KO frente a algum estímulo inflamatório/infeccioso já foi descrito na literatura (CHATTERJEE *et al.*, 2005; GALVÃO *et al.*, 2017). Tais resultados são coerentes, uma vez que a ausência de AnxA1 implica no aumento na inflamação causado pela redução da apoptose de neutrófilos, aumento da produção de quimiocinas e conseqüentemente aumento da migração de neutrófilos, além do atraso na resolução da inflamação pela diminuição de estímulos para eferocitose (MADERNA *et al.*, 2005; SOLITO, E., 2003). Por outro lado, os animais AnxA1 KO também apresentaram maior recrutamento de células mononucleares no tempo de 72h. Tal resultado difere do que já foi descrito na literatura até o momento, uma vez que a AnxA1 é importante para a migração de monócitos e em animais deficientes o número de monócitos recrutados para o local da inflamação é menor (MCARTHUR *et al.*, 2015; SOEHNLEIN *et al.*, 2009). Apesar da contradição entre tal dado e a literatura, a anexina A1 não é a única envolvida no processo de migração de monócitos. Além disso, em modelos inflamatórios infecciosos, como no caso do nosso trabalho, pode ser que o estímulo seja diferente daquele desencadeado por um processo não infeccioso. Sendo assim, é possível que esta migração tenha sido estimulada por outros mediadores ou mesmo componentes bacterianos como tentativa de controlar a inflamação exacerbada e o dano ali causado pelos neutrófilos. A atividade da mieloperoxidase nos pulmões também foi maior nos animais AnxA1 KO, indicando maior número e/ou maior ativação de neutrófilos, sendo este resultado coerente com o perfil de uma resposta neutrofílica à uma infecção grave. Apesar do número maior de células fagocíticas nas vias aéreas inferiores, os animais AnxA1 KO também apresentaram maior número de bactérias com 24 e 48h de infecção. Esse maior número de bactérias mesmo na presença de mais neutrófilos indica que

estas células podem estar menos ativas ou com capacidade reduzida para fagocitar e eliminar bactéria. Esta dificuldade em controlar a proliferação bacteriana na ausência de AnxA1 foi relatada no modelo de tuberculose, porém neste caso a incapacidade de eliminar a bactéria foi atribuída à incapacidade de células dendríticas realizarem apresentação cruzada de macrófagos infectados para linfócitos T CD8<sup>+</sup> (TZELEPIS *et al.*, 2015; VANESSA *et al.*, 2015). Além disso, estudos mais detalhados foram realizados e mostraram que macrófagos de animais AnxA1 KO expressam menos receptores relacionados a fagocitose e tem mais dificuldade em remodelar o citoesqueleto para formar o “corpo fagocítico” (PATEL, D. M. *et al.*, 2011; YONA *et al.*, 2006). Porém não há estudos descrevendo tal função para neutrófilos. Por outro lado, no tempo de 72h houve um declínio no número de bactérias no BALF de animais AnxA1 KO. Este resultado pode ser relacionado à necrose tecidual encontrada e aos indícios de falência pulmonar nestes animais, indicando que o ambiente estava inóspito até mesmo para a proliferação bacteriana. De acordo com o padrão de infecção observado nos animais AnxA1 KO, no qual eles apresentam maior susceptibilidade, foi observada bacteremia em todos os tempos analisados. Por outro lado, a presença de bactérias no sangue foi detectada em apenas alguns animais Balb/C WT com 48h, evoluindo para quase todos os animais no tempo de 72h. Este dado, associado à letalidade observada, nos indica que a disseminação bacteriana, não é o único fator responsável pela susceptibilidade dos animais à infecção, uma vez que animais Balb/C WT apresentaram taxa mortalidade inferior aos animais AnxA1 KO (CILLÓNIZ; TORRES, 2012). Sendo esta susceptibilidade relacionada à exacerbação da resposta inflamatória e ao acometimento funcional dos pulmões, os quais foram observados apenas nos animais AnxA1 KO (BURGOS *et al.*, 2014).

As citocinas dosadas refletem a resposta celular desencadeada pelo reconhecimento bacteriano. Uma vez que *S. pneumoniae* é reconhecido pelos PRRs de células epiteliais e inflamatórias, cascatas de sinalização são ativadas e culminam na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e quimiocinas. Os níveis de TNF- $\alpha$  e CXCL1 no BALF de animais selvagens apresentaram pequeno aumento ao longo da infecção. Estas pequenas alterações nos níveis de TNF- $\alpha$  e CXCL1 refletem no menor infiltrado

neutrofílico observado nestes animais, coerente com a resposta à pneumonia pneumocócica branda ou moderada induzida por baixo inóculo bacteriano (KIRBY; RAYNES; KAYE, 2005). Por outro lado, animais deficientes para AnxA1 apresentaram níveis elevados de todas as citocinas no BALF, reforçando o padrão grave de pneumonia pneumocócica que geralmente é induzida por um inóculo mais alto. Os níveis de TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória altamente expressa na pneumonia pneumocócica grave, aumentaram expressivamente no BALF de animais AnxA1 KO nos tempos de 24h e 48h, reforçando a importância desta proteína para o controle da resposta inflamatória inicial, mas também para o dano tecidual (OLMOS; LLADÓ, 2014; TAKASHIMA *et al.*, 1997; YAMAMOTO *et al.*, 2001; YAMAZAKI; IWASAWA, 2004). Além disso, os níveis de CXCL1 e CXCL2, quimiocinas associadas ao recrutamento de neutrófilos, também aumentaram consideravelmente no BALF dos AnxA1 KO 48 e 72h após a infecção, sendo o pico em 48h precedente ao pico de neutrófilos no BALF. Assim como as demais citocinas dosadas no BALF, os níveis de IL-10 também aumentaram expressivamente nos tempos de 48h e 72h nos animais AnxA1 KO ao serem comparados com os Balb/C WT. Apesar de IL-10 ser uma citocina anti-inflamatória produzida em fases mais tardias da infecção, *S. pneumoniae* é capaz de induzir sua produção e por meio dessa citocina reduzir a resposta inflamatória (NEILL *et al.*, 2012; VAN DER POLL *et al.*, 1996). Porém, não foi observado redução no recrutamento celular nem nos níveis de citocinas após o aumento de IL-10. Entretanto a IL-10 tem capacidade de diminuir os níveis de resposta humoral, ao suprimir a liberação de anticorpos (KHAN *et al.*, 2002). Esta redução de anticorpos causada pelo aumento de IL-10 poderia refletir no aumento da carga bacteriana no BALF de animais deficientes para AnxA1. Uma vez que anticorpos não só geram a lise do patógeno como também aumentam a capacidade fagocítica de neutrófilos, a redução de anticorpos pode estar diretamente relacionada à menor capacidade dos neutrófilos de fagocitar e matar *S. pneumoniae* (FORTHAL, 2014). Os níveis de IL-6 no soro não foram diferentes entre animais AnxA1 KO e Balb/C WT, porém ambos os grupos apresentaram aumento nos níveis desta citocina após 72h de infecção. A elevação de IL-6 no soro é usada como marcador de sepse, coerente com o

fato de ambos grupos apresentarem bacteremia 72h após a infecção (FAIX, 2013).

