

RUBIA ISLER MANCUSO

Avaliação dos Efeitos da Inflamação na Infecção
Respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em
Camundongos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2016

RUBIA ISLER MANCUSO

Avaliação dos Efeitos da Inflamação na Infecção
Respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em
Camundongos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Maria Leonor Sarno
de Oliveira

Co-orientador: Dr. Orlando Garcia
Ribeiro Filho

Versão corrigida. A versão original
eletrônica encontra-se disponível
tanto na biblioteca do ICB quanto na
biblioteca digital de teses e
dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Mancuso, Rubia Isler.

Avaliação dos efeitos da inflamação na infecção respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos / Rubia Isler Mancuso. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Leonor Sarno de Oliveira.
Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Infecções respiratórias.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the effects of inflammation on the respiratory infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Inflamação 3. Resposta imune inata
4. Citocinas 5. Quimiocinas 6. Metaloproteases de matriz I.
Oliveira, Prof. Dr. Maria Leonor Sarno de II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB060/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Rubia Isler Mancuso.

Título da Dissertação: Avaliação dos efeitos da inflamação na infecção respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos.

Orientador(a): Prof. Dr. Maria Leonor Sarno de Oliveira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

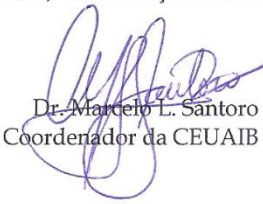
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da inflamação na infecção respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos", **protocolo nº 1200/14**, sob a responsabilidade de Maria Leonor Sarno de Oliveira e Rúbia Isler Mancuso - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/03/2014.

This is to certify that the proposal "Evaluation of the influence of inflammation in the pneumococcal respiratory infection in mice", **protocol nº 1200/14**, under the responsibility of Maria Leonor Sarno de Oliveira and Rúbia Isler Mancuso, - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 3/19/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 03/2014 - 03/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório de Biotecnologia Molecular 1	106 camundongos Balb/c 18-20g (Indif.) - Provenientes do Biotério da Fac. de Medicina/USP; 12 camundongos C57Bl/6 18-20g (Indif.) - Provenientes do Biotério da Fac. de Medicina/USP; 118 camundongos AIRmax 18-20g (Indif.); 118 camundongos AIRmin 18-20g (Indif.)

São Paulo, 21 de março de 2014


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da inflamação na infecção respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos", **protocolo nº 1200/14**, sob a responsabilidade de Maria Leonor Sarno de Oliveira e Rúbia Isler Mancuso – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/2/2015.

This is to certify that the proposal "Evaluation of the influence of inflammation in the pneumococcal respiratory infection in mice", protocol nº 1200/14, under the responsibility of Maria Leonor Sarno de Oliveira and Rúbia Isler Mancuso – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 2/19/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
03/2014 - 03/2016 Laboratório de Biotecnologia Molecular 1	90 Camundongos Balb/c 18-20g (Indif.) - Provenientes da Fac. de Medicina/USP	Aditivo de animais

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015


Dra. Wafá H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

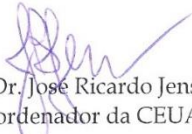
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da inflamação na infecção respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos", **protocolo nº 1200/14**, sob a responsabilidade de Maria Leonor Sarno de Oliveira e Rúbia Isler Mancuso – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 16/9/2015.

This is to certify that the proposal "Evaluation of the influence of inflammation in the pneumococcal respiratory infection in mice", **protocol nº 1200/14**, under the responsibility of Maria Leonor Sarno de Oliveira and Rúbia Isler Mancuso – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 9/16/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
03/2014 - 03/2016 Laboratório de Biotecnologia Molecular 1	50 Camundongos AIRmax, 50 Camundongos AIRmin Provenientes do Biotério do lab. de Imunogenética	Aditivo de animais

São Paulo, 18 de setembro de 2015


Dr. Jose Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira, pela dedicação, ensinamentos, paciência, orientação e por ter depositado sua confiança em mim para realização deste trabalho. Muito obrigada por acompanhar-me nessa fase da minha vida profissional, criando alicerces que serão fundamentais para que eu consiga alcançar meus objetivos futuros. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Dr. Orlando Ribeiro Filho, que sempre esteve presente discutindo as próximas etapas a serem seguidas e, principalmente, por estar sempre disposto a me ajudar, muito obrigada!

À Dra. Eliane Namie Miyaji, pela ajuda que precisei, estando sempre disponível auxiliando nos experimentos e contribuindo com ideias e sugestões construtivas, e além de tudo pelos papos do dia-a-dia. Muito obrigada!

À Dra. Alessandra Soares Schanoski, pelo auxílio, sugestões, discussões e principalmente por nos auxiliar nas análises de citometria de fluxo. Muito obrigada!

Ao Dr. Paulo Lee Ho, que mesmo ausente do laboratório, assumindo seu cargo de diretor da produção do instituto, sempre nos estimulando a crescer! Obrigada!

Agradeço especialmente a minha mãe, Beatriz, meu maior exemplo, que sempre me apoiou em todas as decisões da minha vida! Muito obrigada por ser pai e mãe ao mesmo tempo! Muito obrigada pelas brigas, cobranças, carinho, atenção e amizade. Com certeza a pessoa que me tornei hoje é por tê-la sempre ao meu lado. Muito obrigada por tudo! Amo você!

Aos meus colegas de laboratório Dr. Enéas de Carvalho, Dra. Josefa da Silva, Dra. Claudia Sossai, Dra. Luciane Shons, Dra. Carolina Salcedo Rivillas, MSc. Fabiana Lauretti, MSc. Rafaella Tostes, Marcela Vitarelli, Júlia Tavares de Castro, Tasson Rodrigues, Isabele Gradher, Gustavo Stuani, Renan e Vanessa Moreira. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado, e também, pelos bate papos e risadas.

Às funcionárias do laboratório, Aline Cavalher, Nídia Pereira, Vera Lucia Almeida pela paciência e amizade. Sem vocês nós não conseguiríamos desenvolver nossos trabalhos. Obrigada!

Ao meu meio-irmão, Alessandro Mancuso, que sempre me incentivou a seguir adiante, demonstrando sempre muito carinho pela irmãzinha caçula. Muito obrigada, Lele! Te amo!

Ao meu primo Cassiano Isler que sempre me estimulou a continuar, dando muito apoio. E em momentos de dificuldades e dúvidas dizia que o amanhã iria mostrar o quanto valeu a pena! Muito obrigada, Cá!

A minha cunhada Carina que com o jeito meio maluco, mas extremamente cativante, vinha com as palavras de incentivo, sempre querendo o melhor para mim. Muito obrigada! Adoro você!

À minha priminha querida Thais Serva que passou parte do final de semana de Páscoa desenhando as várias ideias de possíveis tabelas para compor a conclusão do trabalho. Obrigada!

À FAPESP, ao CNPq e a Fundação Butantan, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas Graças a Deus, não somos o que éramos (Martin Luther King).”

RESUMO

Mancuso RI. Avaliação dos efeitos da inflamação na infecção respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Streptococcus pneumoniae é a principal causa de doenças respiratórias que levam a morte de cerca de 400.000 crianças menores de 5 anos, a cada ano, em todo mundo. A inflamação aguda é uma importante resposta imune contra o pneumococo que pode desempenhar um papel na resolução da infecção. Neste estudo, a infecção respiratória por pneumococo foi avaliada em duas linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin). A susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax à infecção foi analisada pela sobrevivência dos animais a um desafio respiratório invasivo com a linhagem ATCC6303. Além da sobrevivência, foram avaliadas a carga bacteriana no trato respiratório e a resposta imune inata induzida pela bactéria. O desafio com pneumococo induziu a morte de 100% dos camundongos AIRmin, enquanto que somente 36,4% dos camundongos AIRmax sucumbiram à infecção. A carga bacteriana no trato respiratório dos camundongos AIRmax 48 h após o desafio foi significativamente menor que a observada nos camundongos AIRmin. Com relação à secreção de citocinas, foi possível observar que os camundongos AIRmax e AIRmin responderam à infecção por pneumococo com a secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN- γ e TNF- α , IL-17 e quimiocinas como CXCL10, CCL3 e CCL5. Entretanto, os níveis destes mediadores de resposta imune foram rapidamente controlados nos camundongos AIRmax, enquanto que, nos camundongos AIRmin os níveis permaneceram elevados em até 48 h após o desafio. Apesar desta resposta, os camundongos AIRmin não foram capazes de controlar a infecção. Foram observadas diferenças na expressão das metaloproteases de matrix, MMP-2, MMP-3, MMP-8 e proMMP-9, em resposta ao desafio por pneumococo, entre as linhagens de camundongos, sugerindo um papel destas proteínas no controle da infecção. Com relação às populações celulares no trato respiratório, uma redução significativa no número de macrófagos alveolares (MA) foi observada nos camundongos AIRmax ao longo do desafio. Por outro lado, não houve diminuição significativa no número de MA nos camundongos AIRmin. Além disso, os camundongos AIRmin apresentaram um número significativamente maior de MA expressando o receptor de manose CD206 em relação aos camundongos AIRmax, em 48 h após o desafio, sugerindo que esta população celular pode estar envolvida com a susceptibilidade destes animais à infecção. Por fim, uma maior porcentagem de macrófagos e neutrófilos em fases iniciais ou tardias de apoptose foram observadas nos camundongos AIRmin após o desafio. É possível que esta resposta esteja também relacionada à incapacidade destes camundongos controlarem a infecção. As subpopulações de macrófagos presentes no trato respiratório também foram estudadas em camundongos BALB/c vacinados com uma formulação (PspA5-wP) que confere 100% de sobrevivência ao desafio com a linhagem de pneumococo ATCC6303. Animais imunizados com PspA5-wP foram capazes de controlar a infecção por pneumococo, impedindo a invasão da bactéria na corrente sanguínea. A vacina PspA5-wP induziu um aumento no número de MA

expressando CD206, mas esta população diminuiu após o desafio. Estes resultados reforçam que o aumento no número de MA expressando CD206 após o desafio, observado apenas nos camundongos AIRmin, pode estar envolvido com a susceptibilidade destes animais à infecção.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Inflamação. Resposta imune inata. Citocinas. Quimiocinas.

ABSTRACT

Mancuso RI. Evaluation of the effects of inflammation on the respiratory infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Streptococcus pneumoniae is the main cause of respiratory infections, leading to the death of around 400,000 children under the age of 5, every year, worldwide. Acute inflammation is an important immune response against pneumococci that may play a role in the resolution of the infection. In this study, the pneumococcal respiratory infection was evaluated in two mice strains genetically selected for maximum (AIRmax) and minimum (AIRmin) acute inflammatory response. The susceptibility to pneumococcal infection was evaluated by the survival after an intranasal challenge with the ATCC6303 pneumococcal strain. Bacterial burden in the respiratory tract and the innate immune responses induced by the bacteria was also evaluated. While AIRmin mice were susceptible to pneumococcal infection, with 100% death, only 36,4% of AIRmax mice succumbed the infection. Lower levels of bacteria were observed in the respiratory tract of AIRmax mice at different time points post-challenge when compared to AIRmin mice. Both mice strains responded to the pneumococcal infection with the secretion of inflammatory cytokines, such as IL-6, IFN- γ and TNF- α , IL-17 and chemokines, such as CCL3, CCL5 and CXCL10. However, the AIRmax mice controlled the levels of these immune mediators at 48 h post-challenge, while continuous secretion of these mediators was observed in AIRmin mice. Despite this response, the AIRmin mice were unable to control the infection. Differences were observed in the expression of the matrix metalloproteases, MMP-2, MMP-3, MMP-8 and proMMP-9, in response to the challenge, suggesting a role of these proteins in the control of infection. The levels of alveolar macrophages (AM) decreased after the challenge in AIRmax mice. On the other hand, there was no significant decrease in the number of AM in AIRmin mice. Moreover, characterization of the AM showed that the number of cells expressing the CD206 mannose receptor were higher in AIRmin mice at 48 h after the challenge, when compared to AIRmax mice. This suggests a role of these cells on the susceptibility to infection. Finally, a higher percentage of macrophages and neutrophils in early or late stages of apoptosis were observed in AIRmin mice after challenge. It is possible that this response is also related to the inability of these mice to control the infection. The subpopulations of macrophages present in the respiratory tract were also studied in BALB/c mice vaccinated with a formulation (PspA5-wP) that gives 100% survival to challenge with the ATCC6303 pneumococcal strain. Animals immunized with PspA5-wP were able to control the pneumococcal infection, preventing the invasion of bacteria into the bloodstream. PspA5-wP vaccine induced an increase in the number of AM expressing the CD206 manose receptor, but this cell population decreased after the challenge. These results reinforce that the increase in the number of AM expressing the CD206 manose receptor post-challenge, observed only in AIRmin mice, may be involved with the susceptibility of these animals to infection.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Inflammation. Innate immune response. Cytokines. Chemokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Taxa de mortalidade no ano 2000 causada por *Streptococcus pneumoniae* no mundo.....23
- Figura 2** - Interações do *Streptococcus pneumoniae* com o hospedeiro: comensais e patogênicas.....27
- Figura 3** - Classes de macrófagos.....28
- Figura 4** - Esquema utilizado para obtenção da população F_0 mediante o cruzamento de oito linhagens de camundongos.....33
- Figura 5** - Curva de sobrevivência após o desafio intranasal com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^5 bactérias por animal.....46
- Figura 6** - Curva de sobrevivência após o desafio intranasal com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^4 bactérias por animal.....47
- Figura 7** - Porcentagem de perda de massa após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^4 bactérias por animal.....48
- Figura 8** - Escala de doença após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^4 bactérias por animal.....49
- Figura 9** - Porcentagem de perda de massa após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^3 bactérias por animal.....51
- Figura 10** - Recuperação de bactérias dos pulmões dos camundongos após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^3 bactérias por animal.....52
- Figura 11** - Escala de doença após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^3 bactérias por animal.....53
- Figura 12** - Recuperação de bactérias do BALF 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*.....55
- Figura 13** - Recuperação de bactérias dos pulmões 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*.....57
- Figura 14** - Número total de células nos BALFs dos camundongos antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*.....59

Figura 15 - Estratégia de análise (A) e número total de neutrófilos nos BALFs dos camundongos antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i> (B).....	60
Figura 16 - Estratégia de análise (A) e número total de macrófagos nos BALFs dos camundongos antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i> (B) e (C).....	61
Figura 17 - Estratégia de análise (A) e número total de MA expressando CD80, CD86 ou CD206 nos BALFs dos camundongos antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i> (B), (C) e (D).....	63
Figura 18 - Porcentagem de MA expressando ou não expressando CD80, CD86 ou CD206 dentro do total de MA nos BALFs dos camundongos antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	66
Figura 19 - Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CD80, CD86 ou CD206 dos MA nos BALFs dos camundongos antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	68
Figura 20 - Estratégia de análise (A) e número total de linfócitos B nos BALFs dos camundongos antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	70
Figura 21 - Secreção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	72
Figura 22 - Secreção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 do <i>S. pneumoniae</i>	74
Figura 23 - Secreção de citocinas IL-17 e G-CSF nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 do <i>S. pneumoniae</i>	76
Figura 24 - Secreção de quimiocinas CXCL2, CXCL3, CXCL10, CCL3, CCL4 e CCL5 nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 do <i>S. pneumoniae</i>	78
Figura 25 - Expressão de MMPs nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	80

Figura 26 - Estratégia de análise (A) e número total de macrófagos em apoptose (B) ou necrose (C) nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	82
Figura 27 - Estratégia de análise (A) e número total de neutrófilos em apoptose (B) ou necrose (C) nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	84
Figura 28 - Curva de sobrevivência após desafio intranasal com a linhagem ATCC6301 de <i>Streptococcus pneumoniae</i> na dose de 3×10^5	86
Figura 29 - Recuperação de bactérias dos BALFs (A) e (B) e dos pulmões (C) e (D) em 24 h e 48 h após o desafio com a linhagem M10 de <i>S. pneumoniae</i>	87
Figura 30 - Recuperação de bactérias do LN em 5 dias após o desafio com a linhagem 0603 de <i>S. pneumoniae</i>	89
Figura 31 - Indução de IgG anti-PspA5 vinte dias após a segunda imunização.....	90
Figura 32 - Recuperação de bactérias dos BALFs (A) e (B) e dos pulmões (C) e (D) em 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	91
Figura 33 - Recuperação de bactérias no sangue em 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	92
Figura 34 - Número total de células nos BALFs dos camundongos vacinados antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	92
Figura 35 - Número total de macrófagos nos BALFs dos camundongos vacinados antes (0h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	93
Figura 36 - Número total de MA expressando CD80, CD86 ou CD206 nos BALFs dos camundongos vacinados antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	95
Figura 37 - Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CD80, CD86 ou CD206 dos MA nos BALFs dos camundongos vacinados antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de <i>S. pneumoniae</i>	97

Figura 38 - Número total de neutrófilos nos BALFs dos camundongos vacinados antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*.....98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sobrevivência dos camundongos após desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^3 bactérias por animal.....50

Tabela 2 - Perfil da resposta dos camundongos AIRmin e AIRmax ao desafio respiratório invasivo com a linhagem ATCC6303 de pneumococo.....112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD - 7- Amino-Actinomycin

AIRmax - Maximal acute inflammatory reaction

AIRmin - Minimal acute inflammatory reaction

BALF - Bronchoalveolar Lavage Fluid

CBD - *Choline-binding domain*

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

G-CSF - *Granulocyte colony-stimulating factor*

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

h - horas

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

IFN- γ - Interferon γ

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

LN - Lavado nasal

MA - Macrófago alveolar

min - minuto

MMP - Metaloprotease de matriz

NOD2 - *Nucleotide binding oligomerization domain receptor 2*

OPD - Ortofenilenodiamina

PBS - Phosphate buffered saline

PCV - *Pneumococcal Conjugate Vaccine*

PCV7 - *7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*

PCV10 - *10- Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*

PCV13 - *13- Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*

Ply - Pneumolisina

PNI - Programa Nacional de Imunização

PS - Polissacarídeo Capsular

PsaA - Antígeno A da superfície do pneumococo

PspA - Proteína A da superfície de pneumococo

PspC - Proteína C da superfície de pneumococo

RSV - Vírus Respiratório Sincicial

SPF - *Specific Pathogen Free*

THY Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura

TLR-2 - *Toll-like receptor 2*

TLR-9 - *Toll-like receptor 9*

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor alpha*

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

wP - *Whole cell pertussis vaccine*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
<u>1.1 Streptococcus pneumoniae</u>	22
<u>1.2 Colonização nasal, doenças pneumocócicas e defesas do hospedeiro</u>	26
<u>1.3 Fatores de virulência</u>	29
<u>1.4 Modelos de infecção por pneumococo</u>	31
<u>1.5 Linhagens de camundongos AIRmin e AIRmax, modelos para o estudo da resposta inflamatória aguda</u>	32
2 OBJETIVOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
<u>3.1 Soluções e meios de cultivo</u>	36
3.1.1 Soluções.....	36
3.1.2 Meios de cultivo.....	36
<u>3.2 Linhagens bacterianas e condições de cultivo</u>	36
<u>3.3 Desafio respiratório intranasal letal com Streptococcus pneumoniae</u>	37
<u>3.4 Controle da massa corpórea dos camundongos</u>	38
<u>3.5 Imunização dos camundongos</u>	38
<u>3.6 Análise da indução de anticorpos</u>	39
<u>3.7 Avaliação da carga bacteriana do trato respiratório inferior e sangue</u>	39
<u>3.8 Avaliação da carga bacteriana do trato respiratório superior</u>	40
<u>3.9 Análise das células presentes no BALF por citometria de fluxo</u>	40

<u>3.10 Avaliação da secreção de citocinas, quimiocinas e metaloproteases (MMPs) no BALF utilizando a técnica de Luminex</u>	43
<u>3.11 Análises estatísticas</u>	44
4 RESULTADOS	46
<u>4.1 Avaliação do papel da inflamação na susceptibilidade à infecção respiratória por <i>Streptococcus pneumoniae</i> através do uso de camundongos geneticamente selecionados para resposta inflamatória aguda mínima (AIRmin) ou máxima (AIRmax)</u>	46
<u>4.1.1 Avaliação da resposta imune inata à infecção respiratória com a linhagem de pneumococo ATCC6303 em camundongos AIRmin e AIRmax</u>	54
<u>4.1.2 Avaliação da susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax no modelo de infecção respiratória invasiva com a linhagem ATCC6301 (sorotipo 1) do <i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	86
<u>4.1.3 Avaliação da susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax no modelo de infecção respiratória não invasiva com a linhagem M10 (sorotipo 11A) do <i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	87
<u>4.1.4 Avaliação da susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax no modelo de colonização nasal com a linhagem 0603 (sorotipo 6B) do <i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	88
<u>4.2 Caracterização da resposta imune no trato respiratório de camundongos vacinados com a formulação PspA5-wP</u>	89
5 DISCUSSÃO	100
6 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é um diplococo Gram-positivo que coloniza a nasofaringe de indivíduos saudáveis, estabelecendo uma relação assintomática e comensal com hospedeiro. Eventualmente, a bactéria pode invadir sítios normalmente estéreis causando doenças como otite média, sinusite, pneumonia, septicemia e meningite (Klein, 1981). O pneumococo acomete principalmente crianças com idade inferior a 5 anos, idosos e indivíduos imunossuprimidos.