Devido ao fato dos animais AnxA1 KO apresentarem maior número de neutrófilos no BALF e também maior carga bacteriana, a ativação dos neutrófilos foi avaliada através da capacidade destas células produzirem espécies reativas de oxigênio. Os neutrófilos de animais deficientes para AnxA1 apresentaram maior produção de ROS ao serem estimulados com *S. pneumoniae*. Isto nos permite inferir que estas células estão mais ativadas que as células de animais Balb/C WT. Porém, *S. pneumoniae* tem mecanismos eficazes de evasão à morte por ROS, sendo assim, apesar da alta produção de ROS pelo AnxA1 KO, estas espécies reativas de oxigênio parecem contribuir mais para o dano tecidual (YESILKAYA *et al.*, 2013). Outro método indireto de avaliar alteração pulmonar consiste em dosar a concentração de proteínas no BALF e correlacionar o resultado com o extravasamento de proteínas em decorrência do edema. O nível de proteína total no BALF foi elevado apenas nos animais AnxA1 KO no tempo de 48h, indicando possível extravasamento de proteínas para o espaço alveolar, devido ao edema causado pelo processo inflamatório. Coerente com os resultados obtidos anteriormente, foram encontradas células inflamatórias com um discreto aumento ao longo do tempo de infecção nos pulmões dos animais Balb/C WT. Por outro lado, reforçando os resultados encontrados para os animais AnxA1 KO, o infiltrado inflamatório apresentado por esse grupo de animais foi mais intenso no tempo de 48h. Além disso, apesar de não ter havido diferença no infiltrado inflamatório entre AnxA1 KO e Balb/C WT no tempo de 72h, os animais AnxA1 KO apresentaram várias áreas de necrose tecidual. Uma possível explicação para este dano pulmonar pode ser dada pelo fato dos animais AnxA1 KO terem apresentado maior recrutamento neutrofílico com 72h e dos neutrófilos desses animais produzirem mais ROS contribuindo assim para o dano tecidual. Além disso, este resultado também é suportado pela literatura, com alguns trabalhos que demonstraram que animais deficientes para AnxA1 apresentaram aumento de infiltrado neutrofílico no peritônio após estímulo com carragenina e na cavidade articular após injeção de cristais de ácido úrico, maior dano histopatológico em colite, aumento na deposição de colágeno em modelo de fibrose pulmonar e

aumento de áreas necrosadas após infarto do miocárdio (BABBIN *et al.*, 2008; DAMAZO *et al.*, 2011; GASTARDELO *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2017).

A função pulmonar foi avaliada para estabelecer uma correlação entre a funcionalidade e o comprometimento tecidual causado pela inflamação e necrose nos animais AnxA1 KO. Os animais deficientes para AnxA1 apresentaram maior resistência pulmonar no tempo de 72h, indicando que estes animais estavam com as vias aéreas obstruídas. Essa obstrução é devida ao fato de ser necessária uma maior pressão pulmonar para que os animais expirem o mesmo fluxo de ar. As possíveis causas para este achado são a produção excessiva de muco/exsudato inflamatório congestionando as vias aéreas, ou mesmo a obstrução destas vias pela necrose observada nestes animais. A complacência dinâmica e o volume forçado de ar expirado em 100 ms nos AnxA1 KO reduziram tanto após 24h quanto 72h de infecção, indicando dificuldade em distender o tecido e em esvaziar os pulmões. A complacência mostrou que volume de ar injetado nos animais AnxA1 KO nos tempos de 24 e 72h pelo mesmo intervalo de tempo e pressão foi menor que o volume injetado nos animais Balb/C WT. FEV<sub>100</sub> indicou que o volume de ar expirado forçado nos animais AnxA1 KO foi menor que o volume de ar expirado pelos animais Balb/C WT. Assim como no caso do aumento da resistência, as reduções de complacência e FEV<sub>100</sub> podem ter ocorrido também devido à produção excessiva de muco/exsudato inflamatório, o qual pode ter obstruído os alvéolos e as vias aéreas. Esta hipótese é suportada pela literatura, cujos trabalhos demonstraram que a resposta inflamatória afeta diretamente a função pulmonar de camundongos com pneumonia (WRIGHT *et al.*, 1999). Além disso, animais AnxA1 KO com fibrose pulmonar apresentaram piora da mecânica pulmonar quando comparados aos animais WT (TRENTIN *et al.*, 2015). Portanto, podemos concluir que a ausência da proteína AnxA1, no modelo murino de pneumonia pneumocócica, é responsável pela resposta inflamatória exacerbada e proliferação bacteriana excessiva, o que contribui para o dano pulmonar com insuficiência respiratória e aumento da mortalidade destes animais.

Considerando o papel crucial da anexina A1 na resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *S. pneumoniae*, o estudo da via pela qual esta

proteína age é de extrema importância. Uma vez que a maioria das funções imunomodulatórias descritas até o momento para AnxA1 estão associadas à sua ligação ao receptor FPR2, o estudo de tal receptor se faz importante (DUFTON *et al.*, 2010; GAVINS *et al.*, 2012; HUGHES *et al.*, 2017).

A fim de estabelecer o perfil da resposta inflamatória frente à infecção pelo pneumococo nos animais deficientes para FPR2 e assim correlacionar a ausência de receptor FPR2 com a ausência de função da AnxA1, foram realizados experimentos com animais FPR2/3 KO semelhantes àqueles experimentos envolvendo os AnxA1 KO. Os animais deficientes para FPR2/3 foram mais susceptíveis à infecção por *S. pneumoniae* que os animais C57Bl/6 WT. Foi observado que animais FPR2/3 KO apresentaram início da letalidade no terceiro dia após a infecção, e no sétimo dia, todos os animais haviam morrido (100% de letalidade). Por outro lado, os animais C57Bl/6 WT apresentaram mortalidade de apenas 40% e morreram somente no 4º dia após a infecção. Apesar do início da letalidade nos animais FPR2/3 KO ter sido adiantada em comparação aos animais C57Bl/6 WT, não houve diferença estatística ao comparar apenas o início da letalidade destes animais. Para tentar entender o porquê da susceptibilidade aumentada dos animais FPR2/3 KO à pneumonia pneumocócica, foram avaliados parâmetros inflamatórios e funcionais ao longo da infecção. Animais C57Bl/6 WT apresentaram um pequeno aumento no infiltrado leucocitário ao longo da infecção. Por outro lado, os animais deficientes para FPR2/3 apresentaram um aumento expressivo de leucócitos e neutrófilos após 48 e 72h de infecção. Este infiltrado inflamatório exacerbado é comparável ao encontrado em infecções pneumocócicas graves, a qual acarreta em 100% de letalidade. De forma semelhante, a atividade de mieloperoxidase aumentou nos animais deficientes para FPR2/3 no tempo de 48h, indicando uma maior atividade/recrutamento neutrofílico para o pulmão. Estes resultados vão de encontro ao observado no modelo de inflamação cerebral, no qual animais deficientes para FPR2/3 apresentaram maior recrutamento leucocitário e maior atividade de mieloperoxidase no cérebro (VITAL *et al.*, 2016). Contrário ao maior número de células fagocíticas, os animais FPR2/3KO apresentaram maior proliferação bacteriana no lavado broncoalveolar, quando comparados aos animais C57Bl/6

WT. Este dado nos sugere que os neutrófilos destes animais podem apresentar um comprometimento na capacidade de fagocitar e/ou eliminar o pneumococo. De fato, já foi demonstrado que neutrófilos de animais FPR2/3 KO exibem capacidade reduzida tanto para fagocitar quanto para eliminar *E. coli* (GOBBETTI *et al.*, 2014). De maneira coerente, os animais FPR2/3 KO apresentaram bacteremia tanto 48h quanto 72h após a infecção, diferente do grupo WT que não apresentou bacteremia em nenhum dos tempos pós infecção. Estudos semelhantes ao deste último trabalho citado estão sendo conduzidos para que possamos avaliar a fagocitose e *killing* bacteriano em animais WT e FPR2/3 e AnxA1 KO no contexto da infecção pelo *S. pneumoniae*.

Para tentar compreender o recrutamento celular para os pulmões, a eliminação bacteriana e a bacteremia encontrada nos animais deficientes, algumas citocinas foram quantificadas no BALF e no soro. Os níveis de TNF- $\alpha$  e CXCL1 no BALF e IL-6 no soro de animais C57Bl/6 apresentaram um leve aumento após a infecção com *S. pneumoniae*. Este elevação dos níveis de citocinas comparado à suas produções basais é coerente com o infiltrado inflamatório observado após a infecção destes animais. Sendo assim, estes parâmetros em conjunto com a letalidade, caracterizam esta infecção como moderada. Por outro lado, em animais FPR2/3 KO os níveis de TNF- $\alpha$ , CXCL1 e CXCL2 aumentaram expressivamente ao longo tempo de infecção apresentando um pico no tempo de 72h. Os níveis elevados de TNF- $\alpha$  no BALF são coerentes com a resposta inflamatória intensa observada nestes animais. Do mesmo modo, os altos níveis de CXCL1 e CXCL2 no BALF se correlacionam com o grande número de neutrófilos encontrados no BALF. Além disso, estudos demonstraram que em modelos distintos (dano hepático induzido por LPS e inflamação sistêmica induzida por LPS) animais deficientes para FPR2/3 também expressaram maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias (GIEBELER *et al.*, 2014; WANG, C.-S. *et al.*, 2016). Do mesmo modo, foi observado também no tempo de 72h, que animais FPR2/3 KO apresentaram um aumento expressivo de IL-10 no BALF, citocina responsável por restringir a resposta humoral e a eliminação bacteriana. Sendo assim, a maior quantidade de bactérias em FPR2/3 KO pode ser devida não só à redução da atividade neutrofílica, como também aos altos níveis de IL-10

(KHAN *et al.*, 2002). O alto nível de IL-6 em animais FPR2/3 KO no tempo de 72h vai de encontro ao fato de que neste tempo a maioria dos animais deficientes apresentam bacteremia.

Objetivando compreender o impacto no tecido pulmonar da maior inflamação e proliferação bacteriana nos animais deficientes para FPR2/3, foram dosadas proteínas e analisados cortes histológicos. Assim como observado para algumas citocinas, também não houve alteração significativa na quantidade de proteínas no BALF de animais C57Bl/6 WT. Este resultado é coerente com o baixo inóculo utilizado e com a menor letalidade da pneumonia pneumocócica moderada. Por outro lado, os animais FPR2/3 KO apresentaram aumento da quantidade de proteína ao longo do tempo, com aumentos expressivos em 48h e 72h. Como discutido anteriormente, este resultado pode ser correlacionado com a presença de edema, inferindo que estas proteínas extravasaram para o espaço alveolar. Além disso, o infiltrado inflamatório foi avaliado e pontuado de acordo com sua intensidade. Animais C57Bl/6 WT apresentaram pequeno aumento no infiltrado inflamatório pulmonar após a infecção. Por outro lado, em animais FPR2/3 KO o infiltrado aumentou com 48h e 72h de infecção, sendo maior que dos animais C57Bl/6 no tempo de 72h. Além disso, foi observado que 72h após a infecção, os pulmões de animais FPR2/3 KO exibiram pequenas áreas de necrose. Estes resultados da histologia pulmonar vão de encontro ao perfil de resposta observado, que indica uma infecção moderada em animais C57Bl/6 WT e uma infecção grave e 100% letal em animais deficientes para FPR2/3.

A mecânica pulmonar foi avaliada para verificar o impacto das alterações histológicas na função tecidual. Animais C57Bl/6 WT não apresentaram alteração em nenhum dos parâmetros avaliados, indo de encontro aos demais resultados, indicando ausência de comprometimento pulmonar após a infecção. Por outro lado, em animais FPR2/3 KO a resistência pulmonar aumentou tanto em 24h quanto em 72h, sendo no tempo de 72h o aumento mais expressivo. Indicando que estes animais possuem obstrução das vias aéreas, por precisarem exercer uma maior pressão para expirarem o mesmo fluxo de ar. Esta obstrução, como descrito anteriormente, pode ter sido causada pela presença de muco/exsudato neutrofílico nas vias aéreas. De maneira similar,

animais deficientes para FPR2/3 apresentaram uma redução expressiva na complacência e no volume forçado de ar expirado no tempo de 72h. De acordo com a histologia, podemos observar que não há comprometimento na parede dos alvéolos, indicando que a perda de complacência na verdade é devida a obstrução alveolar. Essa obstrução alveolar provavelmente foi causada pelo infiltrado inflamatório exacerbado ou pela produção excessiva de muco. FEV<sub>100</sub> é complementar a resistência, indicando também obstrução das vias aéreas, uma vez que o volume forçado expirado em 100 ms é menor nos animais deficientes que nos selvagens. Ainda não existe dados na literatura sobre infecção pulmonar bacteriana em animais FRR2/3 KO. No entanto, em um modelo de sepse, foi observado que animais deficientes para FPR2/3 não só apresentaram maior infiltrado neutrofílico no peritônio, como também uma disfunção cardíaca maior que a observada nos animais WT (GOBBETTI *et al.*, 2014).

Após estabelecido o papel da AnxA1 e de seu receptor FPR2 na resposta inflamatória desencadeada por *S. pneumoniae*, a associação dos resultados encontrados nos permite inferir a participação de FPR2 no papel exercido pela AnxA1. Tendo em vista que ambos os genótipos dos animais deficientes possuem *background* diferente (BALB/c vs C57BL/6), é importante ressaltar que esta comparação deve ser feita entre os animais de mesmo *background* e só então as diferenças podem ser confrontadas. Sendo assim, não é possível comparar valores absolutos encontrados em cada experimento nem o tempo de resposta destes animais, como por exemplo, comparar os picos de leucócitos em animais AnxA1 KO com os encontrados em FPR2/3 KO. Mesmo com este viés do *background* ser diferente, é possível comparar os resultados de maneira geral, levando em conta os animais selvagens de cada grupo. Observamos que ambos os animais deficientes apresentaram maior susceptibilidade à infecção e em ambos os casos a resposta inflamatória desencadeada foi semelhante à observada em pneumonia pneumocócica grave (TAVARES *et al.*, 2015). Sendo esta resposta marcada por intenso infiltrado neutrofílico e altos níveis de citocinas no BALF. Além disso, a proliferação e disseminação bacteriana também foram maiores nestes animais, indicando que tanto a proteína AnxA1 quanto o receptor FPR2/3 são

importantes para a capacidade dos neutrófilos de fagocitar e matar bactérias. Seguindo os resultados apresentados, o dano tecidual e a piora na função pulmonar nestes animais também foram semelhantes. Sendo assim, podemos inferir que o papel da AnxA1 no processo inflamatório observado é dependente do receptor FPR2.