Pneumonia e diarreia são responsáveis por 30% de todas as causas de morte infantil no mundo (Walker et al., 2013). Um estudo epidemiológico e etiológico de pneumonias em crianças em 192 países, em diversos continentes mostrou que a incidência de casos de pneumonia por ano de vida da criança, reduziu de 0,29 entre 1960 e 2000 para 0,22 entre 1990 e 2010. Este resultado corresponde a aproximadamente 25% de redução (Rudan et al., 2013). Entre os agentes etiológicos, o vírus respiratório sincicial (RSV) foi responsável por 28,8% dos casos, seguido por influenza (17%) e pneumococo (6,9%). Entretanto, quando são considerados os episódios de pneumonia severa, 22,6% são devido a infecções por RSV, 7% por influenza, e 18,3% por pneumococo. Ainda, quando são consideradas as crianças que eventualmente morrem por pneumonia, a importância do pneumococo aumenta para 32,7% dos casos (Rudan et al., 2013; Walker et al., 2013).

Em 2000 ocorreram aproximadamente 14,5 milhões de casos de doenças pneumocócicas, resultando na morte de 826.000 crianças com idade entre 1 a 59 meses em todo mundo, acometendo principalmente países em desenvolvimento (Figura 1). Dessas mortes, mais de 91.000 casos eram de crianças HIV positivas (O'brien et al., 2009). Dados mais recentes indicam que entre 2010 e 2011, a morte de crianças menores de cinco anos por doenças pneumocócicas no mundo todo foi ao redor de 400.000 (Walker et al., 2013). A introdução das vacinas conjugadas contra pneumococo (PCV) em diversos países foi responsável por esta redução.

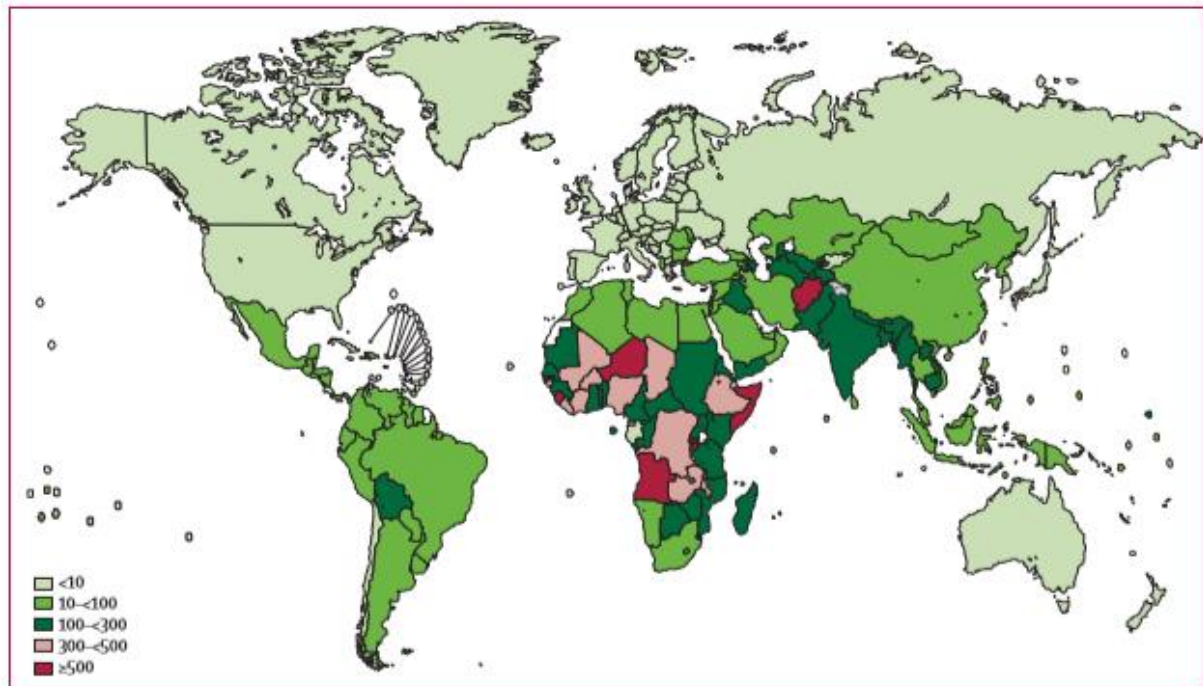


Figura 1 - Taxa de mortalidade no ano 2000 causada por *Streptococcus pneumoniae* no mundo. Mortalidade por doenças pneumocócicas em crianças com idade entre 1-59 meses por 100.000 crianças (somente mortes por pneumococo HIV-negativo) (O'brien et al., 2009).

Estimativas do Brasil no ano de 2005 indicaram que houve 374.000 casos de otite média, 158.000 casos de pneumonia e mais de 300 casos de septicemia resultando em mais de 40.000 mortes causadas por doenças pneumocócicas (Constenla, 2008). O uso de agentes antimicrobianos está entre as principais estratégias de combate as infecções pneumocócicas, porém a dificuldade em estabelecer um tratamento eficaz é devido ao surgimento de cepas resistentes a antibióticos, principalmente β -lactâmicos (Kim et al., 2012; Moyo et al., 2012).

Mais de 90 sorotipos de pneumococo já foram descritos de acordo com a composição química da cápsula polissacarídica (Calix; Nahm, 2010). A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência do pneumococo, auxiliando no escape à fagocitose por células do hospedeiro (Kadioglu et al., 2008; Weiser, 2010).

As vacinas comercialmente disponíveis são constituídas por polissacarídeos capsulares (PS), porém apresentam alto custo de produção e, no caso da vacina polissacarídica 23-valente (Pneumovax® 23; Merck) apresenta baixa imunogenicidade. A vacina 23-valente, licenciada na década de 70, é composta por polissacarídeos capsulares de 23 sorotipos prevalentes nos Estados Unidos e na Europa. Devido sua composição ser por PS livres, esta não é capaz de ativar respostas de células T, portanto não induz memória. Sendo assim, esta vacina não é

indicada para crianças menores de 2 anos, e seu uso em idosos ainda é questionado devido a falta de evidências de diminuição de doenças invasivas após a introdução desta no esquema de vacinação do idoso (Miyaji et al., 2013).

As vacinas de segunda geração são as vacinas conjugadas a um carreador proteico. A primeira vacina de segunda geração foi licenciada nos Estados Unidos no ano 2000. A vacina 7-valente (Pevnar®; Wyeth/Pfizer) (PCV7) é a primeira vacina conjugada composta por PS de 7 sorotipos de pneumococo (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) mais prevalentes nos Estados Unidos e Europa, conjugados à toxina difitérica destoxificada CRM₁₉₇. Devido à conjugação com um componente proteico, esta vacina induz resposta dependente de células T, portanto é indicada para ser administrada em crianças menores de 2 anos e também em idosos, porém apresentam uma cobertura mais limitada de sorotipos (Black et al., 2000; Webster et al., 2011). Com a introdução da PCV7 nos Estados Unidos e Europa houve uma redução das doenças pneumocócicas invasivas e também na colonização pelo pneumococo (Ghaffar et al., 2004; Gladstone et al., 2011; Weinberger; Malley; Lipsitch, 2011; Whitney et al., 2003). Entretanto, alguns estudos realizados demonstraram que após a introdução da vacina PCV7 em alguns países, houve um aumento de doenças causadas por sorotipos não presentes nas vacinas (Hicks et al., 2007; Singleton et al., 2007; Weinberger; Malley; Lipsitch, 2011).

Devido à ocorrência de substituição de sorotipos observada após a introdução da PCV7, verificou-se a necessidade da ampliação de cobertura de sorotipos nas formulações vacinais. Em 2009 e 2010, duas novas vacinas conjugadas foram incorporadas no mercado com um número adicional de sorotipos de pneumococo, ampliando assim a cobertura de isolados. A vacina 10-valente (Synflorix™; GSK) (PCV10) contendo polissacarídeos de 10 sorotipos e a 13-valente (Pevnar 13®; Pfizer) (PVC13) contendo polissacarídeos de 13 sorotipos foram licenciadas na Europa e Estados Unidos, respectivamente. A PCV10 é composta pelos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F conjugados com a proteína D do *Haemophilus influenzae*, sorotipo 18C conjugado com o toxóide tetânico e o sorotipo 19F conjugado com toxóide diftérico. A PCV13 é composta pelos sorotipos presentes na PCV7 com adicional dos sorotipos 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A (Gladstone et al., 2012; Miyaji et al., 2013).

Desde março de 2010, a vacina PCV10 compõe o calendário de vacinação brasileiro. A administração para as crianças de até 5 anos de idade é composta por 4 doses iniciando aos 2 meses, 4 meses, 6 meses e um reforço entre 12 a 15 meses. Um estudo conduzido no Hospital da Universidade de São Paulo avaliou a distribuição dos sorotipos, resistência a antibióticos e o potencial de cobertura da vacina PCV10 em doenças pneumocócicas invasivas antes e após a introdução desta no programa nacional de imunização (PNI) (Dos Santos et al., 2013). A incidência de doenças pneumocócicas invasivas em crianças com idade inferior a 2 anos apresentou uma redução de 20.30 para 3.97 a cada 1000 crianças, após a implementação da PCV10. A incidência dos sorotipos presentes na PCV10 diminuiu de 16.47 para 0.44 casos por 1000 indivíduos neste mesmo grupo. Assim, esses dados mostraram uma redução no número de doenças invasivas causadas pelo pneumococo após a introdução da PCV10 em crianças com idade inferior a 2 anos. Contudo, apesar de serem necessários mais estudos, os dados indicaram que pode ocorrer uma substituição dos sorotipos após a introdução desta vacina. Antes da inclusão da vacina no PNI, os sorotipos mais frequentes eram 14, 5, 6B, 12F e 1, sendo todos presentes na PCV10. Após a introdução, os sorotipos mais frequentemente isolados foram 7F, 8, 12F e 3, que não estão incluídos na formulação.

Outro estudo conduzido em Goiânia avaliou a colonização por pneumococo em crianças entre 7 e 18 meses de idade vacinadas com a PCV10. Os resultados mostraram redução de 35,9% e 44% na colonização de crianças que receberam duas ou três doses da vacina, respectivamente (Andrade et al., 2014). Ainda, um trabalho mais recente avaliou a eficácia da PCV10 contra doenças pneumocócicas invasivas em crianças com idade média ao redor de 13 meses. O estudo foi composto por 316 casos e 1219 controles provenientes de 10 estados brasileiros. Os dados mostraram que a eficácia da PCV10 foi de 83,8% contra os sorotipos vacinais e 77,9% contra os sorotipos relacionados. A proteção contra sorotipos não vacinais foi não significativa (Domingues et al., 2014). Todos estes estudos mostram a eficácia da PCV10 contra colonização e doenças pneumocócicas invasivas em crianças brasileiras. A continuidade da vigilância epidemiológica é de grande importância para a determinação de possível substituição dos sorotipos prevalentes.

1.2 Colonização nasal, doenças pneumocócicas e defesas do hospedeiro

O pneumococo mantém uma relação comensal e assintomática em vários momentos da vida do hospedeiro humano, colonizando o trato respiratório superior. Frequentemente o indivíduo pode ser colonizado por mais de um sorotipo e a duração da colonização pode ser de semanas à meses. A partir deste reservatório, pode ocorrer a transmissão entre indivíduos. A colonização desencadeia uma resposta inflamatória local importante para o controle do crescimento bacteriano e conseqüentemente a eliminação da bactéria (Miyaji et al., 2013) (Figura 2 – Painel superior). O reconhecimento inicial se dá por receptores de reconhecimento padrão presentes nas células do hospedeiro, que desencadeiam os eventos subsequentes da resposta imune. Entre eles, o receptor localizado na superfície da membrana celular tipo *Toll-like receptor 2* (TLR-2) reconhece o ácido lipoteicoico e lipoproteínas na superfície da bactéria, o receptor tipo *nucleotide binding oligomerization domain receptors* (NOD2) reconhece fragmentos de peptídeoglicanos e o TLR-9 reconhece sequências de DNA não metiladas (Koppe; Suttorp; Opitz, 2012).

Na ausência desta resposta inata, há um atraso no desenvolvimento da resposta imune adaptativa e a colonização persiste por mais tempo (Weiser, 2010). Ocasionalmente, pode ocorrer um aumento na colonização, levando a invasão de sítios estéreis pelo pneumococo, resultando em doenças como pneumonia, sinusite e otite média (Figura 2 - Painel mediano). A resposta inflamatória que auxilia na eliminação da bactéria do trato respiratório inferior deve ser regulada, para que haja o controle do crescimento do patógeno sem danos excessivos ao tecido. A defesa inicial envolve fagocitose pelos macrófagos alveolares (MA) com uma resposta inflamatória baixa. Entretanto, se os níveis bacterianos não são controlados inicialmente pelos macrófagos, há um aumento na secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-8 (CXCL1), levando ao recrutamento de neutrófilos. O recrutamento destas células para os pulmões é um dos principais componentes da resposta imune contra a pneumonia pneumocócica. Entretanto, o seu recrutamento é responsável por vários aspectos clínicos observados durante pneumonia e pode, eventualmente, aumentar o risco de danos nos tecidos (Craig et al., 2009; Dockrell; Whyte; Mitchell, 2012). Células T também são recrutadas para os pulmões e promovem a ativação de MA mediante a secreção de interferon- γ (IFN- γ). A secreção de interleucina-17 (IL-17) e

IFN- γ por células T CD4⁺ também estão envolvidas na proteção contra a colonização e pneumonia, respectivamente (Kadioglu; Andrew, 2004; Miyaji et al., 2013). A expressão dos fatores de virulência contribui para a evasão do sistema imunológico. Bacteremia e meningite são condições mais severas que podem ocorrer caso a infecção não seja controlada, progredindo para a invasão da corrente sanguínea e de outros tecidos (Figura 2 - Painel inferior) (Miyaji et al., 2013).

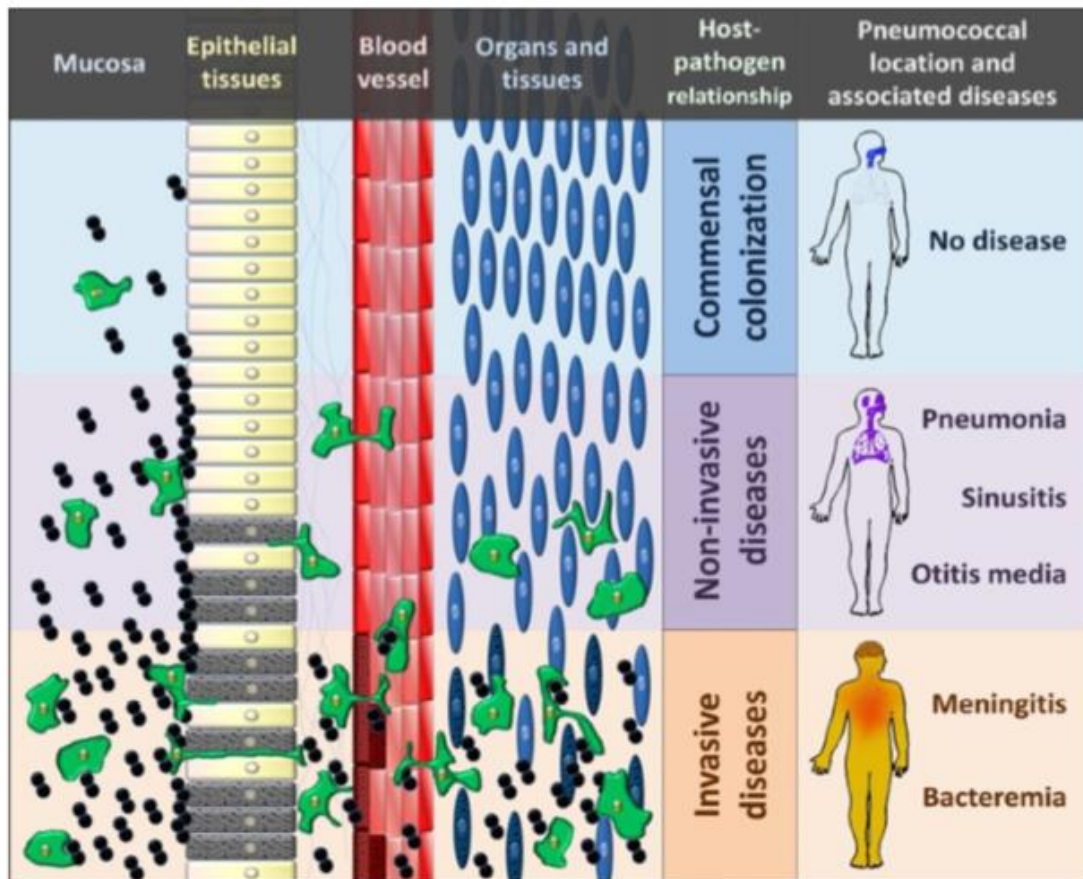


Figura 2 - Interações do *Streptococcus pneumoniae* com o hospedeiro: comensais e patogênicas (Miyaji et al., 2013).

Os MA contam aproximadamente 95% das células do trato respiratório inferior (Martin; Frevert, 2005). Essas células são a principal linha de defesa contra microrganismos. A ativação de macrófagos envolve a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, que participam na apresentação do antígeno aos linfócitos T e de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86, que possuem receptores específicos nos linfócitos. Macrófagos classicamente ativados são geralmente induzidos em resposta à infecções bacterianas ou IFN- γ e são conhecidos como M1. Esta subpopulação produz uma resposta inflamatória do tipo Th-1, com secreção de interleucina-12 (IL-12),

interleucina-6 (IL-6) e TNF- α . Estes macrófagos são altamente eficazes no combate às infecções. Outra classe de macrófagos conhecida como M2 ou macrófagos alternativamente ativados, são também capazes de secretar IL-6 e TNF- α , entre outras citocinas. Os macrófagos M2 podem ainda ser divididos em subtipos que estão relacionados com respostas do tipo Th-2, comuns em respostas alérgicas e contra parasitas ou ainda estão relacionados a respostas anti-inflamatórias, importantes para resolução da inflamação. Estes macrófagos também apresentam expressão de MHC de classe II, e podem expressar CD80 e/ou CD86, mas uma característica comum é a expressão de arginase 1 e de CD206 (também conhecido como MR ou receptor de manose) (Figura 3) (Benoit; Desnues; Mege, 2008; Gordon; Martinez, 2010).