Por outro lado, mesmo em face de não podermos comparar os efeitos, devido aos *backgrounds* diferentes dos dois genótipos, uma provável explicação para o fenótipo inflamatório ainda mais exacerbado dos animais deficientes em FPR2/3, quando comparados ao Anxa1 KO, pode ser devido ao fato de que outros mediadores pro-resolutivos, como Lipoxina A4 (LXA4) e resolvina D1 (RvD1) utilizam o receptor FPR2 para a sua sinalização (revisto por PERUCCI *et al.*, 2017). De fato, assim como a anexina A1, a resolvina D1 ativada pela aspirina (AT-RvD1) parece ter um importante papel no controle da inflamação desencadeada pela infecção por *S. pneumoniae* e Influenza (WANG, H. *et al.*, 2017). Assim, FPR2 converge sinais de múltiplos agonistas de resolução e sua deficiência poderia ter um impacto mais profundo frente a um estímulo inflamatório que a deficiência em AnxA1 isoladamente.

De posse dos resultados obtidos até então, concluímos que a anexina A1 não só modula a inflamação, como também influencia a eliminação bacteriana via FPR2. Sendo assim, a avaliação do efeito terapêutico de um peptídeo mimético de AnxA1 agonista de FPR2 passou a ser um interessante alvo de estudo no modelo de pneumonia pneumocócica grave. O Ac2-26, peptídeo sintético da porção N-terminal de AnxA1 e agonista de FPR2, foi utilizado para tratar animais com pneumonia pneumocócica grave (inóculo de  $10^5$  UFC), afim de avaliar se esse peptídeo seria capaz de induzir uma melhora nos animais infectados. Os animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução do infiltrado leucocitário e neutrofílico, quando comparados aos animais tratados com veículo. Este resultado corrobora com dados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em modelos inflamatórios não infecciosos, no qual o tratamento com Ac2-26 reduziu o infiltrado inflamatório em animais com pleurisia, no modelo de gota e no modelo de isquemia/reperfusão intestinal (GALVÃO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2007; VAGO *et al.*, 2012). Por outro lado, apesar de apresentar uma tendência, a atividade da mieloperoxidase não foi

reduzida após o tratamento com Ac2-26. De modo intrigante, mesmo com a redução expressiva no número de neutrófilos, os animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução na carga bacteriana no BALF quando comparados ao veículo. Isto nos sugeriu que o Ac2-26 poderia ser capaz de eliminar a bactéria por si só, ou de melhorar a função de fagocitose e eliminação de bactérias. Com intuito de avaliar o efeito direto do Ac2-26 em *S. pneumoniae*, foi realizado um ensaio *in vitro* de avaliação da susceptibilidade do pneumococo após incubação com Ac2-26. Não foi observada diferença entre o crescimento de bactérias incubadas com Ac2-26 daquelas incubadas apenas com meio de cultura, indicando que o efeito do Ac2-26 em reduzir a carga bacteriana foi independente de um possível efeito bactericida/bacteriostático, mas possivelmente dependente de uma resposta celular ou humoral. De fato, recentemente foi demonstrado que um peptídeo de AnxA1 resistente a clivagem, CR-AnxA1<sub>2-50</sub>, aumentou a capacidade fagocítica de neutrófilos *in vitro*, o que pode também estar acontecendo em nosso estudo (GOBBETTI *et al.*, 2014).

Os níveis de citocinas do BALF e do soro se correlacionam com o infiltrado inflamatório observado tanto nos animais tratados com Ac2-26 quanto nos animais veículo. Foi observado que animais tratados com veículo apresentaram níveis elevados de TNF- $\alpha$ , CXCL1 e CXCL2 no BALF. Resultado coerente com o modelo de pneumonia pneumocócica grave, no qual os animais apresentam intenso infiltrado leucocitário e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento com Ac2-26 foi capaz de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$ , condizente com a redução no número de neutrófilos, o qual é responsável pela produção desta citocina. Além disso, os níveis de CXCL1 também foram reduzidos, refletindo no menor recrutamento neutrofílico para o espaço alveolar. Esta redução nos níveis de TNF- $\alpha$  e CXCL1 também foi observada em animais tratados com Ac2-26 em um modelo de fibrose pulmonar (TRENTIN *et al.*, 2015). Apesar da redução nos níveis de CXCL2 não ter sido significativa, os níveis desta quimiocinas em animais tratados com Ac2-26 se assemelham aos níveis de CXCL2 em animais não infectados. Por outro lado, os níveis de IL-10 se mantiveram baixos mesmo após a infecção, tanto em animais tratados com Ac2-26 quanto nos veículos. Este resultado é

extremamente importante, uma vez que baixos níveis de IL-10 não afetam a liberação de anticorpos. Os níveis de IL-6 no soro de animais veículo apresentaram uma tendência a se elevar, devido à gravidade da infecção, e nos animais tratados com Ac2-26 os níveis permaneceram iguais aos dos animais não infectados. O fato de não ter sido observado aumento significativo nos níveis de IL-6 se correlaciona com o fato destes animais não apresentarem bacteremia após 24h de infecção. Por outro lado, os níveis de TNF- $\alpha$  no soro dos animais tratados com Ac2-26 reduziram drasticamente, indicando que o tratamento reduz não só a inflamação local, como também a inflamação sistêmica.

Para avaliar as alterações teciduais, foi dosada a concentração de proteína no lavado broncoalveolar e cortes histológicos dos pulmões foram analisados. Tanto animais tratados com veículo, como animais tratados com Ac2-26 apresentaram alta concentração de proteína no BALF, indicando que em ambos os grupos foi observado um extravasamento de proteínas. Este resultado difere dos demais resultados apresentados, visto que neste caso o Ac2-26 não foi capaz de reduzir o edema. Foi demonstrado que o tratamento com Ac2-26 foi capaz de reduzir o edema pulmonar no modelo de isquemia e reperfusão pulmonar em camundongos. Porém neste modelo, o tratamento foi realizado antes da cirurgia e os animais foram eutanasiados 3h depois (LIAO *et al.*, 2017). Sendo assim, a não alteração na concentração de proteína no BALF de animais tratados com Ac2-26 pode ser devido ao longo tempo entre o tratamento e a eutanásia dos animais. Por outro lado, o tratamento com Ac2-26 foi muito eficaz em reduzir o infiltrado inflamatório pulmonar representado pelo escore histológico. Assim como na pneumonia pneumocócica, o tratamento com Ac2-26 em animais com inflamação ocular também reduziu o infiltrado inflamatório tecidual (GIROL *et al.*, 2013).

Atualmente é preconizado que o tratamento inicial de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade seja realizado com amoxicilina oral. Porém em casos de pneumonia grave, resistência bacteriana ou paciente debilitado, é recomendado o uso de ceftriaxona sozinha ou associada à algum macrolídeo. Além disso, em casos de pneumonia pneumocócica grave, nos quais o tratamento e a reposição volêmica não apresentam resultados, tem

sido recomendada a utilização de corticosteroides (CORRÊA; LUNDGREN; SILVA, 2009). Porém os resultados dos estudos do uso de corticosteroides nestes casos têm sido contraditórios (GARCIA-VIDAL *et al.*, 2007; MARIK *et al.*, 1993; SPRUNG *et al.*, 2008). Considerando que o tratamento proposto neste trabalho envolve um peptídeo mimético de uma proteína endógena, é esperado que seus efeitos colaterais sejam reduzidos ou até inexistentes. Além disso, os efeitos aqui apresentados tanto na redução da inflamação quanto da carga bacteriana foram melhores que os efeitos gerados por tratamentos com corticosteroides (NIE *et al.*, 2012).