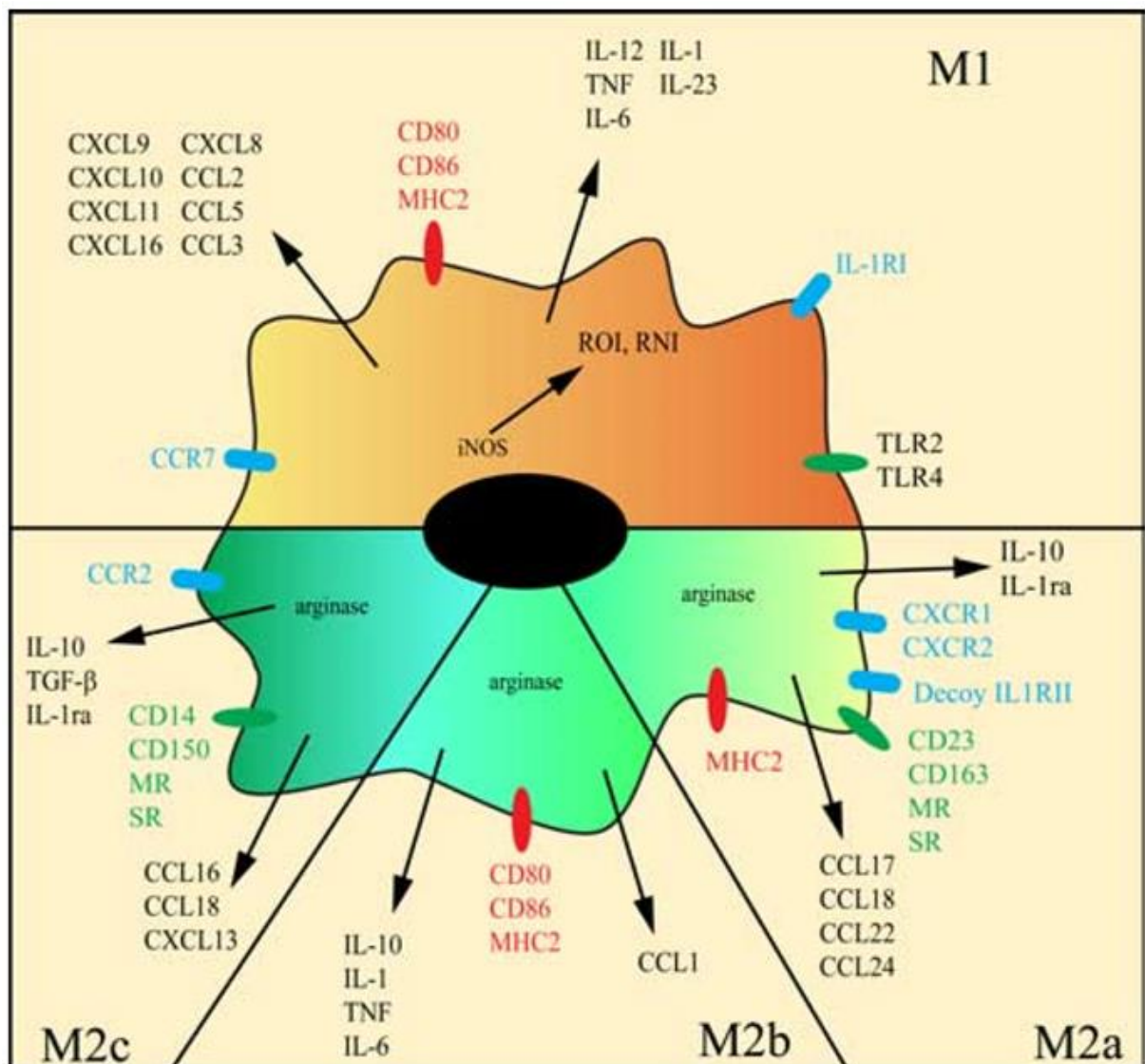


Figura 3 - Classes de macrófagos (adaptado de Benoit; Desnues; Mege, 2008).

1.3 Fatores de virulência

A cápsula polissacarídica é reconhecida como o principal fator de virulência do pneumococo e, geralmente, a ocorrência de doenças está relacionada a sorotipos encapsulados (Weiser, 2010). A presença da cápsula polissacarídica é importante para a colonização da nasofaringe, já que impede a remoção mecânica pelo muco (Mitchell; Mitchell, 2010; Steel et al., 2013). Entretanto, a sua principal função na virulência está relacionada à ação anti-fagocitose. A ligação de anticorpos na superfície do pneumococo leva a deposição de complemento. A presença da cápsula impede a interação destas moléculas com os seus receptores em células fagocíticas, resultando assim no escape da bactéria (Mitchell; Mitchell, 2010).

O pneumococo também produz a toxina pneumolisina (Ply) que faz parte de uma família de citolisinas ligantes de colesterol expressas por bactérias Gram-positivas (Weiser, 2010). A toxina se liga ao colesterol presente na membrana citoplasmática de células eucarióticas e forma oligômeros, levando à formação de poros de 400Å na superfície celular e consequente lise das células (Price; Greene; Camilli, 2012; Steel et al., 2013). O estresse osmótico gerado na célula desencadeia eventos de sinalização pró-inflamatória. A interleucina-1 beta (IL-1 β) e TNF- α são estimulados pela toxina. Além da indução da produção de citocinas, a Ply inibe os movimentos ciliares das células do trato respiratório, diminui a atividade bactericida e a migração de neutrófilos (Alonsodevelasco et al., 1995). A toxina também ativa a via clássica do sistema complemento e a sua administração é suficiente para mimetizar vários efeitos da infecção pneumocócica (Weiser, 2010). Estudos mostraram que um mutante deficiente em Ply ou um mutante que expressa a Ply com uma mutação pontual (Ply-W₄₃₃F) que apresenta capacidade reduzida de formação de poros nas células, induzem resposta inflamatória significativamente mais baixa que a bactéria selvagem (Matthias et al., 2008; Van Rossum; Lysenko; Weiser, 2005). Além disso, os mutantes persistem por mais tempo na mucosa nasal dos camundongos, quando comparados às bactérias selvagens. Estes dados confirmam a necessidade da atividade de formação de poros para a ação inflamatória da Ply e a importância da inflamação para a eliminação das bactérias (Weiser, 2010).

O pneumococo também expressa proteínas que se ancoram à superfície mediante da interação com colina presente na parede bacteriana, denominadas

choline-binding domain (CBDs). Estas incluem enzimas líticas, como a LytA que tem um papel na virulência por intermédio da lise bacteriana e liberação de produtos de degradação da parede que tem ação inflamatória (Mitchell; Mitchell, 2010). Outras CBDs, incluem a proteína A da superfície de pneumococo (PspA) e a proteína C da superfície de pneumococo (PspC). A PspA participa na virulência do pneumococo pois (i) possui capacidade de se ligar a apolactoferrina, uma proteína presente nas mucosas, inibindo sua atividade bactericida (Shaper et al., 2004); (ii) inibe a deposição do complemento C3b na bactéria, facilitando o escape do sistema imune (Ren; Mccrory, et al., 2004; Tu et al., 1999) e (iii) anticorpos anti-PspA podem aumentar a deposição de complemento (Ren; Szalai, et al., 2004), e assim, mediar a opsonofagocitose (Ren et al., 2012). A proteína C de superfície do pneumococo (PspC) possui capacidade de se ligar ao fator H, um componente regulador do sistema complemento, e esta interação promove resistência da bactéria ao sistema complemento, além de aumentar a adesão às células epiteliais dos pulmões do hospedeiro. PspC também é capaz de se ligar ao receptor de imunoglobulina polimérica, facilitando a adesão do patógeno às células epiteliais. (Hammerschmidt et al., 2007; Quin et al., 2007).

Outros fatores de virulência incluem a hialuronidase e a neuraminidase que quebram o ácido hialurônico e o ácido N-acetilneuramínico, presentes na matriz extracelular, facilitando a invasão bacteriana e induzindo respostas inflamatórias. O pneumococo também secreta uma protease que cliva a IgA humana, o principal anticorpo presente na mucosa respiratória, resultando na cobertura da superfície bacteriana com moléculas que não contém a porção cristalizável do anticorpo (Fc), impedindo, assim, o reconhecimento pelo sistema complemento e facilitando a evasão. Lipoproteínas presentes na superfície, como o antígeno A da superfície do pneumococo (PsaA) apresentam funções de adesinas ou de transporte de íons para dentro da bactéria (Mitchell; Mitchell, 2010; Weiser, 2010).

O pneumococo, portanto, é capaz de expressar diferentes fatores de virulência que interagem com moléculas do hospedeiro, modulando a resposta inflamatória, estabelecendo a adesão e evasão do sistema imune. O pneumococo também é capaz de modular a expressão destes fatores de virulência, conforme o estágio da infecção. As chamadas colônias transparentes expressam menos cápsula e são mais capazes de colonizar a mucosa respiratória. Nesta fase, a expressão de PspC

é maior. Por outro lado, durante a invasão sanguínea e dos tecidos, frequentemente são isoladas as colônias opacas que expressam grandes quantidades de cápsula, facilitando o escape da bactéria. Este tipo de colônia apresenta expressão aumentada de PspA (Dockrell; Whyte; Mitchell, 2012; Weiser, 2010).

1.4 Modelos de infecção por pneumococo

Diferentes modelos de infecção, desenvolvidos em camundongos, apresentam características comuns à infecção em humanos, facilitando os estudos (Calbo; Garau, 2010; Weiser, 2010). Diversos estudos encontrados na literatura aplicam modelos de colonização nasal, infecção pulmonar restrita (pneumonia) ou sepse (Miyaji et al., 2013).

Um estudo realizado pelo nosso grupo comparou o potencial virulento de duas linhagens de pneumococo, a M10 (sorotipo 11A) e a ATCC6303 (sorotipo 3) após infecção nasal de camundongos BALB/c (Ferreira et al., 2009). Este estudo mostrou que a linhagem M10, após atingir os pulmões dos camundongos, permaneceu por aproximadamente 30 h no trato respiratório inferior e foi completamente eliminada. Não houve detecção da bactéria na corrente sanguínea dos animais, indicando que a infecção se limitou as vias aéreas. Por outro lado, as bactérias se mantiveram em números elevados nos pulmões dos camundongos após a infecção e não foi eliminada das vias aéreas. Em aproximadamente 30 h após a infecção, a bactéria começou a ser detectada no sangue dos animais. Em 3 dias após o desafio intranasal com a linhagem ATCC6303 houve uma piora no estado dos animais que culminou com a morte em aproximadamente 5 dias. A avaliação da secreção de citocinas na mucosa respiratória dos animais, após a infecção com as duas linhagens, indicou um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IFN- γ , que foi rapidamente controlado no caso da infecção com a linhagem M10, mas não na infecção com a linhagem ATCC6303. Um aumento transitório do número de leucócitos (principalmente neutrófilos) nas vias aéreas dos animais infectados com a linhagem M10 foi observado. Por outro lado, um influxo crescente e contínuo destas células ocorreu nos pulmões dos animais infectados com a linhagem ATCC6303. Outra diferença observada na progressão da infecção respiratória em camundongos foi o fato da resposta inflamatória se iniciar mais tardiamente após a infecção com a linhagem ATCC6303 em comparação com a

infecção pela linhagem M10 (Ferreira et al., 2009). Assim, tanto o tempo de resposta como a magnitude e o controle da inflamação parecem influenciar na eliminação das bactérias e sobrevivência dos animais neste modelo.

O modelo de infecção invasiva com a linhagem ATCC6303 é bastante aplicado no estudo de candidatos vacinais em nosso laboratório. A imunização com uma formulação composta pelo antígeno PspA5 (PspA do clado 5) e a vacina celular pertussis (wP) como adjuvante (PspA5-wP) protege 100% dos camundongos BALB/c ao desafio invasivo com a linhagem ATCC6303. Por outro lado, camundongos não imunizados ou imunizados apenas com wP não sobrevivem ao desafio (Oliveira et al., 2010). A avaliação da resposta imune nos camundongos imunizados com PspA5-wP, mostrou a indução de uma resposta inflamatória transiente e controlada no trato respiratório, caracterizada por um pico de infiltração de neutrófilos e secreção de TNF- α em 12 h após o desafio. O influxo de neutrófilos e a secreção de TNF- α diminuiu significativamente logo após o pico. Por outro lado, a infiltração de neutrófilos e secreção de TNF- α aumentou progressivamente nos animais não imunizados ou imunizados com wP e não foi controlada (Lima et al., 2012).

1.5 Linhagens de camundongos AIRmin e AIRmax, modelos para o estudo da resposta inflamatória aguda

A inflamação é uma resposta de defesa importante contra agentes agressores. A ausência da resposta inflamatória ou uma reação inflamatória inadequada pode comprometer o organismo. Por outro lado, um processo inflamatório excessivo e não controlado pode levar a danos nos tecidos e predispor o hospedeiro a doenças inflamatórias crônicas (Stiffel et al., 1987). Embora o processo inflamatório possa ser multifacetado, características iniciais da reação inflamatória aguda são únicas. Inicia-se com o aumento da vascularização local, com o extravasamento de fluido rico em proteínas (exsudato) e consequente migração e ativação de leucócitos (Schreiber et al., 1989).

Em 1992, o Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan selecionou linhagens de camundongos que respondem diferentemente a inflamação. A produção das linhagens de camundongos AIRmin (reação inflamatória aguda mínima) e AIRmax (reação inflamatória aguda máxima) foi realizada a partir do cruzamento de 8 linhagens isogênicas de camundongos que compuseram a

população F_0 (Figura 4). Cada animal F_0 é caracterizado por uma recombinação diferente de 12,5% do pool de genes de cada linhagem isogênica utilizada para cruzamento (Ibanez et al., 1992; Stiffel et al., 1987).

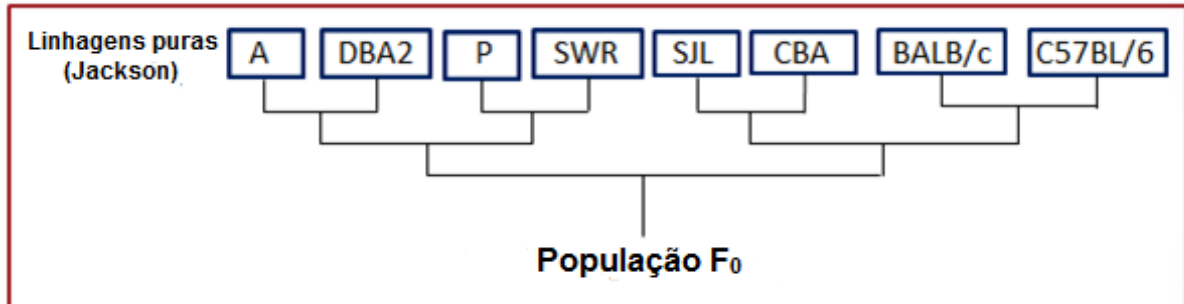


Figura 4 - Esquema utilizado para obtenção da população F_0 mediante o cruzamento de oito linhagens de camundongos. A população F_0 foi produzida no Instituto Curie por intermédio de um cruzamento de três gerações entre as oito linhagens isogênicas de camundongos obtidas do Laboratório do Jackson em Bar Harbor, ME. Adaptado de (Ibanez et al., 1992).

Para a produção da reação inflamatória aguda, foi realizada uma injeção subcutânea de uma suspensão de “microbeads” de poliacrilamida (material insolúvel, inerte e não antigênico) na região dorsal dos camundongos. A partir daí foram realizadas as seleções mediante de cruzamento bidirecional, considerando as respostas individuais altas e baixas com relação à concentração de proteínas e células infiltradas no exsudato local (Ibanez et al., 1992). As linhagens AIRmin e AIRmax foram estabelecidas e bem caracterizadas pelo grupo do laboratório de imunogenética e desde então têm contribuído para a compreensão da regulação genética da resposta inflamatória aguda.

A característica da resposta inflamatória aguda máxima nos animais AIRmax é resultado de três elementos convergentes durante a seleção genética: (i) diferenciada capacidade da medula óssea em produzir elevadas quantidades de neutrófilos após estímulo por citocinas granulopoiéticas; (ii) produção de grandes quantidade fatores quimiotáticos no exsudato, resultando em maiores quantidade de neutrófilos para o local da inflamação; (iii) maior resistência dos neutrófilos infiltrados no local da inflamação a apoptose (Ribeiro et al., 2003).

O estudo do perfil de genes expressos por células de medula óssea em ambas as linhagens de camundongos revelou que, após a indução da resposta inflamatória aguda pela injeção subcutânea de beads de poliacrilamida, 136 e 198 genes apresentaram expressão aumentada nos camundongos AIRmax e AIRmin, respectivamente. Por outro lado, 740 genes apresentaram diminuição da expressão após a indução da reação inflamatória aguda nos camundongos AIRmin. Apenas 94

genes apresentaram diminuição da expressão pelo mesmo tratamento nos animais AIRmax. Entre os genes diferencialmente expressos nos camundongos AIRmax e AIRmin estão genes relacionados com resposta inflamatória, transdução de sinal, proliferação celular e quimiotaxia de células imunes (Carneiro et al., 2009).

Um estudo realizado por Araújo e colaboradores mostrou que camundongos AIRmax são mais resistentes a infecções por *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* quando comparados aos camundongos AIRmin. O camundongos AIRmax foram capazes de controlar a replicação das bactérias no baço durante a primeira semana após a inoculação subcutânea, enquanto que o número de bactérias aumentou progressivamente no baço dos camundongos AIRmin (Araujo et al., 1998). A frequência de alelos do gene *Slc11a1* que conferem resistência (R) ou elevada susceptibilidade (S) à infecção por *Salmonella typhimurium*, foi observada consistentemente em animais AIRmax e AIRmin, respectivamente. A produção de linhagens de camundongos mediante o cruzamento fixando estes alelos em homozigose (AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}), mostrou que os camundongos AIRmax^{SS}, apesar de apresentarem homozigose para o alelo que confere sensibilidade à infecção por *S. thiphymurium* e serem de fato mais sensíveis a esta infecção que os camundongos AIRmax^{RR}, ainda permanecem mais resistentes (800 X) que os camundongos AIRmin^{SS}. Estes dados sugerem que outros fatores genéticos da reação inflamatória aguda podem modular a susceptibilidade à infecção por *S. thiphymurium* conferida pelo alelo *Slc11a1*^{ss}(Borrego et al., 2006).