Desta forma, para avaliar o impacto da associação de um antibiótico com Ac2-26, animais foram infectados com inóculo letal de *S. pneumoniae*. O tratamento com antibiótico foi realizado após 60h e 72h de infecção, período no qual os animais já estão debilitados, no intuito de mimetizar o que acontece na clínica com pacientes apresentando infecção grave. O tratamento com Ac2-26 foi mantido de 12 em 12h até o início da antibiótico-terapia. Assim como descrito pela literatura, o antibiótico não foi capaz de proteger 100% dos animais. O tratamento com antibiótico protegeu apenas 40% dos animais enquanto a associação deste tratamento ao Ac2-26 protegeu aproximadamente 60% dos animais. Sendo assim, a associação do Ac2-26 ao antibiótico apresentou uma tendência à maior proteção. Por outro lado, foi observado que o tratamento isolado com Ac2-26 não apresentou melhora na sobrevivência dos animais com pneumonia pneumocócica grave. Este resultado não foi coerente com a redução observada nos parâmetros inflamatórios e na carga bacteriana. Como o Ac2-26 é um peptídeo sintetizado para fins de pesquisa, não existe um estudo da sua farmacocinética e farmacodinâmica. Sendo assim, não sabemos qual sua estabilidade e biodisponibilidade no organismo. Portanto, para estabelecer o esquema de tratamento dos animais para a letalidade, levamos em consideração os experimentos de inflamação realizados, mantendo o tratamento de 12 em 12h. Sendo assim, a possível explicação para esta incoerência é que o tratamento realizado de 12 em 12 horas pode ter causado uma imunossupressão nos animais ao invés de apenas modular a inflamação. Neste caso, a imunossupressão pode ter contribuído

para o aumento da proliferação bacteriana nestes animais, abolindo o efeito protetor observado inicialmente.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que a anexina A1 e seu receptor FPR2 têm um papel crucial na regulação da resposta inflamatória, no controle da carga bacteriana e, por conseguinte no dano pulmonar desencadeado pela infecção com *S. pneumoniae*. O tratamento realizado com o peptidomimético da AnxA1, Ac2-26, foi capaz de melhorar o quadro geral de pneumonia pneumocócica grave uma vez que houve redução da resposta inflamatória e da carga bacteriana (Figura 20). Entretanto esta melhora no quadro geral da doença não foi suficiente para reduzir os índices de mortalidade dos animais.

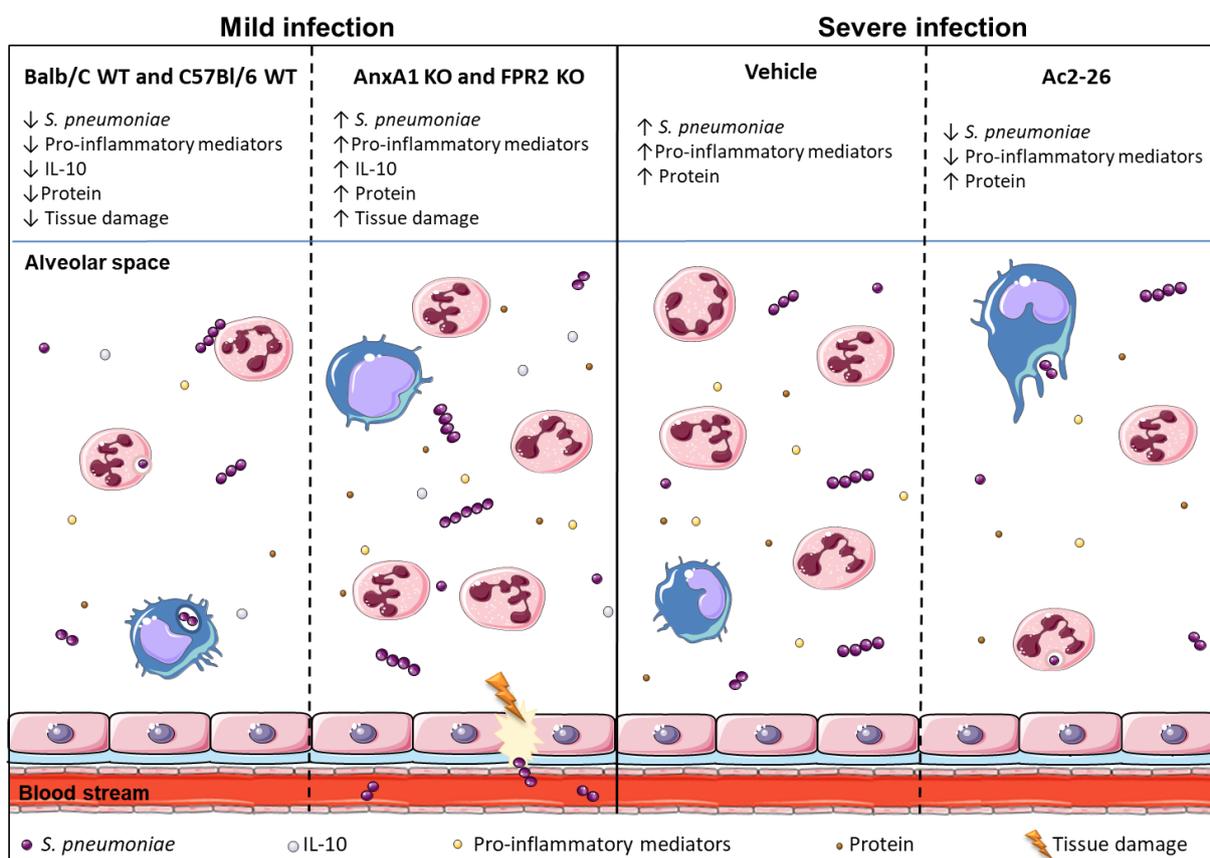


Figura 20: Papel da proteína anexina A1, de seu receptor FPR2 e efeito do tratamento com Ac2-26 na resposta inflamatória em um modelo murino de pneumonia pneumocócica. Animais deficientes em AnxA1 e em FPR2 apresentaram maior recrutamento neutrofílico e maior proliferação e disseminação bacteriana. Além disso, apresentaram também maiores níveis de IL-10 e de mediadores pró-inflamatórios. Como resultado, foi observado nestes animais maior extravasamento de proteínas para o espaço alveolar e maior dano tecidual. Animais tratados com Ac2-26 apresentaram redução do infiltrado neutrofílico, da proliferação bacteriana e de mediadores pró-inflamatórios, sem haver alteração no extravasamento de proteínas para o espaço alveolar.

## 7. PERSPECTIVAS

Embora o aumento da carga bacteriana em animais deficientes para anexina A1 tenha sido corroborada por outros estudos, ainda não existem justificativas bem estabelecidas para este dado. Visto que os animais deficientes em AnxA1 apresentaram maior carga bacteriana, já era esperado que o tratamento com Ac2-26 reduzisse o número de bactérias. Sendo assim, sugerimos que ambos os casos refletem o mesmo mecanismo, seja ele de alteração da função fagocítica do neutrófilo, ou da sua capacidade de eliminar a bactéria. Contudo, mais estudos são necessários para descrever tal mecanismo, como por exemplo, a avaliação da fagocitose do penumococo e do *killing* bacteriano em neutrófilos de WT (tratado ou não com A2-26) e AnxA1 KO. Além disso, a dosagem dos níveis de anticorpos (IgG não específico) presentes em animais AnxA1 KO e Balb/C WT também contribuiriam para este entendimento.