O grupo do laboratório de Biotecnologia Molecular 1 do Instituto Butantan trabalha no desenvolvimento de novas vacinas contra pneumococo. Além do estudo dos fatores de virulência da bactéria para novas formulações, o entendimento dos mecanismos de patogenicidade e das interações patógeno-hospedeiro é importante para o combate efetivo às doenças pneumocócicas e para a compreensão dos fatores de risco. O estudo da evolução da infecção respiratória por pneumococo nos camundongos AIRmax e AIRmin pode contribuir para o entendimento das relações entre a resposta inflamatória aguda e o controle ou agravamento da infecção por este patógeno.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi:

- Avaliar a influência da resposta inflamatória durante diferentes fases da infecção respiratória por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos geneticamente selecionados para resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin).
- Caracterizar a resposta imune inata dos camundongos AIRmin e AIRmax ao desafio respiratório invasivo por *Streptococcus pneumoniae*
- Avaliar e comparar a população de MA em resposta ao desafio por pneumococo em camundongos BALB/c vacinados com a formulação PspA5-wP, que confere resistência à infecção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções e meios de cultivo

3.1.1 Soluções

- PBS (Solução tampão salina fosfato): NaCl 1,37 M, KCl 27 M, Na₂HPO₄ 100mM, KH₂PO₄ 14 mM pH 7,4.
- PBS-T: PBS com Tween ® 20 0,1%.
- Solução tampão carbonato-bicarbonato: Na₂CO₃ 50mM e NaHCO₃ 50 mM, ajustado para pH 9,6.
- Solução tampão citrato-fosfato: Citrato de sódio 100 mM e fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) 300 mM pH 5,0.
- Tampão FACS: PBS suplementado com 2% soro fetal bovino e 0,02% de azida sódica

3.1.2 Meios de cultivo

- Meio líquido THY: Meio Todd-Hewitt (Difco) contendo 0,5% de extrato de levedura.
- Meio ágar sangue sólido: Meio Tryptic Soy ágar com 5% de sangue de carneiro (Laborclin)

3.2 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens de *Streptococcus pneumoniae* ATCC6303 (sorotipo 3), ATCC6301 (sorotipo 1), M10 (sorotipo 11A) e 603 (sorotipo 6B) foram cultivadas em meio THY a 37 °C, sem agitação até atingir a fase exponencial (OD₆₀₀ = 0,4). Anteriormente a inoculação em meio THY, as bactérias foram passadas em ágar sangue e cultivadas por aproximadamente 18 h, a 37 °C. As bactérias foram centrifugadas a 1500 g, por 20 min e concentradas 5X em THY contendo 20% de glicerol. Alíquotas de 100 µL foram mantidas a -80 °C. Após o congelamento, um dos tubos foi descongelado e foram plaqueadas diluições em ágar sangue, para a análise da viabilidade celular. As alíquotas podem ser mantidas a -80 °C por meses. Sempre que necessário, a viabilidade celular pode ser testada novamente.

3.3 Desafio respiratório intranasal letal com *Streptococcus pneumoniae*

Os protocolos de experimentação com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan (1200/14). Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, SPF, foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As linhagens AIRmin e AIRmax foram produzidas no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Em todos os experimentos foram utilizados camundongos de 6 a 8 semanas, machos ou fêmeas, pois os resultados iniciais mostraram que não houve diferença significativa de susceptibilidade entre os sexos, dentro da mesma linhagem.

Para o desafio respiratório letal com pneumococo, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 0,4 mg (20 mg/kg) de cloridrato de xilazina e 2 mg (100 mg/kg) de cloridrato de cetamina. Os animais foram desafiados com as linhagens de pneumococo ATCC6303 ou ATCC6301 por via nasal. Para tanto, 50 µl de uma suspensão salina contendo 3×10^5 , 3×10^4 ou 3×10^3 bactérias da linhagem ATCC6303 (dependendo do experimento), ou 3×10^5 bactérias da linhagem ATCC6301 foram inoculados nos animais anestesiados, com o auxílio de uma micropipeta. A sobrevivência foi acompanhada por até no máximo 15 dias. A perda de massa corpórea e a escala de doença foram registradas em diferentes períodos após o desafio. A escala de doença foi estabelecida com os seguintes critérios de observação dos animais: saudável, eriçado, encurvado, doente e parado. Os animais foram sacrificados quando atingiram o último estágio.

Para o desafio respiratório de infecção pulmonar localizada, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 0,4 mg (20 mg/kg) de cloridrato de xilazina e 2 mg (100 mg/kg) de cloridrato de cetamina. Os animais foram desafiados por via nasal com 1×10^6 bactérias da linhagem M10 em 50 µl de salina, com auxílio de uma micropipeta.

Para o desafio de colonização nasal, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 0,4 mg (20 mg/kg) de cloridrato de xilazina e 1 mg (50 mg/kg) de cloridrato de cetamina. Os animais foram desafiados por via nasal com 5×10^6 bactérias da linhagem 603, em 10 µl de salina, com auxílio de uma micropipeta.

3.4 Controle da massa corpórea dos camundongos

Juntamente com a análise da sobrevivência dos camundongos foi verificada a perda de massa corpórea. A massa foi medida no dia do desafio e acompanhada diariamente. Os cálculos foram realizados partindo da massa inicial e foram realizados cálculos de porcentagem de perda de massa individual.

3.5 Imunização dos camundongos

Nos experimentos de imunização foi utilizada uma formulação composta pelo antígeno PspA e a vacina celular pertussis (wP) como adjuvante. O fragmento N-terminal da proteína PspA do clado 5 é proveniente da linhagem 122/02 (Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil). A proteína recombinante expressa em *Escherichia coli* BL21 SI (Invitrogen) e purificada por cromatografia de afinidade a Ni⁺² (Darrieux et al., 2008) estava disponível no laboratório.

A wP produzida pelo Instituto Butantan (São Paulo, Brasil) é composta pela bactéria inativada mediante o tratamento com 0,2% de formalina. A imunização foi realizada em grupos de 5 camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 5 a 8 semanas. Cada dose de vacina foi composta por 5 µg de PspA5 misturado ou não a 1/8 da dose humana de wP. O excesso de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* presente na preparação do PspA5 foi removido por extração com Triton X-114 (Ainda; Pabst, 1990). A imunização por via nasal foi realizada após os camundongos terem sido anestesiados por via intraperitoneal com 200 µl de uma mistura de 0,4 mg (20 mg/kg) de cloridrato de xilazina e 1 mg (50 mg/kg) de cloridrato de cetamina. A administração da vacina foi realizada em um volume de 12 µl, com o auxílio de uma micropipeta, nos dias 0 e 14. Como controles, grupos de camundongos foram imunizados com o adjuvante wP ou não foram imunizados. Vinte dias após a imunização os animais foram submetidos à sangria por punção retro-orbital. As amostras de sangue foram mantidas a 37 °C por 30 min, em seguida a 4 °C por 10 min e centrifugadas a 376 g por 10 min. O soro obtido foi mantido a -20 °C para avaliação dos níveis de anticorpos imunoglobulina G (IgG) por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), descrito no item 3.6. No dia seguinte os animais foram desafiados com a linhagem de pneumococo ATCC6303, conforme descrito no item 3.3. Lavados broncoalveolares (BALF) e pulmões foram coletados antes (tempo

0) e em 12 h e 48 h após o desafio (conforme descrito em 3.7). Em 48 h após o desafio, também foi coletado sangue para avaliação de carga bacteriana.

3.6 Análise da indução de anticorpos

Para verificar os níveis de anticorpos nos soros dos animais foi utilizado o método de ELISA. Placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas por 18 h a 4 °C com 1 µg/mL da proteína recombinante PspA5, diluída em tampão carbonato bicarbonato. Como referência, foi utilizada curva padrão de IgG (Southern Biotech). As placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com uma solução de 10% de leite desnatado em PBS-T. Após incubação por 1 h em estufa a 37 °C, as placas foram novamente lavadas e as amostras de soro diluídas seriadamente em PBS-T contendo 1% de BSA. As placas foram incubadas por 1 h em estufa a 37 °C. Posteriormente as placas foram lavadas e incubadas com anticorpos anti-IgG de camundongo produzido em cabras (Southern Biotech), por 1 h a 37 °C. Após lavagens, adicionou-se um anticorpo anti-IgG de cabras conjugado a peroxidase (Southern Biotech) e a reação foi revelada pela adição de solução de 10 mg de ortofenilenodiamina (OPD, Sigma Aldrich) em 20 mL de tampão citrato fosfato, contendo 10 µL de água oxigenada. A reação foi parada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 8 M por poço. As reações foram lidas em leitor de ELISA (Uniscience) a 492 nm. A determinação da concentração dos anticorpos foi realizada com base nas curvas de concentração aplicadas nas placas.

3.7 Avaliação da carga bacteriana do trato respiratório inferior e sangue

Os animais foram sacrificados com uma dose letal de anestésico, 1.2 mg (60 mg/kg) de cloridrato de xilazina e 6 mg (300 mg/kg) de cloridrato de cetamina, por via intraperitoneal. Para a coleta do BALF foi isolada a traqueia e 500 µl de PBS foram introduzidos, com auxílio de uma cânula de silicone, para a lavagem do trato respiratório inferior. O procedimento foi repetido com um volume de 1 ml de PBS e este foi misturado ao volume inicial, compondo o BALF. Uma alíquota do BALF foi separada para a análise de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de pneumococo, conforme descrito abaixo. O restante foi centrifugado a 0,1 g por 10 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi alíquotado e estocado a -80 °C para análise de citocinas conforme descrito no item 3.10. O sedimento celular foi utilizado

para análise dos tipos celulares pela técnica de citometria de fluxo, conforme descrito no item 3.9.

Após a coleta do BALF, os pulmões foram retirados e macerados em 1 ml de solução salina apirogênica diluída em água 1:1 (V/V). Uma alíquota foi usada para a contagem de UFC conforme descrito abaixo.

Para a determinação das UFC, diluições seriadas dos BALFs e dos macerados dos pulmões foram plaqueados em ágar sangue contendo 4 µg/ml de gentamicina. As placas foram incubadas por aproximadamente 20 h a 37 °C. As UFC de pneumococo foram contadas.

Para avaliar a invasão das bactérias na corrente sanguínea, foram coletados 90 µl de sangue por punção retro-orbital em um tubo contendo 10 µl de citrato de sódio estéril, para evitar a coagulação. Os 100 µl ou diluições seriadas (dependendo do experimento) foram plaqueados em ágar sangue contendo 4 µg/ml de gentamicina. As placas foram incubadas por aproximadamente 20 h à 37 °C. As UFC de pneumococo foram contadas.

3.8 Avaliação da carga bacteriana do trato respiratório superior

Os animais foram sacrificados com uma dose letal de anestésico, 1.2 mg (60 mg/kg) de cloridrato de xilazina e 6 mg (300 mg/kg) de cloridrato de cetamina, por via intraperitoneal. Para a coleta do lavado nasal (LN) foi isolada a traqueia e 200 µl de PBS foram introduzidos, com auxílio de uma cânula de silicone, para a lavagem do trato respiratório superior. O volume foi coletado em microtubo. O procedimento foi repetido com um volume de 200 µl de PBS e este foi misturado ao volume inicial, compondo o LN. O LN foi plaqueado para a análise de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de pneumococo, conforme descrito para os BALFs.

3.9 Análise das células presentes no BALF por citometria de fluxo

Alguns marcadores moleculares para a caracterização de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no trato respiratório de camundongos foram utilizados. Para a marcação de MA os marcadores de superfície F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻ foram escolhido para a seleção. O F4/80 pode ser um marcador inicial para a identificação de macrófagos. Embora muitas vezes seja considerado um marcador clássico de macrófagos, este marcador não separa macrófagos intersticiais, monócitos,

eosinófilos e células dendríticas. Portanto seu uso não tem um poder discriminatório. Dados da literatura também mostram a expressão desse marcador em diferentes sítios, e embora haja uma baixa expressão de F4/80 na população de MA, ele pode ser utilizado para a classificação de macrófagos nos pulmões dos camundongos. O CD11c⁺ é muito expresso em MA, mas não é expresso em outros macrófagos, portanto é classificatório de MA. O CD11b⁻ é eliminatório de células dendríticas (Misharin et al., 2013) (Hussell; Bell, 2014).

Os neutrófilos foram marcados com F4/80⁻CD11b⁺Ly6G⁺. O marcador de macrófagos, F4/80, foi utilizado para a exclusão de possíveis macrófagos. O marcador Ly6G é característico de neutrófilos, pois não é expresso em outros tipos celulares. E o marcador CD11b⁺ em elevadas concentrações é característico de identificação de neutrófilos (Misharin et al., 2013).

Para a análise de macrófagos teciduais foram utilizados os marcadores F4/80⁺CD11b⁺. O marcador CD11b não é expresso em macrófagos alveolares, porém é expresso em macrófagos teciduais (Hussell; Bell, 2014).

Os linfócitos B foram marcados com F4/80⁻B220⁺. O marcador de macrófagos, F4/80, foi utilizado para a exclusão de possíveis macrófagos. E o marcador B220 é característico de linfócitos B (Misharin et al., 2013).

Para a análise apoptose e da viabilidade das células nos ensaios de citometria, foram utilizados os marcadores moleculares Annexin V, que se liga à fosfatidilserina da superfície celular e 7-Amino-Actinomycin (7-AAD), que se liga ao DNA, respectivamente.

Células obtidas do BALF de cada animal foram contadas em duplicata em câmara de Neubauer, utilizando a solução de corante Trypan Blue (Invitrogen). As células previamente contadas foram divididas igualmente (aproximadamente 1×10^5 células) em duas placas de poliestireno de 96 poços com fundo "u" (Corning Incorporated) para a realização de dois painéis de marcação. As células foram centrifugadas a 453 g por 4 min a 4 °C, lavadas com tampão FACS e coletadas novamente por centrifugação. As células foram suspensas em 20 µl de tampão FACS contendo anticorpos conjugados a diferentes fluoróforos. Os painéis de marcação variaram de acordo com os experimentos:

Experimento para caracterização das populações celulares antes e após o desafio com pneumococo:

Painel A: anti-CD11b - FITC (BD Biosciences, clone M1/70, diluição 1:100), anti-CD11c - PE (BD Biosciences, clone HL3, diluição 1:100), anti-Ly6G - APC-Cy7 (BD Biosciences, clone 1A8, diluição 1:100), anti-F4/80 - PE-Cy7 (eBioscience, clone BM8, diluição 1:100), anti-CD80 - PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences, clone 16-10A1, diluição 1:80) e anti-CD86 - APC (BD Biosciences, clone GL1, diluição 1:80).

Painel B: anti-CD11b - FITC (BD Biosciences, clone M1/70, diluição 1:100), anti-CD11c - PE (BD Biosciences, clone HL3, diluição 1:100), anti-Ly6G - APC-Cy7 (BD Biosciences, clone 1A8, diluição 1:100), anti-F4/80 - PE-Cy7 (eBioscience, clone BM8, diluição 1:100), anti-B220 - PerCP-Cy5.5 (Invitrogen, diluição 1:100) e anti-CD206 - APC (AbD Serotec, clone MR5D3 diluição 1:50).

As amostras foram incubadas por 30 min na geladeira protegidas da luz. Após a incubação, 100 µl de tampão FACS foram adicionados, o pellet foi coletado por centrifugação e lavado novamente com 100 µl de tampão FACS. Todas as amostras foram ressuspensas em 100 µl de Cytotfix (BD Biosciences) e analisadas por citometria de fluxo no equipamento BD FACSCalibur (BD Biosciences). Foram registrados 20.000 eventos e os dados foram analisados pelo do software FlowJo, versão 10.

Experimento para a análise de apoptose e/ou necrose nas células do trato respiratório, antes e após o desafio com pneumococo:

Painel A: anti-CD11b - APCCy7 (BD Pharmingen, clone M1/70, diluição 1:100), anti-CD11c - BV510 (BD Horizon, clone HL3, diluição 1:100), anti-F4/80 - PE-Cy7 (eBioscience, clone BM8, diluição 1:100), anti-Igale - PE (BD Pharmingen, clone M5/114.15.2, diluição 1:200), anti-CD40 – BV421 (BD Horizon, clone 3/23, diluição 1:100), anti-CD86 - APC (BD Biosciences, clone GL1, diluição 1:100), anti-Annexin (BD Pharmingen, diluição 1:20) e anti-7-AAD (BD Pharmingen, diluição 1:20).

Painel B: anti-CD11b - APCCy7 (BD Pharmingen, clone M1/70, diluição 1:100), anti-CD11c - BV510 (BD Horizon, clone HL3, diluição 1:100), anti-F4/80 - PE-Cy7 (eBioscience, clone BM8, diluição 1:100), anti_lale – PE (BD Pharmingen, clone M5/114.15.2, diluição 1:200), anti-Ly6G – BV421 (BD Horizon, clone 1A8, diluição 1:100), anti-CD206 - APC (AbD Serotec, clone MR5D3 diluição 1:100), anti-Annexin BD Pharmingen, diluição 1:20) e anti-7-AAD (BD Pharmingen, diluição 1:20).

As amostras foram incubadas com os marcadores de superfície (exceto marcadores Annexin e 7-AAD) por 30 min na geladeira protegidas da luz. Após a incubação, 100 µl de tampão FACS foram adicionados, o pellet foi coletado por centrifugação. Todas as amostras foram ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação (fornecido pelo kit de marcação) diluído 1x em água, contendo 5 µl de Annexin e 5 µl de 7-AAD. As amostras foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 400 µl de tampão de ligação e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento BD FACSCalibur (BD Biosciences). Foram registrados 40.000 eventos e os dados foram analisados pelo do software FlowJo, versão 10.

3.10 Avaliação da secreção de citocinas, quimiocinas e metaloproteases (MMPs) no BALF utilizando a técnica de Luminex

A avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas foi realizada nas amostras de BALF pela técnica de Luminex utilizando o equipamento e os reagentes Magpix (Merck Millipore) seguindo as instruções do fabricante. Nesta técnica, é possível a detecção de diferentes citocinas em uma mesma amostra mediante beads que são identificadas por códigos de cores, acopladas a anticorpos de captura específicos. Após a reação com as beads, utiliza-se um anticorpo de detecção e a amostra é passada pelo equipamento que contém dois lasers, permitindo a identificação e quantificação das citocinas com base em curvas padrões aplicadas.

Para a realização dos experimentos foram adicionados 50 µl das amostras de BALF nos respectivos poços. Em todos os poços foram adicionados 25 µl de “beads” conjugadas a anticorpos anti citocinas e quimiocinas IFN- γ , TFN- α , interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), interleucina 2 (IL-2), interleucina 4

(IL-4), interleucina 5 (IL-5), IL-6, interleucina 7 (IL-7), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), IL-12(p40), IL-12(p70), interleucina 13 (IL-13), interleucina 15 (IL-15), IL-17, CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5. Para a análise das MMPs foram adicionados 25 µl de “beads” conjugadas a anticorpos anti-MMP2, -MMP3, -MMP8, -proMMP9 e -MMP12. Paralelamente, foram realizadas curvas padrão de citocinas, quimiocinas e MMPs, e controles máximos e mínimos com concentrações conhecidas. Estas amostras também foram misturadas às beads. A placa foi selada e incubada com agitação por aproximadamente 18 h a temperatura de 4 °C.

No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem do kit. Para a lavagem da placa foi utilizada a lavadora magnética manual, para que as beads se fixassem no fundo da placa. Posteriormente, adicionou-se 25 µl dos anticorpos de detecção conjugados a biotina em todos os poços e as amostras foram incubadas com agitação por 1 h a temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 25 µl de Streptavidina-Ficoeritrina em todos os poços e as amostras foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente, com agitação. As placas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem com auxílio da lavadora manual magnética. Após a lavagem, 150 µl de *Drive Fluid* (fluido do equipamento) foram adicionados a cada poço e as amostras foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente, com agitação para que as beads se ressuspendessem.

A leitura foi realizada em leitor Magpix (Merck Millipore). Os resultados foram expressos em concentração de citocinas presentes nas amostras, com base nas curvas padrões aplicadas no experimento.