Associada a maior proliferação bacteriana observada nos animais deficientes em AnxA1 e FPR2, observamos também uma maior disseminação bacteriana, porém, não há descrito na literatura o papel de AnxA1 e FPR2 na manutenção das barreiras pulmonares. Sendo assim pretendemos avaliar também a integridade de junções epiteliais visando identificar alguma alteração que tenha facilitado a translocação bacteriana.

Além disso, como o efeito do tratamento com Ac2-26 na letalidade não apresentou proteção como aqueles resultados observados nos parâmetros inflamatórios e na carga bacteriana, estudos adicionais modificando a estratégia de tratamento com o Ac2-26 devem ser realizados.

Experimentos de administração de AnxA1, bem como de LXA4 e RvD1 nos animais FPR2/3 KO seriam interessantes para avaliarmos se esses animais seriam refratários aos tratamentos, bem como analisar se haveria proteção ao dano pulmonar e letalidade nos animais C57BL/6 WT.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. [S.l: s.n.], 2015.

ALBIGER, B. *et al.* Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cellular Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 633–644, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17004992>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

ALESSANDRI, A. L. *et al.* Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 139, n. 2, p. 189–212, ago. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725813000855>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

ANDRADE, A. L. *et al.* Direct and indirect impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction on pneumonia hospitalizations and economic burden in all age-groups in Brazil: A time-series analysis. *PLOS ONE*, v. 12, n. 9, p. e0184204, 7 set. 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0184204>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

ARORA, S. *et al.* Influenza A virus enhances its propagation through the modulation of Annexin-A1 dependent endosomal trafficking and apoptosis. *Cell death and differentiation*, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2016.19> VN - readcube.com>.

BABBIN, B. A. *et al.* Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 181, n. 7, p. 5035–44, 1 out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802107>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *TL - 16. Nature reviews. Immunology*, v. 16 VN-r, n. 1, p. 51–67, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2015.4>>.

BELVEDERE, R. *et al.* Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. *BMC cancer*, v. 14, p. 961, 16 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25510623>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BRANDILEONE, M.-C. C. Increase in numbers of -lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 567–574, 1 maio 2006. Disponível em: <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46387-0>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

BROWN, J.; HAMMERSCHMIDT, S.; ORIHUELA, C. *Streptococcus pneumoniae : molecular mechanisms of host-pathogen interactions*. [S.l: s.n.], 2015.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman e Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11<sup>a</sup> ed. [S.l.]: Mcgraw-Hill - Brasil, 2010. Disponível em: <<http://www.sbs.com.br/sp/goodman-e-gilman-as-bases-farmacologicas-da-terapeutica-11-edicao.html>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

BURGOS, J. *et al.* Risk factors for respiratory failure in pneumococcal pneumonia: the importance of pneumococcal serotypes. *European Respiratory Journal*, v. 43, n. 2, p. 545–553, 1 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845720>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

CALBO, E.; GARAU, J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 2, p. 107–113, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005681>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

CAMBERLEIN, E. *et al.* Importance of Bacterial Replication and Alveolar Macrophage-Independent Clearance Mechanisms during Early Lung Infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 3, p. 1181–1189, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25583525>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

CDC | Pinkbook | Pneumococcal. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

CHATTERJEE, B. E. *et al.* Annexin 1-deficient neutrophils exhibit enhanced transmigration in vivo and increased responsiveness in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 78, n. 3, p. 639–646, set. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0405206>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

CILLÓNIZ, C.; TORRES, A. Entendimento da mortalidade em pneumonia pneumocócica bacterêmica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 38, n. 4, p. 419–421, ago. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-37132012000400002&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132012000400002&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 17 jan. 2018.

Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal. v. 3, 2016.

COORAY, S. N. *et al.* Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 45, p. 18232–7, 5 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108355>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

CORRÊA, R.; LUNDGREN, F.; SILVA, J. Diretrizes brasileiras para pneumonia adquirida na comunidade em adultos imunocompetentes - 2009. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, n. 6, p. 574–601, 2009. Disponível em: <[http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe\\_artigo.asp?id=1143](http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe_artigo.asp?id=1143)>. Acesso em: 18 jan. 2018.

CRAIG, A. *et al.* Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infection and immunity*, v. 77, n. 2, p. 568–75, 1 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015252>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

CROUCHER, N. J. *et al.* Selective and Genetic Constraints on Pneumococcal Serotype Switching. *PLOS Genetics*, v. 11, n. 3, p. e1005095, 31 mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005095>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

D'ACQUISTO, F. *et al.* Glucocorticoid treatment inhibits annexin-1 expression in rheumatoid arthritis CD4+ T cells. *Rheumatology*, v. 47, n. 5, p. 636–639, 29 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390587>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

DA CUNHA, E. E.; OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. *Pulm Pharmacol Ther*, v. 25, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546484>>.

DAMAZO, A. S. *et al.* Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. *BMC Immunology*, v. 12, n. 1, p. 59, 19 out. 2011. Disponível em: <<http://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2172-12-59>>. Acesso

em: 17 jan. 2018.

DE COUPADE, C. *et al.* Cytokine modulation of liver annexin 1 expression during experimental endotoxemia. *The American journal of pathology*, v. 159, n. 4, p. 1435–43, out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583971>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

DOCKRELL, D. H.; WHYTE, M. K. B.; MITCHELL, T. J. Pneumococcal Pneumonia Mechanisms of Infection and Resolution. *Translating Basic Research Into Clinical Practice*, v. 142, n. 2, p. 482 – 491, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871758>>. Acesso em: 21 nov. 2016.

DORWARD, D. A. *et al.* The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *The American journal of pathology*, v. 185, n. 5, p. 1172–84, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25791526>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

DUFTON, N. *et al.* Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 184, n. 5, p. 2611–2619, 1 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107188>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

ERNST, S. *et al.* An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 172, n. 12, p. 7669–76, 15 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187149>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

FAIX, J. D. Biomarkers of sepsis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, v. 50, n. 1, p. 23–36, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23480440>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

FANG, R. *et al.* Critical Roles of ASC Inflammasomes in Caspase-1 Activation and Host Innate Resistance to *Streptococcus pneumoniae* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 187, n. 9, p. 4890–4899, 1 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21957143>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

FILHO, G. B. *Bogliolo Patologia*. 9. ed. [S.l: s.n.], 2016.