3.11 Análises estatísticas

Para a comparação da sobrevivência dos animais aos desafios com pneumococo foi utilizada a curva de sobrevivência e o teste estatístico de Log-Rank, ou o teste exato de Fisher. Para a comparação da carga bacteriana nos pulmões, BALF, LA e sangue e porcentagem de perda de massa corpórea dos animais foi utilizado o teste estatístico de Mann-Whitney. Para a comparação de número de células infiltradas no trato respiratório e secreção de citocinas no BALF foi utilizado o teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Em todos os casos, $P \leq 0,05$ foi

considerado significativo. Os gráficos e análises estatísticas foram realizados com o programa Prism GraphPad 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do papel da inflamação na susceptibilidade à infecção respiratória por *Streptococcus pneumoniae* mediante o uso de camundongos geneticamente selecionados para resposta inflamatória aguda mínima (AIRmin) ou máxima (AIRmax).

Em estudos realizados pelo nosso grupo, foi mostrado que o desafio de camundongos BALB/c com a linhagem de pneumococo ATCC6303 em uma dose de 3×10^5 bactérias, administradas por via nasal, leva a uma piora no estado do animal 3 dias após o desafio que culmina com a morte em aproximadamente 5 dias. A bactéria começou a ser detectada no sangue em 30 h após o desafio e nos tempos posteriores a quantidade de UFC aumentou continuamente até 60 h (Ferreira et al., 2009).

Esta dose foi escolhida para a primeira análise da virulência da linhagem ATCC6303 nos camundongos AIRmax e AIRmin. Camundongos BALB/c foram utilizados neste experimento como um controle conhecido (Figura 5).

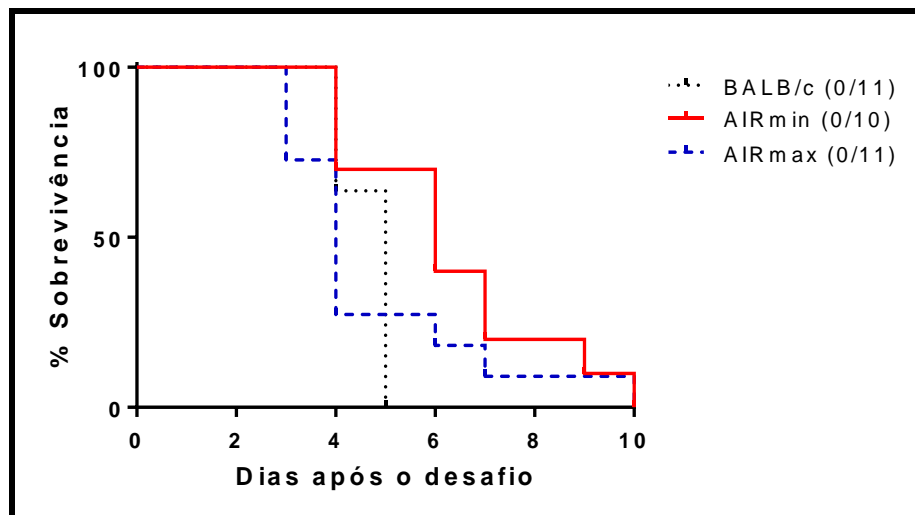


Figura 5 - Curva de sobrevivência após o desafio intranasal com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^5 bactérias por animal. Os camundongos foram observados por 10 dias e sacrificados quando atingiram elevado nível de doença. O gráfico foi composto por dados de dois experimentos independentes.

Os animais inoculados foram acompanhados por até 10 dias, já que neste período ainda havia animais doentes. A curva mostra que 100% dos camundongos BALB/c morreram em até 5 dias, indicando que o experimento funcionou como o esperado. Por outro lado, camundongos AIRmax e AIRmin apresentaram tempo de sobrevivência maior que os camundongos da linhagem BALB/c, sendo que 100% dos animais das duas linhagens morreram em até 10 dias após o desafio. Apesar de

apresentarem tempo maior de sobrevivência, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Como não foi possível observar diferença significativa na susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax à infecção por pneumococo neste modelo, decidiu-se usar uma dose 10 vezes menor de bactérias no experimento seguinte. Assim, o mesmo experimento foi realizado com a dose de 3×10^4 bactérias para o desafio (Figura 6).

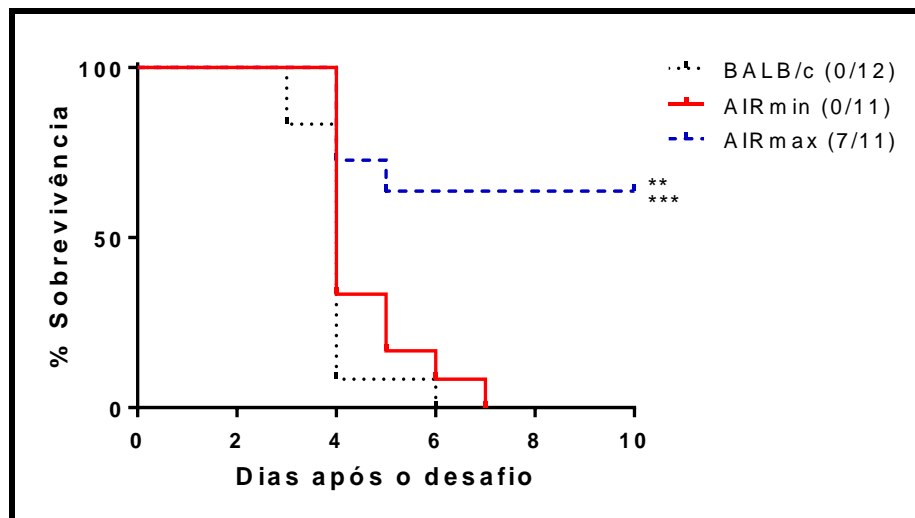


Figura 6 - Curva de sobrevivência após o desafio intranasal com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^4 bactérias por animal. Os camundongos foram observados por 10 dias e sacrificados quando atingiram elevado nível de doença (** $P < 0,01$ quando comparados os grupos AIRmax e AIRmin; *** $P < 0,001$ quando comparados os grupos BALB/c e AIRmax, Teste de Log-Rank). O gráfico foi composto por dados de dois experimentos independentes.

Em dois experimentos independentes, com uma dose de 3×10^4 bactérias administradas por via nasal, observou-se que 100% dos camundongos BALB/c morreram entre 4 e 6 dias após o desafio, indicando que a diminuição de 10 vezes a quantidade de bactérias não altera significativamente a sobrevivência destes animais neste modelo. Além disso, 100% dos camundongos AIRmin morreram em até 7 dias após o desafio com a linhagem ATCC6303. Entretanto, apenas 36,4% dos camundongos da linhagem AIRmax sucumbiram a infecção nesta dose. A sobrevivência neste grupo foi significativamente maior quando comparada à sobrevivência dos camundongos BALB/c e AIRmin. Assim, nestas condições, foi possível verificar maior susceptibilidade dos camundongos AIRmin à infecção respiratória com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* quando comparados aos camundongos AIRmax.

A análise da perda de massa corpórea após o desafio com 3×10^4 bactérias da linhagem ATCC6303 é apresentada na Figura 7.

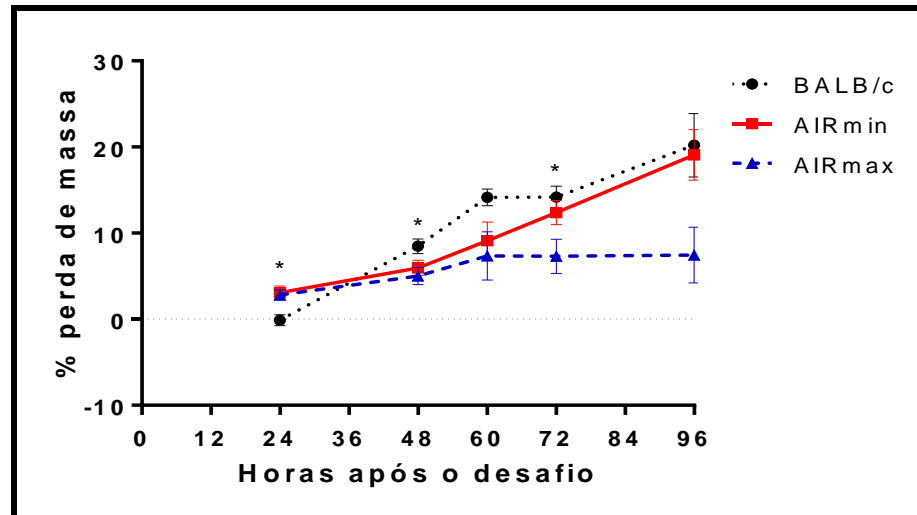


Figura 7 - Porcentagem de perda de massa após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^4 bactérias por animal. A massa dos animais foi medida diariamente. Os cálculos foram realizados partindo da massa inicial, anterior ao desafio, e foram realizados cálculos de porcentagem de perda de massa individual (Tempo 24 h após desafio * $P < 0,05$ quando comparados BALB/c com os grupos AIRmin e AIRmax; tempo 48 h após desafio * $P < 0,05$ quando comparados BALB/c com AIRmax; tempo 72 h após desafio * $P < 0,05$ quando comparados camundongos BALB/c com AIRmax, Teste de Mann Whitney). O gráfico foi composto por dados de dois experimentos independentes.

Em todos os tempos analisados após o desafio com 3×10^4 bactérias, foi observado que os camundongos AIRmax apresentaram perda de massa inferior aos camundongos AIRmin e BALB/c, apesar dos dados serem significativos somente em comparação aos camundongos BALB/c. No ponto de 96 h, onde a maior diferença foi observada, o número de camundongos BALB/c e AIRmin sobreviventes era muito baixo para a realização de análise estatística.

Os animais foram avaliados quanto ao estado geral mediante de uma a escala de doença (Figura 8).

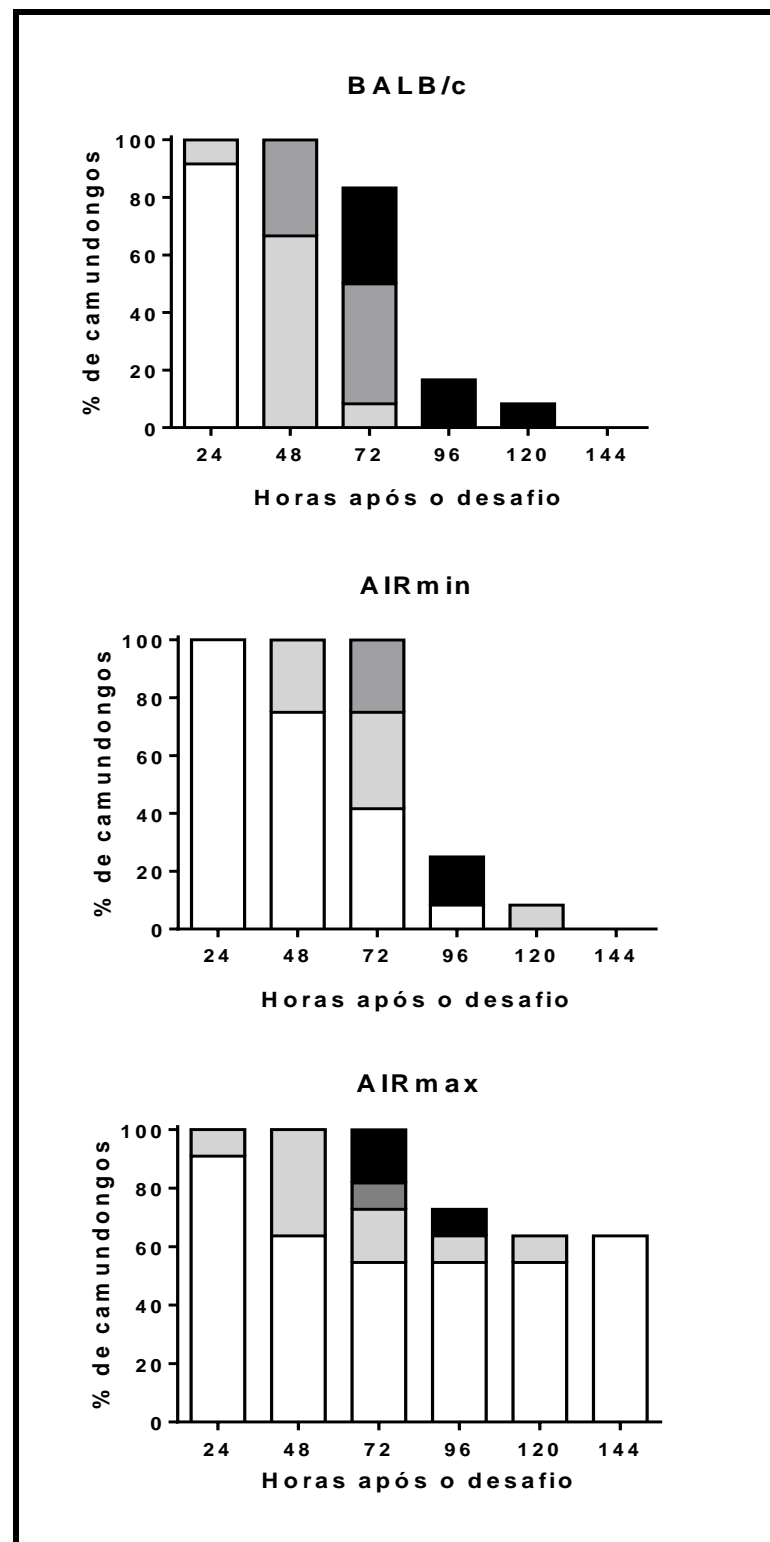


Figura 8 - Escala de doença após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^4 bactérias por animal. Os animais foram acompanhados diariamente em um período de 6 dias. A análise da escala de doença foi realizada em ordem crescente de intensidade de cor: saudável (branco), eriçado (cinza claro), encurvado (cinza médio), doente (cinza escuro) e parado (preto). Gráfico composto por dados de dois experimentos independentes. Número de animais por grupo: 12 animais nos grupos BALB/c e AIRmin e 11 animais no grupo AIRmax.

Como pode ser observado, há uma piora gradativa facilmente observada no estado de saúde dos camundongos BALB/c, que leva à morte dos animais. No caso dos camundongos AIRmin, a observação dos sintomas da doença não é sempre clara, sendo que os animais visualmente não apresentavam um comprometimento sério do estado de saúde e morriam em poucas horas. Esta observação é clara, por exemplo, entre os pontos de 72 h e 96 h após o desafio, para estes camundongos (Figura 8). No caso dos camundongos AIRmax, uma porcentagem pequena de camundongos apresenta os sintomas da doença e esta porcentagem morre após o desafio. Entretanto, grande parte dos animais permaneceu visualmente saudável após o desafio, sendo capaz de combater efetivamente a infecção.

Para confirmação das diferenças de susceptibilidade entre os camundongos AIRmin e AIRmax ao modelo de desafio invasivo, um novo desafio com a linhagem de pneumococo ATCC6303 foi realizado com uma dose 10 vezes inferior (3×10^3 bactérias por animal). A tabela 1 amostra a sobrevivência dos camundongos após o desafio com essa dose de bactérias.

Tabela 1 - Sobrevivência dos camundongos após desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^3 bactérias por animal. Os camundongos foram observados por 15 dias. Tabela composta por dados de dois experimentos independentes. Teste Exato de Fisher.

	Vivos/ Total	Sobrevivência	*valor de P
BALB/c	12/12	100%	--
AIRmin	11/12	91,67%	1
AIRmax	10/10	100%	1

Os resultados mostraram que praticamente todos os camundongos das 3 linhagens estudadas sobreviveram após a infecção com pneumococo, nestas condições. Apenas um camundongo da linhagem AIRmin morreu com a infecção. Assim, com a dose de 3×10^3 bactérias por animal, não houve diferença significativa entre as linhagens de camundongos estudadas com a relação a sobrevivência.

A avaliação da perda de massa corpórea neste experimento é mostrada na Figura 9.

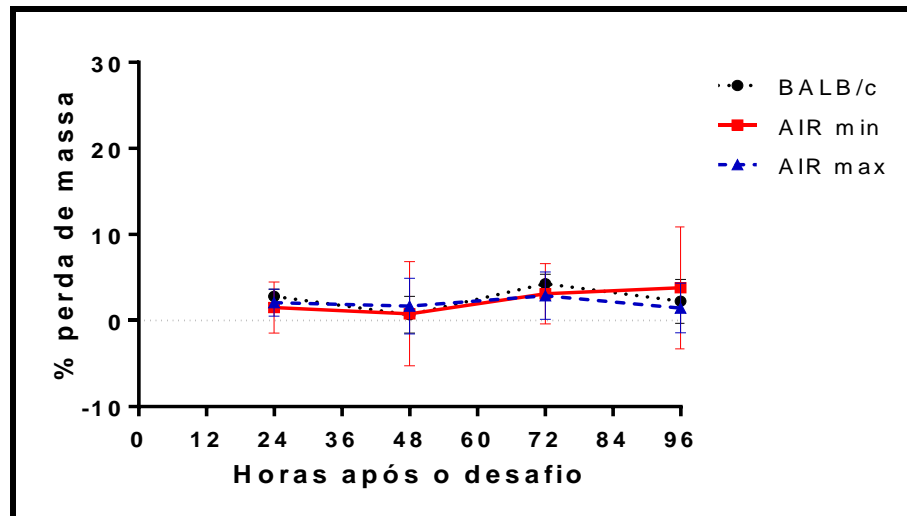


Figura 9 - Porcentagem de perda de massa após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^3 bactérias por animal. A massa foi medida diariamente. Os cálculos foram realizados partindo da massa inicial, anterior ao desafio, e foram realizados cálculos de porcentagem de perda de massa individual. Gráfico composto por dados de dois experimentos independentes.

Nesse ensaio foi possível observar que não houve diferença com relação à perda de massa das 3 linhagens de camundongos. Todos os animais permaneceram com a massa semelhante à registrada antes do desafio, indicando que esta dose de bactérias não é capaz de causar prejuízos significativos à saúde dos animais.

Ainda neste experimento foi realizada a recuperação das bactérias nos pulmões dos animais, 15 dias após a infecção com a linhagem ATCC6303 (Figura 10).

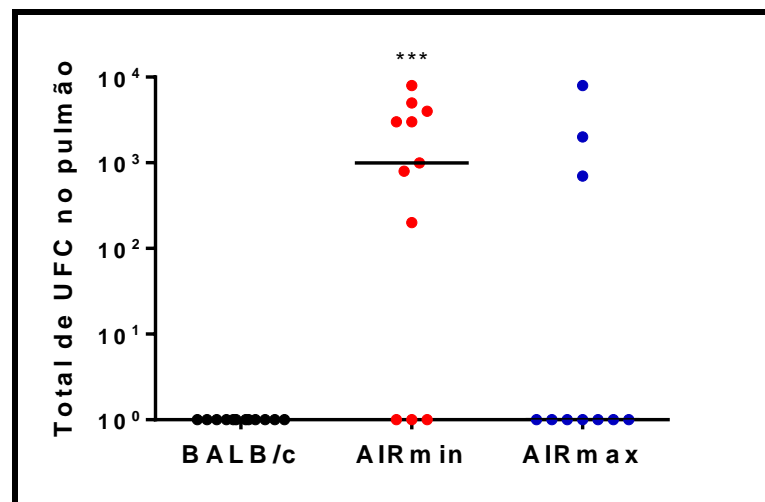


Figura 10 - Recuperação de bactérias dos pulmões dos camundongos após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^3 bactérias por animal. 15 dias após o desafio os camundongos foram sacrificados, os pulmões retirados, macerados e plaqueados em ágar sangue. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h para a contagem de UFC. Os pontos mostram resultados individuais e a linha mostra a mediana do grupo (***) $P < 0,001$ em relação aos camundongos BALB/c, Teste de Mann Whitney). O gráfico foi composto por dados de dois experimentos independentes. O limite mínimo de detecção da técnica é de 100 bactérias, sendo que 10^0 representa animais onde não foram recuperadas bactérias.