FLOWER D 'ACQUISTO, R. J. *et al.* Corrections: Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *J Immunol The Journal of Immunology by guest on January J. Immunol*, v. 186, n. 184, p. 2684–2685, 2011. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/186/4/2684>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

FORTHAL, D. N. Functions of Antibodies. *Microbiology spectrum*, v. 2, n. 4, p. 1–17, 15 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25215264>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

GALVÃO, I. *et al.* Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. *European Journal of Immunology*, v. 47, n. 3, p. 585–596, mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995621>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

GARCIA-VIDAL, C. *et al.* Effects of systemic steroids in patients with severe community-acquired pneumonia. *European Respiratory Journal*, v. 30, n. 5, p. 951–956, 1 nov. 2007. Disponível em: <<http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00027607>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

GARCIA PEDRERO, J. M. *et al.* Annexin A1 down-regulation in head and neck

cancer is associated with epithelial differentiation status. *The American journal of pathology*, v. 164, n. 1, p. 73–9, 1 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695321>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

GASTARDELO, T. S. *et al.* Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. *The American journal of pathology*, v. 174, n. 1, p. 177–83, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095957>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

GASTARDELO, T. S. *et al.* Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. *PloS one*, v. 9, n. 12, p. e111317, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25490767>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

GAVINS, F. N. E. *et al.* Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-FPR2/ALX anti-inflammatory system. *The FASEB Journal*, v. 26, n. 12, p. 4977–4989, 10 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.12-205971>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

GHONEIM, H. E.; MCCULLERS, J. A. Adjunctive Corticosteroid Therapy Improves Lung Immunopathology and Survival During Severe Secondary Pneumococcal Pneumonia in Mice. *Journal of Infectious Diseases*, v. 209, n. 9, p. 1459–1468, 1 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273183>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

GIEBELER, A. *et al.* Deficiency of Formyl Peptide Receptor 1 and 2 Is Associated with Increased Inflammation and Enhanced Liver Injury after LPS-Stimulation. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, p. e100522, 23 jun. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0100522>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

GIROL, A. P. *et al.* Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 190, n. 11, p. 5689–701, 1 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645879>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

GOBBETTI, T. *et al.* Nonredundant protective properties of FPR2/ALX in polymicrobial murine sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 52, p. 18685–90, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/111/52/18685.abstract>>.

GOULDING, N. J. *et al.* Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *Lancet (London, England)*, v. 335, n. 8703, p. 1416–8, 16 jun. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1972208>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

HANNON, R. *et al.* Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in Annexin 1-/- Mouse. *The FASEB Journal*, v. 17, n. 2, p. 253–5, 3 fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475898>>. Acesso em: 13 dez. 2017.

HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - PNEUMOVAX 23. 2014. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM257088.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - PREVNAR 13. 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM201669.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

HIRAMOTO, H. *et al.* Annexin A1 negatively regulates viral RNA replication of

hepatitis C virus. *Acta medica Okayama*, v. 69, n. 2, p. 71–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25899628>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

HIRST, R. A. *et al.* The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clinical and experimental immunology*, v. 138, n. 2, p. 195–201, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15498026>>. Acesso em: 12 nov. 2016.

HUGHES, E. L. *et al.* Mast cells mediate early neutrophil recruitment and exhibit anti-inflammatory properties via the formyl peptide receptor 2/lipoxin A4 receptor. *British Journal of Pharmacology*, v. 174, n. 14, p. 2393–2408, jul. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28471519>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

HYAMS, C. *et al.* Streptococcus pneumoniae Resistance to Complement-Mediated Immunity Is Dependent on the Capsular Serotype. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 2, p. 716–725, 1 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19948838>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

KADIOGLU, A. *et al.* The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 288–301, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1871>>. Acesso em: 12 maio 2017.

KARLSTRÖM, A. *et al.* Toll-like receptor 2 mediates fatal immunopathology in mice during treatment of secondary pneumococcal pneumonia following influenza. *The Journal of infectious diseases*, v. 204, n. 9, p. 1358–66, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900488>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

KHAN, A. Q. *et al.* Endogenous pro- and anti-inflammatory cytokines differentially regulate an in vivo humoral response to Streptococcus pneumoniae. *Infection and immunity*, v. 70, n. 2, p. 749–61, 1 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796608>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

KIRBY, A. C.; RAYNES, J. G.; KAYE, P. M. The Role Played by Tumor Necrosis Factor during Localized and Systemic Infection with *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 191, n. 9, p. 1538–1547, 1 maio 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/429296>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

KOPPE, U. *et al.* Streptococcus pneumoniae stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 188, n. 2, p. 811–7, 15 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156592>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

KOPPE, U.; SUTTORP, N.; OPITZ, B. Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system. *Cellular Microbiology*, v. 14, n. 4, p. 460–466, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212419>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

LAWRENCE, S. L. *et al.* Crystal structure of Streptococcus pneumoniae pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation. *Scientific reports*, v. 5, p. 14352, 25 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403197>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

LEONI, G. *et al.* Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 3, p. 1215–1227, 2 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25664854>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

LIAO, W.-I. *et al.* Ac2-26, an Annexin A1 Peptide, Attenuates Ischemia-Reperfusion-Induced Acute Lung Injury. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 8, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5578160/pdf/ijms-18-01771.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MADERNA, P. *et al.* Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 174, n. 6, p. 3727–33, 15 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749912>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

MARIK, P. *et al.* Hydrocortisone and Tumor Necrosis Factor in Severe Community-Acquired Pneumonia. *Chest*, v. 104, n. 2, p. 389–392, ago. 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369216353466>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

MARRIOTT, H. M. *et al.* Reactive Oxygen Species Regulate Neutrophil Recruitment and Survival in Pneumococcal Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 177, n. 8, p. 887–895, 15 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200707-990OC>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

MCARTHUR, S. *et al.* Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 195, n. 3, p. 1139–51, 1 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26101324>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

MORAES, L. A. *et al.* Annexin-A1 enhances breast cancer growth and migration by promoting alternative macrophage polarization in the tumour microenvironment. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 17925, 20 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-17622-5>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

MORAND, E. F. *et al.* Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clinical immunology and immunopathology*, v. 76, n. 2, p. 195–202, ago. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7614738>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

MURPHY, K. *Janeway's Immunobiology*. 8. ed. [S.l: s.n.], 2011.

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

NEILL, D. R. *et al.* T Regulatory Cells Control Susceptibility to Invasive Pneumococcal Pneumonia in Mice. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 4, p. e1002660, 19 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563306>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

NIE, W. *et al.* Corticosteroids in the Treatment of Community-Acquired Pneumonia in Adults: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, p. e47926, 24 out. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0047926>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

ODUTOLA, A. *et al.* Efficacy of a novel, protein-based pneumococcal vaccine against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants: A phase 2, randomized, controlled, observer-blind study. *Vaccine*, v. 35, n. 19, p. 2531–2542, 2 maio 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X1730405X>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

OLMOS, G.; LLADÓ, J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation*, v. 2014, p. 861231, 21 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966471>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

PATEL, D. M. *et al.* Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. *Journal of Cell Science*, v. 124, n. 4, p. 578–588, 15 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245195>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

PATEL, D. M. *et al.* Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. *Journal of cell science*, v. 124, n. Pt 4, p. 578–88, 15 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245195>>. Acesso em: 25 set. 2017.

PECHOUS, R. D. With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 160, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28507954>>. Acesso em: 25 maio 2017.