Com relação à recuperação das bactérias nos pulmões após o desafio com a linhagem ATCC6303 na dose de 3×10^3 , foi observado que os camundongos BALB/c, 15 dias após o desafio foram capazes de eliminar completamente as bactérias do trato respiratório. Por outro lado, alguns camundongos AIRmin e AIRmax ainda apresentavam bactérias no trato respiratório inferior, 15 dias após a infecção.

A comparação da carga de bactérias presente no trato respiratório dos camundongos mostrou que os camundongos AIRmin apresentam diferenças significativas apenas em relação aos camundongos BALB/c. Apesar de não serem observadas diferenças estatísticas significativas entre os camundongos AIRmin e AIRmax, deve-se ressaltar que a maioria dos camundongos AIRmin (8 de 11) apresentou bactérias no trato respiratório 15 dias após o desafio. Este resultado é inverso para os camundongos AIRmax, sendo que apenas 3 de 10 camundongos apresentaram bactérias neste ponto.

A escala de doença também foi registrada neste experimento (Figura 11).

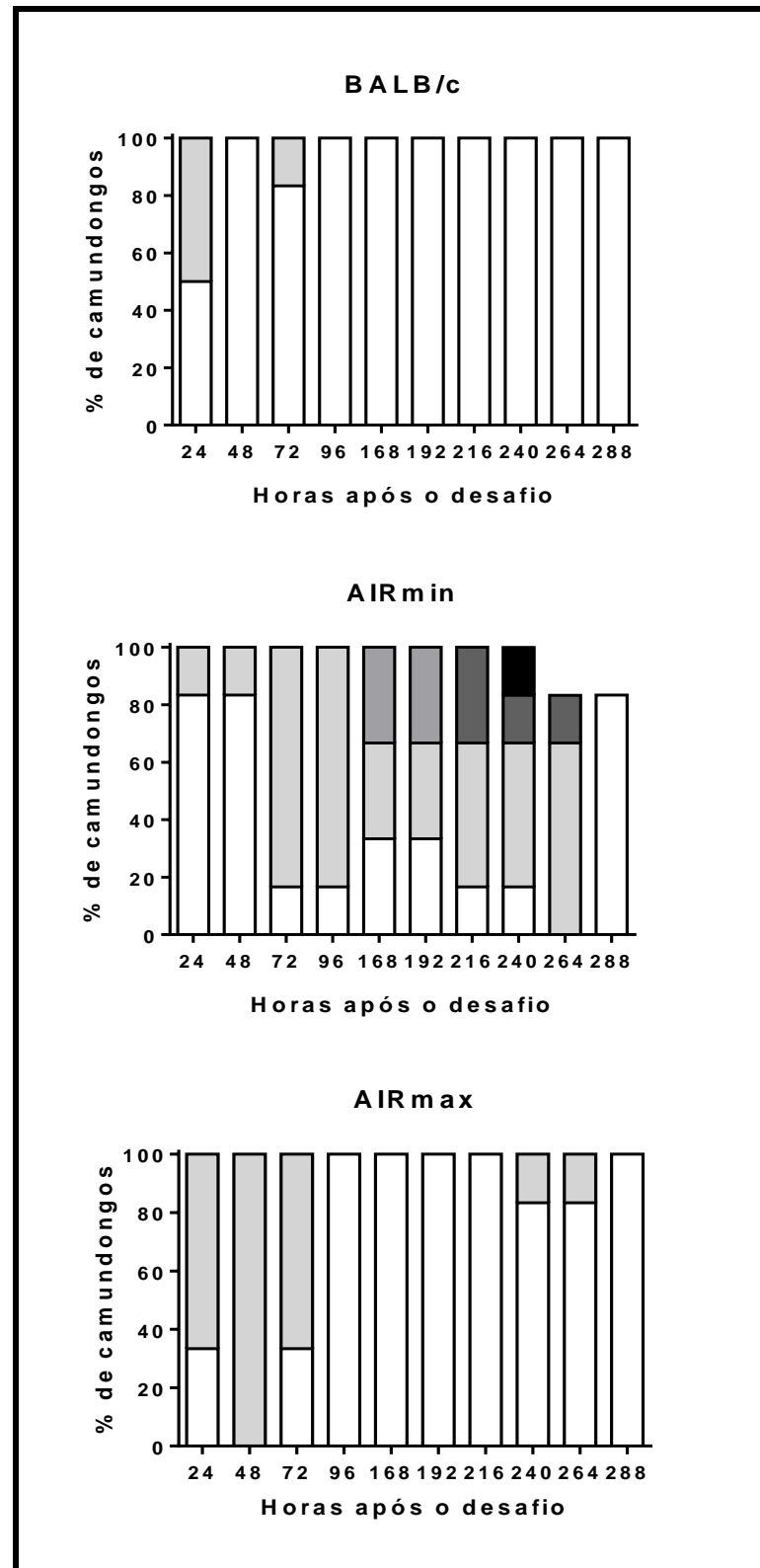


Figura 11 - Escala de doença após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^3 bactérias por animal. Os camundongos foram acompanhados diariamente em um período de 12 dias. A análise da escala de doença foi realizada em ordem crescente de intensidade de cor: saudável (branco), eriçado (cinza claro), encurvado (cinza médio), doente (cinza escuro) e parado (preto). Gráfico composto por dados de dois experimentos independentes.

Observa-se que a maioria dos camundongos AIRmin apresentou sintomas leves da doença e conseguiu controlá-la. Alguns camundongos apresentaram sintomas mais graves em tempos longos, sendo que um deles morreu antes de 15 dias. Alguns camundongos das linhagens BALB/c e AIRmax apresentaram sintomas leves no início da infecção, que foram melhorando gradativamente.

Com base nos resultados apresentados foi estabelecida a dose de 3×10^4 para o estudo da resposta imune inata nos camundongos AIRmax e AIRmin no modelo de infecção respiratória invasiva com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*, já que diferenças de susceptibilidade à infecção foram mais evidentes nesta condição.

4.1.1 Avaliação da resposta imune inata à infecção respiratória com a linhagem de pneumococo ATCC6303 em camundongos AIRmin e AIRmax

Um novo experimento foi realizado com a dose de desafio de 3×10^4 bactérias por animal. Os camundongos foram sacrificados nos tempos 6 h, 12 h e 48 h após o desafio e a carga bacteriana e o infiltrado celular no trato respiratório foram avaliados. A figura 12 mostra o número de bactérias recuperadas nos BALFs dos animais.

Em 6 h após o desafio, ambas as linhagens de camundongos apresentaram quantidades equivalentes de bactérias no BALF, ao redor de 10^4 UFC (Figura 12A). Em 12 h após o desafio foi possível observar um número significativamente menor de bactérias recuperadas nos BALFs dos camundongos AIRmax em comparação aos camundongos AIRmin (Figura 12B). Em 48 h após o desafio (Figura 12C), os camundongos AIRmin apresentaram níveis mais elevados de bactérias nos BALFs, com aproximadamente de 10^5 UFC recuperadas. Por outro lado, níveis significativamente inferiores de bactérias foram recuperadas dos BALFs dos camundongos AIRmax em relação aos camundongos AIRmin. Apesar dos níveis mais baixos, foram observados dados dispersos neste grupo. A heterogeneidade no grupo AIRmax está de acordo com o resultado de sobrevivência observado para estes animais com a dose de 3×10^4 bactérias por animal (Figura 6), onde parte do grupo sobrevive e parte sucumbe à infecção.

A carga bacteriana também foi avaliada em macerados dos pulmões dos camundongos (Figura 13).

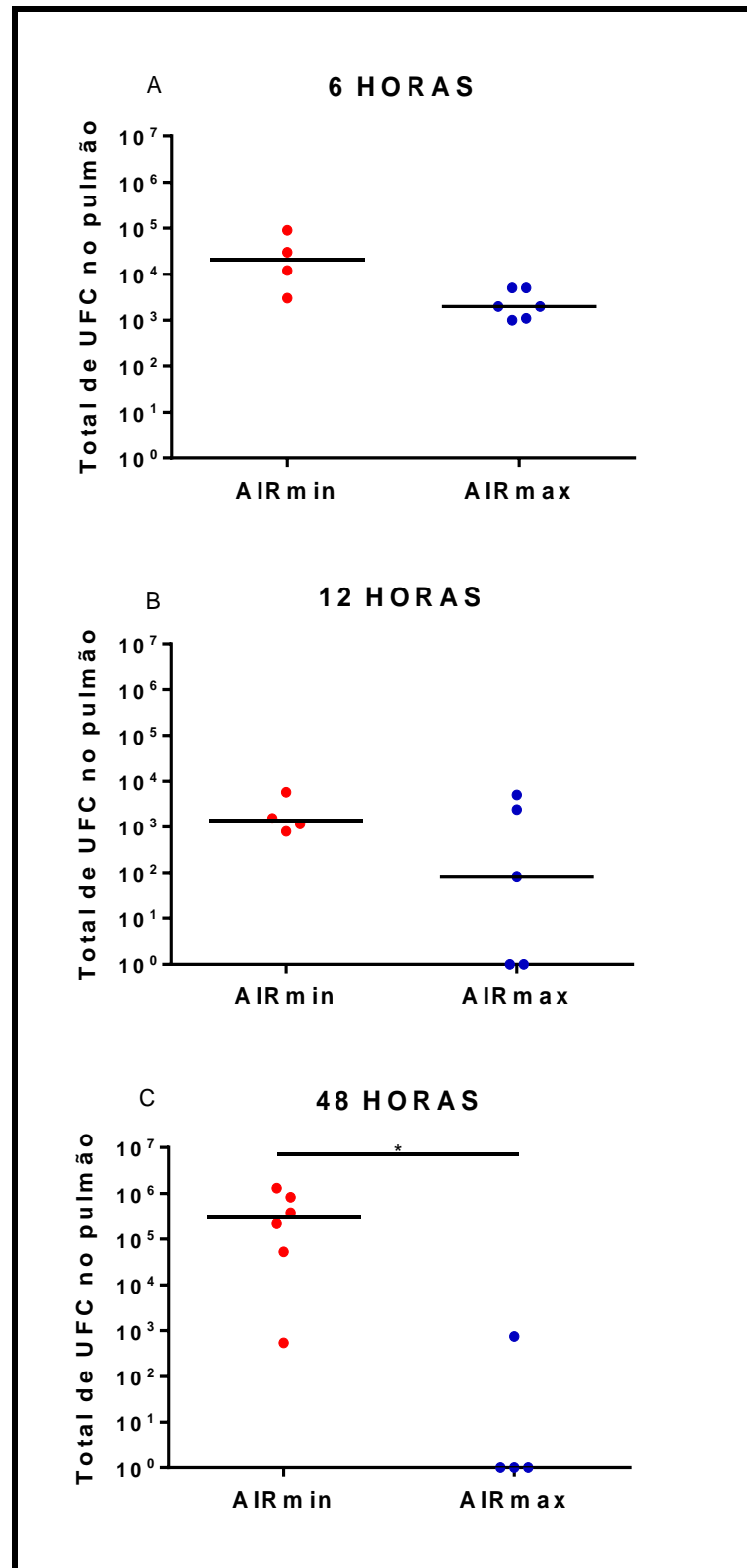


Figura 13 - Recuperação de bactérias dos pulmões 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Os pontos indicam os dados individuais e o traço indica a mediana dos grupos (*P<0,05; Teste de Mann Whitney). Dados representativos de dois experimentos independentes. Limite mínimo de detecção da técnica é de 100 bactérias, sendo que o valor 10⁰ representa animais onde não foram recuperadas bactérias.

Em 6 h após o desafio não foi possível observar diferença estatística na recuperação de bactérias dos pulmões dos camundongos AIRmin e AIRmax (Figura 13A). Da mesma forma, em 12 h após o desafio, não foram observadas diferenças estatísticas no número de bactérias recuperadas dos pulmões dos animais (Figura 13B). Entretanto, novamente os camundongos AIRmax apresentaram resultados bastante dispersos, sendo que a carga bacteriana foi abaixo do limite de detecção da técnica em dois animais desta linhagem. Em 48 h após o desafio foi possível observar números elevados de bactérias nos pulmões dos camundongos AIRmin, com alguns camundongos chegando a níveis entre 10^5 e 10^6 bactérias (Figura 13C). Níveis significativamente menores de bactérias foram observados nos pulmões dos camundongos AIRmax, quando comparados aos observados nos camundongos AIRmin. Novamente, há uma dispersão dos dados neste grupo, sendo que em 3 de 4 animais não foi possível recuperar bactérias neste ponto.

A recuperação de bactérias na corrente sanguínea 48 h após o desafio foi realizada, porém houve uma variação muito grande nos resultados obtidos em experimentos independentes (dados não mostrados).

A resposta imune inata foi estudada primeiramente pela avaliação dos tipos celulares infiltrados no BALF após o desafio, comparando as duas linhagens de camundongos. Para estes experimentos, considerando que uma porcentagem de animais da linhagem AIRmax não consegue controlar a infecção e não sobrevive ao desafio, optou-se por avaliar os dados no ponto de 48 h após o desafio, apenas dos animais desta linhagem que apresentavam carga bacteriana controlada no trato respiratório. Em todos os outros pontos após o desafio, todos os animais foram incluídos na análise.

A Figura 14 apresenta o total de células infiltradas no BALF após o desafio por pneumococo nos camundongos AIRmax e AIRmin.

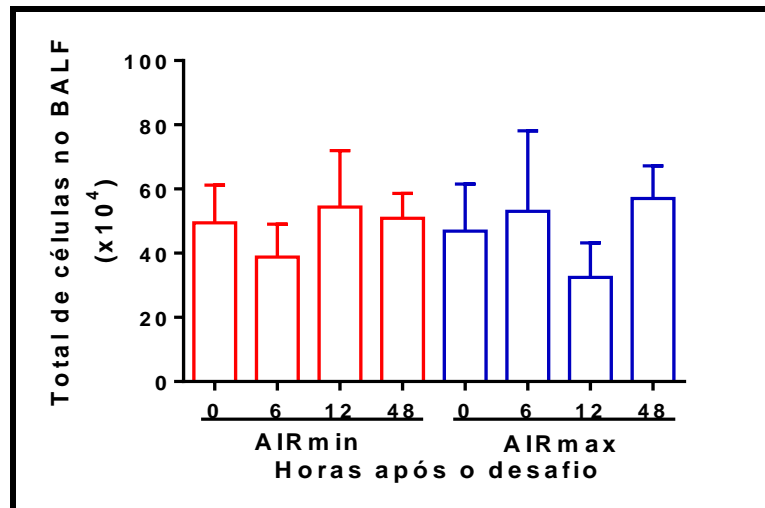


Figura 14 - Número total de células nos BALFs dos camundongos (4 a 6 animais por grupo) antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer em duplicata. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Foi possível observar na Figura 14 que a quantidade de células coletadas no BALF dos camundongos AIRmax e AIRmin não variou significativamente ao longo do desafio. Ambas as linhagens de camundongos também apresentaram números equivalentes de células no BALF antes do desafio.

Para a caracterização das diferentes populações celulares, inicialmente, foi utilizada a contagem diferencial pela técnica de cytopspin, onde foram identificados macrófagos (população mais abundante antes do desafio), neutrófilos (população mais abundante em 12 h após o desafio) e poucos linfócitos (dados não mostrados). Posteriormente, para a melhor caracterização dos tipos celulares e identificação de subpopulações, optou-se pela técnica de citometria de fluxo com utilização de anticorpos para marcação celular. A Figura 15 (A) mostra a estratégia de análise da população de neutrófilos (F4/80⁺CD11b⁺LY6G⁺) e a figura 15 (B) mostra os números de neutrófilos recuperados antes e nos diferentes pontos após o desafio, resultantes das análises de citometria.

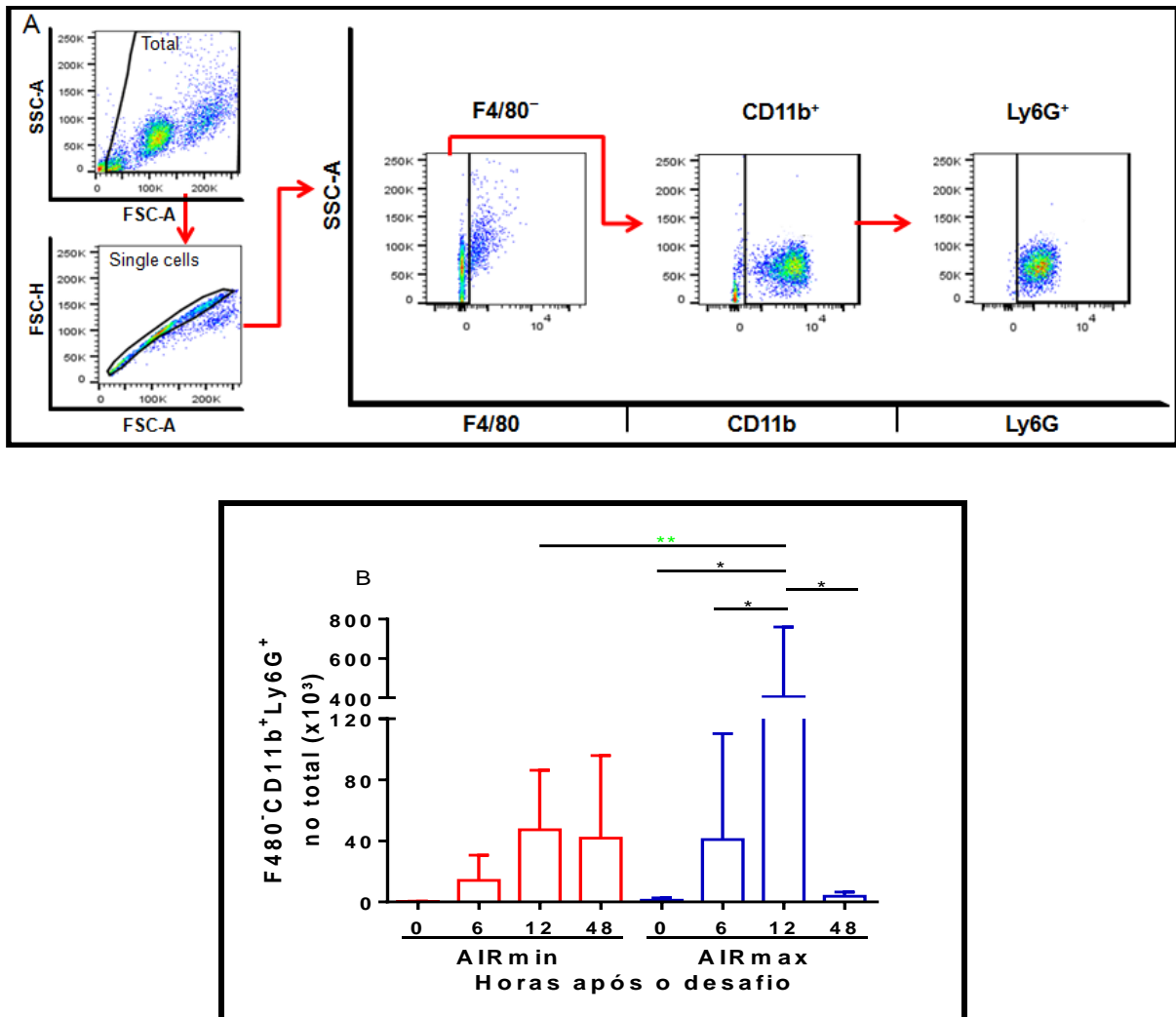
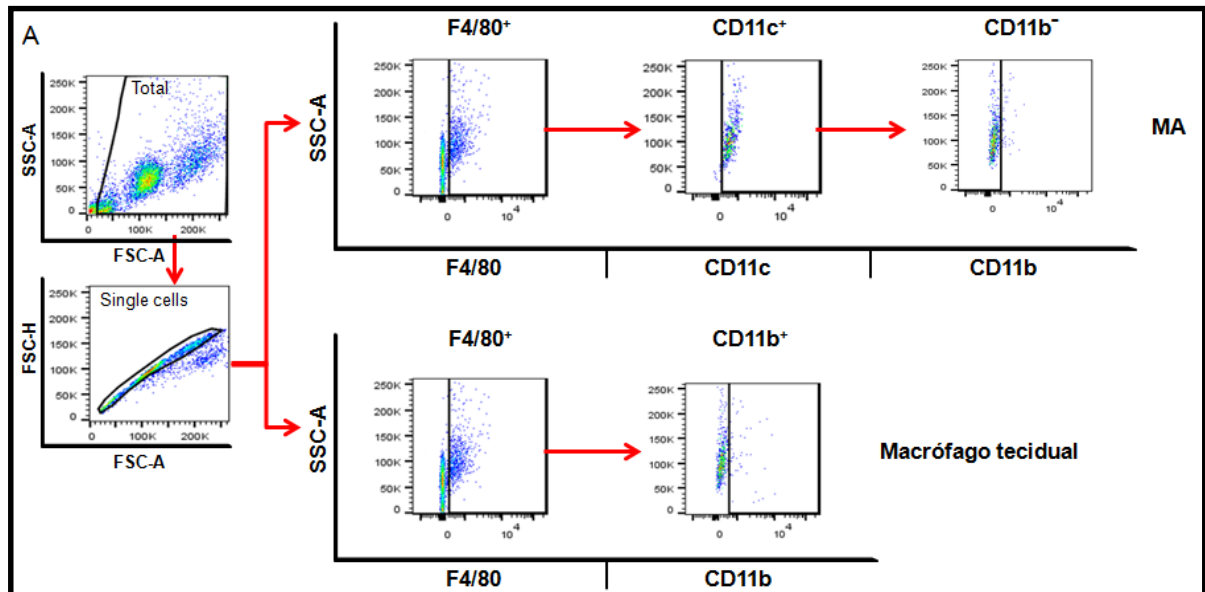