PERRETTI, M. *et al.* Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. *The American journal of pathology*, v. 158, n. 6, p. 1969–73, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395373>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

PERRETTI, M. *et al.* Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 36, n. 11, p. 737–755, nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26478210>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 1, p. 62–70, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2470>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. *British journal of pharmacology*, v. 118, n. 3, p. 605–10, jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8762084>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

PERUCCI, L. O. *et al.* Annexin A1 and specialized proresolving lipid mediators: promoting resolution as a therapeutic strategy in human inflammatory diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 21, n. 9, p. 879–896, 2 set. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28786708>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

*Pneumococcal Disease | Clinical | Transmission | CDC*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/transmission.html>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

*Pneumococcal Vaccination | CDC*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/index.html>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

QIN, C. X. *et al.* Endogenous Annexin-A1 Regulates Haematopoietic Stem Cell Mobilisation and Inflammatory Response Post Myocardial Infarction in Mice In Vivo. *Scientific Reports 2017 7:1*, v. 7, n. 1, p. 16615, 30 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-16317-1>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

RABIET, M.-J. *et al.* Formyl Peptide Receptor 3 (FPR3) Departs from the Homologous FPR2/ALX Receptor with Regard to the Major Processes Governing Chemoattractant Receptor Regulation, Expression at the Cell Surface, and

Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 30, p. 26718–26731, 29 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21543323>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

RAUPP, M. A. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL RESOLUÇÃO NORMATIVA No - 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://ceuaics.ufba.br/sites/ceuaics.ufba.br/files/res-normativa-13.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2018. , 2013

RESCHER, U. *et al.* Proteolytic cleavage of annexin 1 by human leukocyte elastase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1763, n. 11, p. 1320–1324, 1 nov. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488906002564>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

RUDAN, I. *et al.* Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 86, n. 5, p. 408–16, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18545744>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

SATO, Y. *et al.* Up-regulated Annexin A1 expression in gastrointestinal cancer is associated with cancer invasion and lymph node metastasis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 2, n. 2, p. 239–243, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22977491>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

SEYOUM, B.; YANO, M.; PIROFSKI, L. The innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the lung depends on serotype and host response. *Vaccine*, v. 29, n. 45, p. 8002–8011, 19 out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864623>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

SILVA, S. R. DA *et al.* Impacto da vacina antipneumocócica 10-valente na redução de hospitalização por pneumonia adquirida na comunidade em crianças. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 34, n. 4, p. 418–424, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0103058216000216>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

SOEHNLEIN, O. *et al.* Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*, v. 114, n. 21, p. 4613–23, 19 nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8547664>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

SOLITO, E. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *The FASEB Journal*, 17 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.02-0941fje>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

SOLITO, E. *et al.* Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 165, n. 3, p. 1573–81, 1 ago. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903766>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

SOLITO, E. *et al.* IL-6 STIMULATES ANNEXIN 1 EXPRESSION AND TRANSLOCATION AND SUGGESTS A NEW BIOLOGICAL ROLE AS CLASS II ACUTE PHASE PROTEIN. *Cytokine*, v. 10, n. 7, p. 514–521, jul. 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466697903252>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

SOUZA, D. G. *et al.* The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 179, n. 12, p. 8533–43, 15 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056401>>. Acesso em: 25 jan.

2018.

SPRUNG, C. L. *et al.* Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock. *New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 2, p. 111–124, 10 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa071366>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

STEEL, H. C. *et al.* Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. *Mediators of inflammation*, v. 2013, p. 490346, 25 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453422>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

STUPKA, J. E. *et al.* Community-acquired pneumonia in elderly patients. *Aging health*, v. 5, n. 6, p. 763–774, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694055>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

SUGIMOTO, M. A. *et al.* Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *Journal of immunology research*, v. 2016, p. 8239258, 2016. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4738713&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

SUGIMOTO, M. A. *et al.* Resolution of inflammation: what Controls its Onset? *Immunol*, v. 7, n. 7, p. 1603389–160, 2016.

SUN KANG, D.; SUNG-HOU KIM, S.; HUBER, R. Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution XIANGWEI WENG,\*3 HARTMUT LUECKE? IN SUNG SONG. *Protein Science*, v. 2, p. 448–458, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2142391/pdf/8453382.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

TAKASHIMA, K. *et al.* Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. *Infection and immunity*, v. 65, n. 1, p. 257–60, jan. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8975920>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

TAVARES, L. P. *et al.* CXCR1/2 Antagonism Is Protective during Influenza and Post-Influenza Pneumococcal Infection. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1799, 13 dez. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01799/full>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

TAVARES, L. P. *et al.* Inhibition of PDE4 during pneumococcal pneumonia reduces inflammation and lung injury in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, p. 1–37, 2015.

TOMLINSON, G. *et al.* TLR-mediated inflammatory responses to Streptococcus pneumoniae are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 193, n. 7, p. 3736–45, 1 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25172490>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. [S.l.: s.n.], 2012.

TRENTIN, P. G. *et al.* Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. *British journal of pharmacology*, v. 172, n. 12, p. 3058–71, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659822>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

TROEGER, C. *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a

systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Infectious diseases*, v. 17, n. 11, p. 1133–1161, 1 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28843578>>. Acesso em: 27 jan. 2018.

TSAO, F. H. C. *et al.* Degradation of Annexin I in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 18, n. 1, p. 120–128, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.18.1.2808>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

TZELEPIS, F. *et al.* Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 2, p. 752–768, 2015.

UNICEF | *Pneumonia claims the lives of the world's most vulnerable children.* Disponível em: <<https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/#>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

VAGO, J. P. *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Journal of leukocyte biology*, v. 92, n. 2, p. 249–58, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493082>>.

VAGO, J. P. *et al.* Proresolving Actions of Synthetic and Natural Protease Inhibitors Are Mediated by Annexin A1. *The Journal of Immunology*, v. 196, n. 4, p. 1922–32, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26800869>> <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1500886>>.

VAN DER POLL, T. *et al.* Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *The Journal of infectious diseases*, v. 174, n. 5, p. 994–1000, nov. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896500>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

VANESSA, K. H. Q. *et al.* Absence of Annexin A1 impairs host adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis in vivo. *Immunobiology*, v. 220, n. 5, p. 614–623, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.12.001>>.

VITAL, S. A. *et al.* Formyl-Peptide Receptor 2/3/Lipoxin A4 Receptor Regulates Neutrophil-Platelet Aggregation and Attenuates Cerebral Inflammation: Impact for Therapy in Cardiovascular Disease. *Circulation*, v. 133, n. 22, p. 2169–79, 31 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27154726>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

VONG, L. *et al.* Annexin 1 Cleavage in Activated Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 41, p. 29998–30004, 12 out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681950>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

WANG, C.-S. *et al.* ALX/FPR2 Modulates Anti-Inflammatory Responses in Mouse Submandibular Gland. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 24244, 11 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep24244>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WANG, H. *et al.* Aspirin-triggered resolvin D1 reduces pneumococcal lung infection and inflammation in a viral and bacterial coinfection pneumonia model. *Clinical Science*, v. 131, n. 18, p. 2347–2362, 15 set. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28779028>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

WHO | Causes of child mortality. WHO, 2017. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/child\\_health/mortality/causes/en/](http://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/)>. Acesso em: 21 nov. 2017.

WHO | Pneumonia. WHO, 2017. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

WHO | The top 10 causes of death. *WHO*, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

WRIGHT, T. W. *et al.* Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *The Journal of clinical investigation*, v. 104, n. 9, p. 1307–17, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10545529>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

YAMAMOTO, S. *et al.* The Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$  in Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Small Intestine. *Journal of Surgical Research*, v. 99, n. 1, p. 134–141, jul. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11421615>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

YAMAZAKI, M.; IWASAWA, H. Tumor Necrosis Factor (TNF). *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. [S.l.]: Elsevier, 2004. p. 636–641. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0124755704013354>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

YESILKAYA, H. *et al.* *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 4, p. 187–195, abr. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X13000152>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

YONA, S. *et al.* Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. *British journal of pharmacology*, v. 148, n. 4, p. 469–77, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633358>>. Acesso em: 8 jan. 2018.