Figura 15 - Estratégia de análise (A) e número total de neutrófilos nos BALFs dos camundongos (4 a 6 animais por grupo) antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* (B). Os neutrófilos foram detectados pela marcação F4/80⁻ CD11b⁺ Ly6G⁺, pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias dos números de neutrófilos no total de células para cada grupo com os desvios padrão (*P<0,05; **P<0,01; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Nas duas linhagens de camundongos foi possível observar o aumento de neutrófilos recuperados no BALF após o desafio. Nos camundongos AIRmax, os neutrófilos foram detectados a partir de 6 h após o desafio. Em 12 h após o desafio, foi possível observar níveis significativamente mais altos de neutrófilos quando comparados aos níveis basais. Este influxo foi controlado em 48 h após o desafio. Por outro lado, na linhagem AIRmin foi possível observar um aumento de influxo de neutrófilos em 6 h após o desafio. Apesar de não ser significativo em relação aos níveis basais, o influxo foi crescente ao longo do tempo. Pode-se observar também que os níveis de neutrófilos observados em 12 h após o desafio foram significativamente maiores nos camundongos AIRmax em relação aos níveis observados nos camundongos AIRmin.

A Figura 16 (A) mostra a estratégia de análise referente os números de macrófagos alveolares (MA, $F4/80^+CD11c^+CD11b^-$) e macrófagos teciduais ($F4/80^+CD11b^+$) e a figuras 16 (B) e (C) mostram os números de macrófagos alveolares (MA, $F4/80^+CD11c^+CD11b^-$) e macrófagos teciduais ($F4/80^+CD11b^+$) recuperados antes e nos diferentes pontos após o desafio.



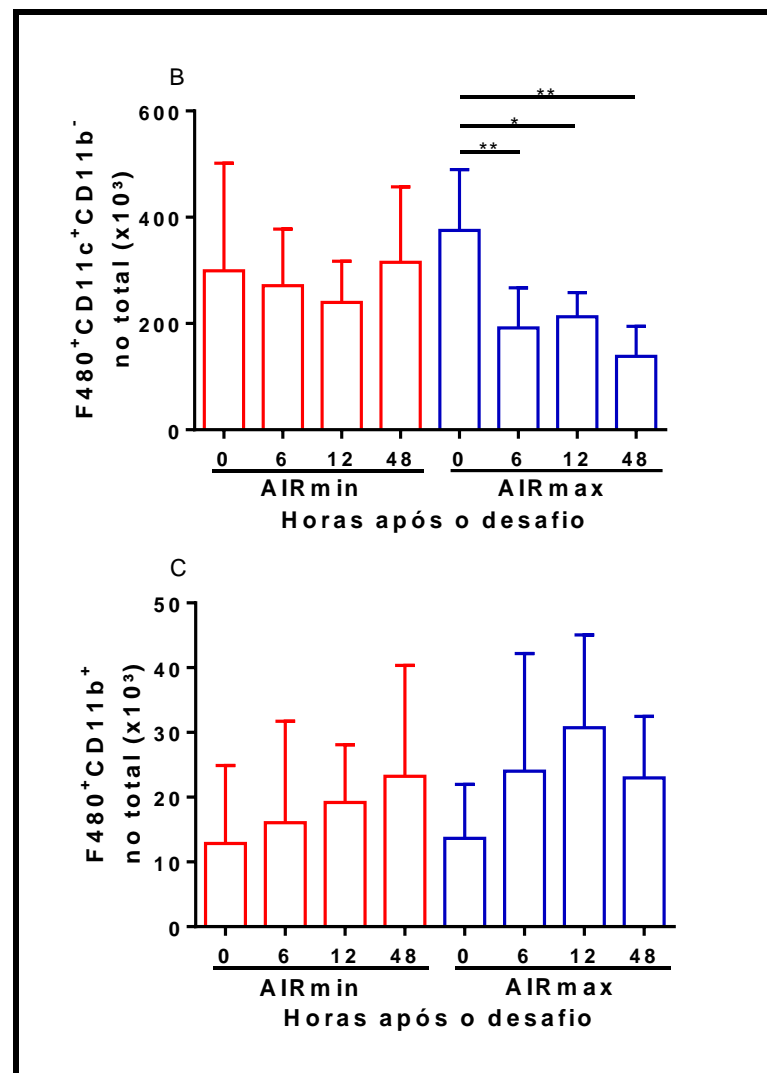


Figura 16 - Estratégia de análise (A) e número total de macrófagos nos BALFs dos camundongos (4 a 6 animais por grupo) antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* (B) e (C). Os macrófagos alveolares (MA) foram detectados pela marcação F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻ (B) e os macrófagos teciduais foram detectados pela marcação F4/80⁺CD11b⁺ (C), pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias dos números de macrófagos no total de células para cada grupo com os desvios padrão (*P<0,05; **P<0,01; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

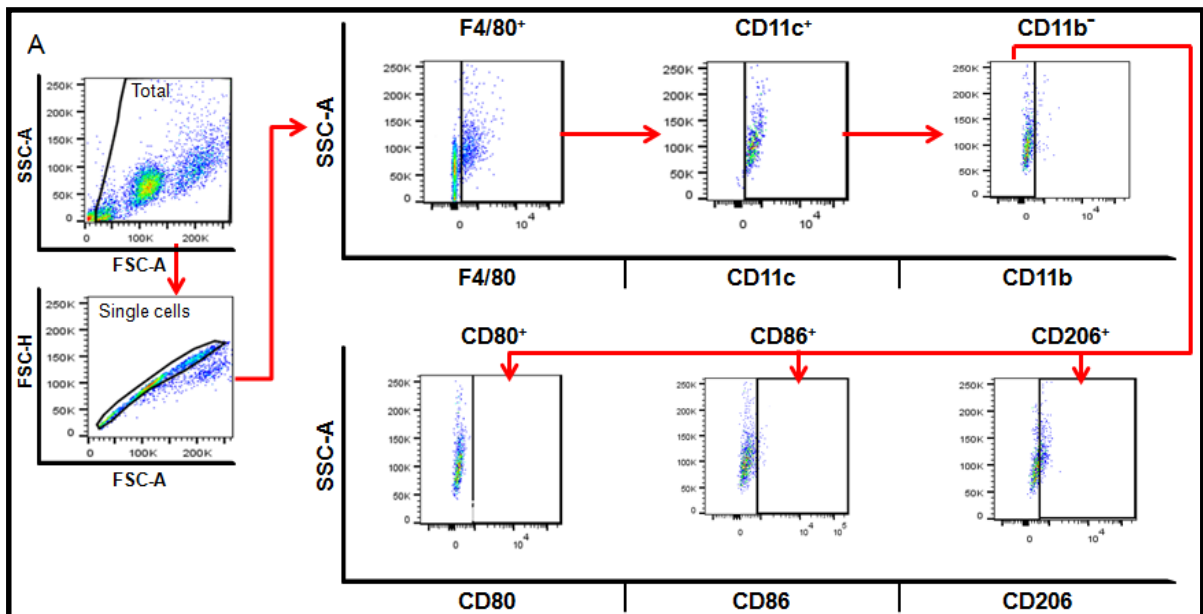
Foi possível observar uma redução no número de MA em 6 h após o desafio nos camundongos da linhagem AIRmax. O número destas células se manteve abaixo dos níveis basais até 48 h após o desafio. Por outro lado, não houve alteração nos níveis de macrófagos alveolares observados nos camundongos AIRmin após o desafio (Figura 16A).

Não foram observadas diferenças significativas nos números de macrófagos teciduais nos camundongos AIRmax e AIRmin, após o desafio com pneumococo (Figura 16B).

Os MA presentes em ambas às linhagens de camundongos foram caracterizados quanto à expressão de alguns receptores e moléculas co-

estimulatórias presentes na superfície. A expressão de CD206 é associada a macrófagos do tipo M2 (também conhecidos como quiescentes ou não inflamatórios) que estão relacionados com a secreção de citocinas do tipo Th2 como IL-13, IL-4 e IL-10 (Benoit; Desnues; Mege, 2008). As moléculas co-estimulatórias CD80⁺ e CD86⁺ são expressas por diferentes células apresentadoras de antígeno e participam na sinalização aos linfócitos T por intermédio dos receptores de superfície CD28 e CD152 (Sansom; Manzotti; Zheng, 2003).

A Figura 17 (A) mostra as estratégias de análise e as figuras 17 (B), (C) e (D) mostram número total de MA expressando as moléculas co-estimulatórias CD80 ou CD86 ou o receptor de manose CD206 respectivamente, antes e após o desafio com a linhagem de pneumococo ATCC6303.



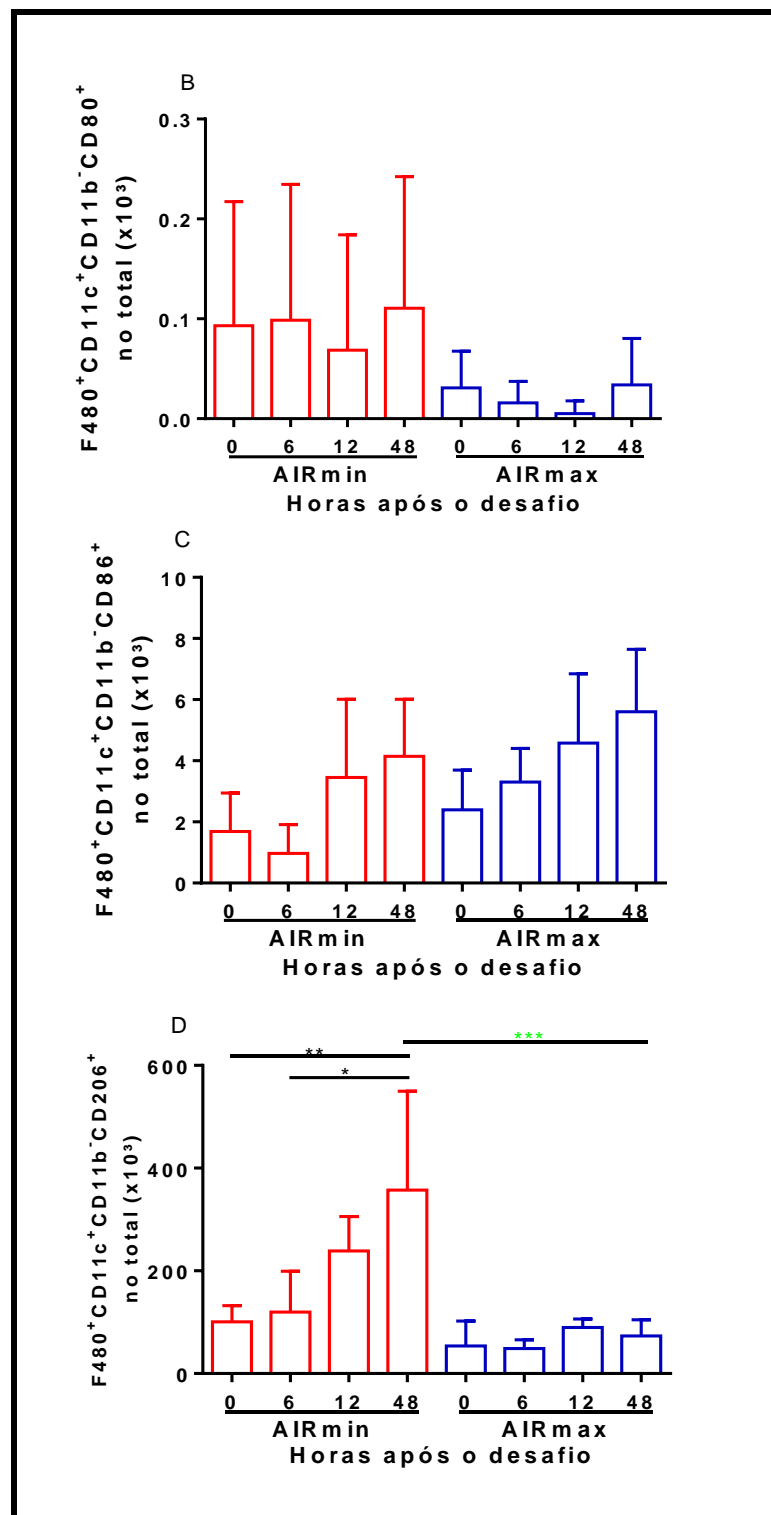


Figura 17 - Estratégia de análise (A) e número total de MA expressando CD80, CD86 ou CD206 nos BALFs dos camundongos (4 a 6 animais por grupo) antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* (B), (C) e (D). As populações foram detectadas pela marcação F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD80⁺ (B), F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD86⁺ (C) ou F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD206⁺ (D), pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias dos números de MA expressando as moléculas co-estimulatórias ou o receptor de manose no total de células para cada grupo com os desvios padrão (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Na Figura 17 (A) foi possível observar que não houve diferença significativa no número de MA expressando CD80 (F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD80⁺) ao longo do desafio, nos camundongos AIRmax e AIRmin. A avaliação do número de macrófagos alveolares expressando CD86 (F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD86⁺) mostra uma tendência de aumento após o desafio com pneumococo, tanto nos camundongos AIRmax como nos camundongos AIRmin (Figura 17B). Entretanto, este aumento progressivo não foi significativo.

Em todos os pontos analisados, os números de MA expressando CD206 (F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD206⁺) foram mais elevados nos camundongos AIRmin em comparação aos números observados nos camundongos AIRmax, embora sem diferença significativa na maioria dos pontos. Nos camundongos AIRmin, o número de MA expressando CD206 aumenta significativamente após o desafio, enquanto que nos camundongos AIRmax não foram observadas alterações nos níveis destas células. Em 48 h após o desafio, o número de macrófagos alveolares CD206⁺ foi significativamente mais alto nos camundongos AIRmin quando comparado com os camundongos AIRmax (Figura 17C).

Para uma melhor compreensão do balanço das subpopulações de MA, após o desafio com pneumococo, decidiu-se avaliar a porcentagem de cada uma destas células dentro do total de MA (Figura 18).

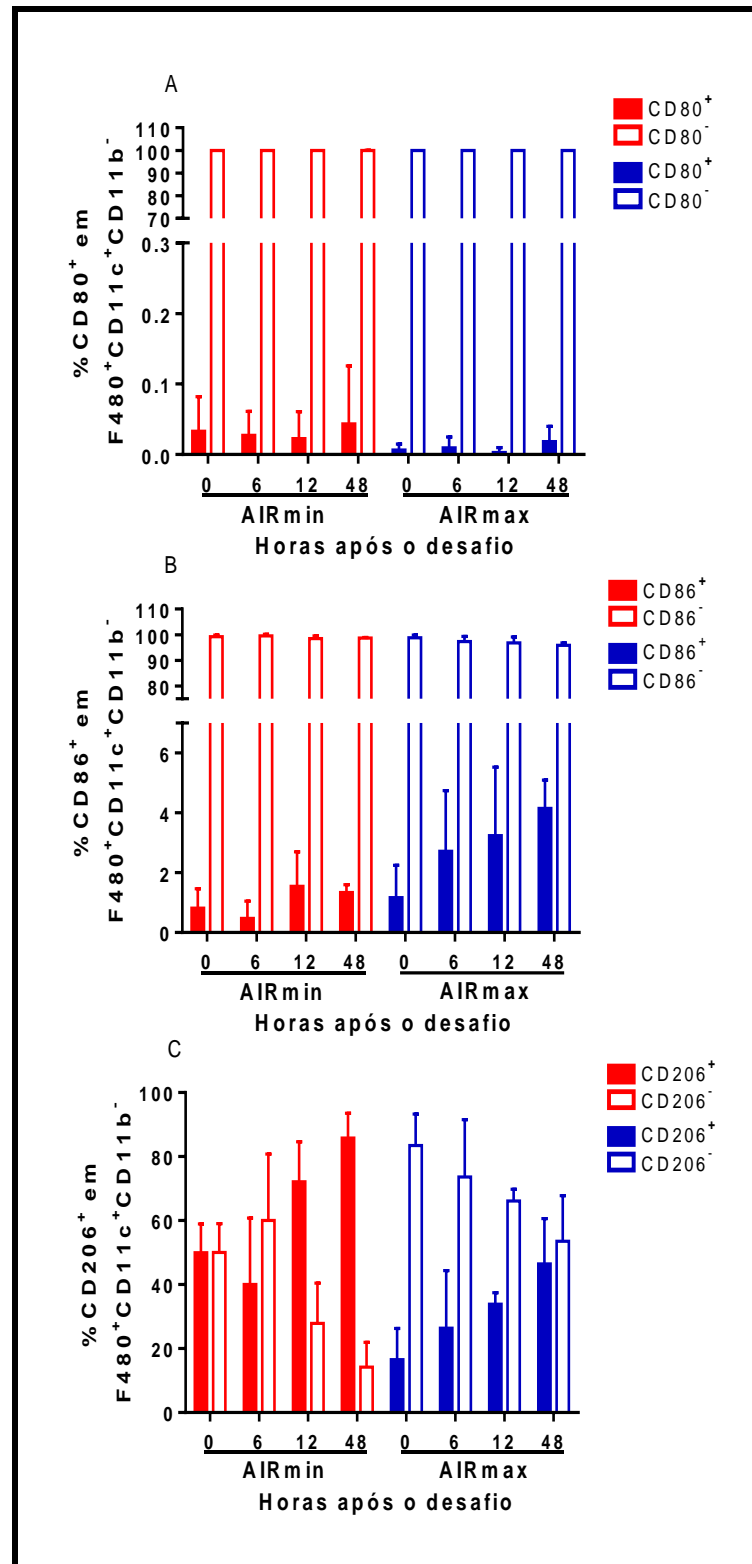


Figura 18 - Porcentagem de MA expressando ou não expressando CD80, CD86 ou CD206 dentro do total de MA nos BALFs dos camundongos (4 a 6 animais por grupo) antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. As populações foram detectadas pela marcação F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD80⁺ (A), F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD86⁺ (B) ou F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD206⁺ (C), pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias das porcentagens de células positivas para cada marcação no total de MA com os desvios padrão.

Uma porcentagem inferior a 0,1% de MA expressando CD80 (F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD80⁺) foi observada nos camundongos AIRmax e AIRmin, e esta se manteve estável em ambas as linhagens de camundongos após o desafio. Porém, os MA que não expressam CD80 são a maioria desta população em ambas as linhagens de camundongos (Figura 18A).

Foi possível observar um leve aumento na porcentagem de MA expressando CD86 (F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD86⁺), principalmente nos camundongos AIRmax após o desafio. Porém, os MA que não expressam CD86 também são a maioria desta população em ambas as linhagens de camundongos (Figura 18B).

A avaliação das subpopulações positivas ou negativas para CD206 mostrou diferenças entre as duas linhagens de camundongos. Os camundongos AIRmin apresentam aproximadamente 50% de MA positivos ou negativos para CD206 antes do desafio. Nestas condições, os camundongos AIRmax apresentam ao redor de 20% de MA positivos para CD206 e 80% negativos para esta molécula. Em ambas as linhagens de camundongos, a porcentagem de MA CD206⁺ aumenta ao longo do desafio. Entretanto, este aumento é bastante pronunciado nos camundongos AIRmin, e, a partir de 12 h após o desafio, estas células já correspondem à maioria da subpopulação de MA (ao redor de 72% em 12 h e ao redor de 85% em 48 h). Apesar de também aumentar ao longo do desafio, a subpopulação MA CD206⁺ nos camundongos AIRmax chega a apenas 46% do total de MA em 48 h (Figura 18C).

Uma terceira análise nestas subpopulações foi realizada pela mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de CD80, CD86 ou CD206, considerando, portanto os níveis de expressão destas moléculas (Figura 19).

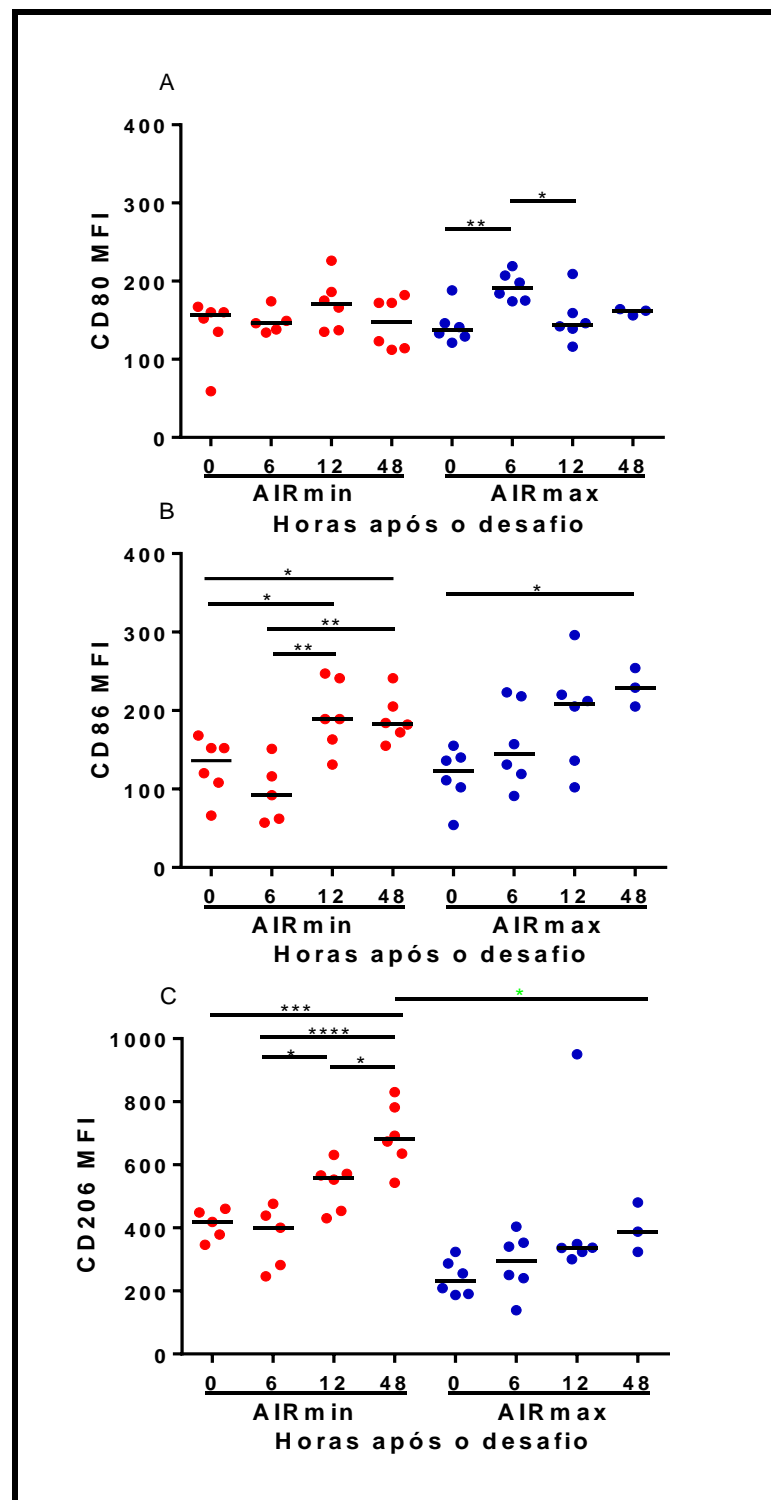


Figura 19 - Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CD80, CD86 ou CD206 dos MA nos BALFs dos camundongos antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. A mediana da intensidade de fluorescência de CD80, CD86 ou CD206 foi calculada para os MA, usando o software FlowJo. Os pontos indicam os resultados individuais e os traços indicam as medianas de cada grupo (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

A expressão de CD80 permaneceu inalterada nos MA dos camundongos AIRmin em todos os pontos analisados. Por outro lado, a expressão de CD80 aumentou nos MA dos camundongos AIRmax em 6 h após o desafio, retornando aos níveis basais em 12 h (Figura 19A). Assim, apesar de não ter sido observado aumento no número de MA CD80⁺ (Figura 17A) a expressão desta molécula foi aumentada nos MA presentes no BALF dos camundongos AIRmax em 6 h após o desafio.

Um aumento significativo na expressão de CD86 pelos MA de ambas as linhagens de camundongos foi observado após o desafio. Na linhagem AIRmin um aumento significativo foi observado em 12 h e 48 h quando comparado com a expressão basal, e também quando comparado com a expressão em 6 h após o desafio. Na linhagem AIRmax um aumento significativo foi observado em 48 h após o desafio quando comparado com os níveis basais de expressão (Figura 19B). O aumento da expressão de CD86 nos MA após o desafio acompanhou o aumento no número de MA CD86⁺ (Figura 17B).

Foi possível observar um aumento progressivo e significativo na expressão CD206 na superfície dos MA dos camundongos AIRmin. Por outro lado, nos camundongos AIRmax não foram observadas diferenças na expressão de CD206 na superfície dos MA. Em 48 h após o desafio, a expressão de CD206 foi significativamente mais elevada nos MA dos camundongos AIRmin quando comparada aos camundongos AIRmax (Figura 19C). A expressão de CD206 nos MA após o desafio acompanhou as variações observadas no número de MA CD206⁺ para as duas linhagens de camundongos (Figura 17C).

A Figura 20 (A) mostra a estratégia de análise e a figura 20 (B) os números de linfócitos B (F4/80⁻ B220⁺) recuperados antes e nos diferentes pontos após o desafio.

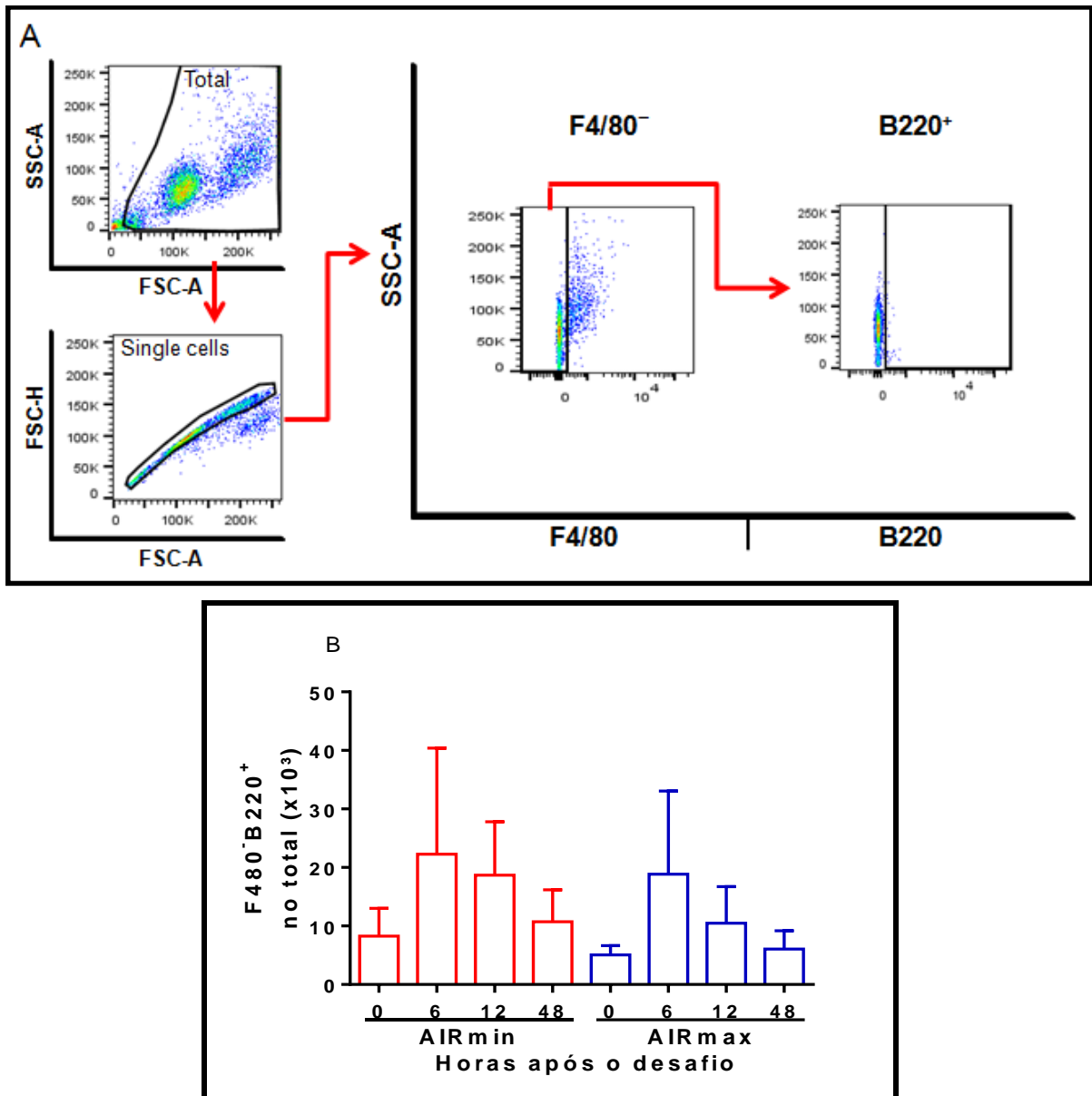


Figura 20 - Estratégia de análise (A) e número total de linfócitos B nos BALFs dos camundongos (4 a 6 animais por grupo) antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae* (B). Os linfócitos B foram detectados pela marcação F4/80⁻B220⁺, pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias dos números de linfócitos no total de células para cada grupo com os desvios padrão.

Em ambas as linhagens de camundongos, os resultados foram bastante semelhantes, sem diferenças estatísticas no número de linfócitos B detectados em todos os pontos analisados. Ambas as linhagem de camundongos apresentaram uma flutuação no número de linfócitos recuperados, aumentando levemente em 6 h após o desafio e retornando ao basal em 48 h.

Em continuação ao estudo da resposta imune inata frente ao desafio respiratório invasivo com pneumococo nestes camundongos, foram feitas análises de diferentes citocinas e quimiocinas nas amostras de BALF após o desafio. Inicialmente foi utilizada a técnica de ELISA (dados não mostrados). Entretanto, um dos objetivos deste projeto era o estabelecimento da técnica de luminex no laboratório. Esta técnica apresenta sensibilidade superior e maior abrangência em relação à técnica de ELISA, já que um número grande de moléculas pode ser avaliado em uma mesma amostra.

As seguintes citocinas e quimiocinas foram avaliadas: IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, CXCL2, CXCL3, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5.

A Figura 21 mostra a secreção das citocinas pró-inflamatórias interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) nos BALFs dos camundongos AIRmin e AIRmax.

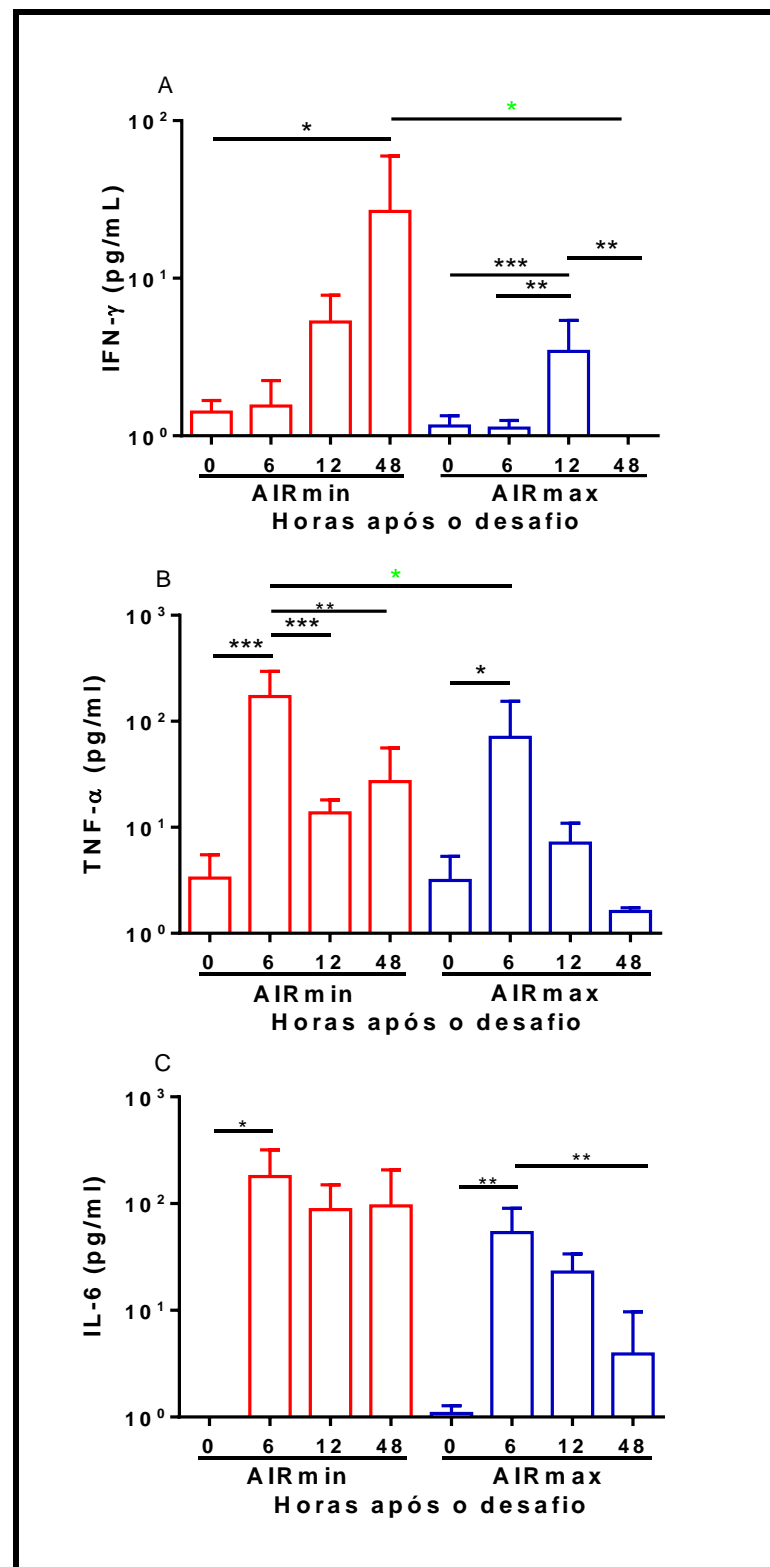


Figura 21 - Secreção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Amostras de BALF foram coletadas antes e em diferentes tempos após o desafio intranasal. As células foram removidas por centrifugação e as citocinas foram quantificadas pelo kit de Luminex. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey). Os valores em 10^0 indicam resultados abaixo do nível de detecção indicado pelo fabricante.

Com relação à secreção de IFN- γ , um aumento gradativo foi observado nos camundongos da linhagem AIRmin, com máximo de secreção em 48 h após o desafio. Por outro lado, um aumento significativo de secreção de IFN- γ foi observado em 12 h nos camundongos da linhagem. Em 48 h após o desafio, os níveis de secreção de IFN- γ foram significativamente mais altos nos camundongos AIRmin, em relação aos observados nos camundongos AIRmax (Figura 21A).

A secreção de TNF- α nos BALFs foi induzida após o desafio em ambas às linhagens de camundongos, com picos de secreção em 6 h após o desafio. Porém, nos camundongos AIRmin, os níveis de secreção de TNF- α neste ponto foi significativamente maior em comparação aos camundongos AIRmax. Após o pico em 6 h, observou-se uma queda na secreção desta citocina em ambas as linhagens de camundongos. Apesar da queda na secreção de TNF- α ser significativa nos camundongos AIRmin em 12 h e 48 h após o desafio, os níveis ainda permaneceram um pouco acima do nível de secreção basal. Nos camundongos AIRmax, a secreção de TNF- α retornou ao nível basal em 48 h após o desafio (Figura 21B).

Um aumento significativo foi observado no ponto de 6 h em ambas as linhagens de camundongos para a secreção de IL-6. A linhagem AIRmin permaneceu com níveis elevados de secreção desta citocina até o ponto de 48 h. Por outro lado, a linhagem AIRmax retornou a níveis próximos do basal em 48 h após o desafio (Figura 21C).

A Figura 22, mostra a secreção de citocinas relacionadas com a resposta Th2 interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5) e da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) nos BALFs dos camundongos AIRmin e AIRmax.

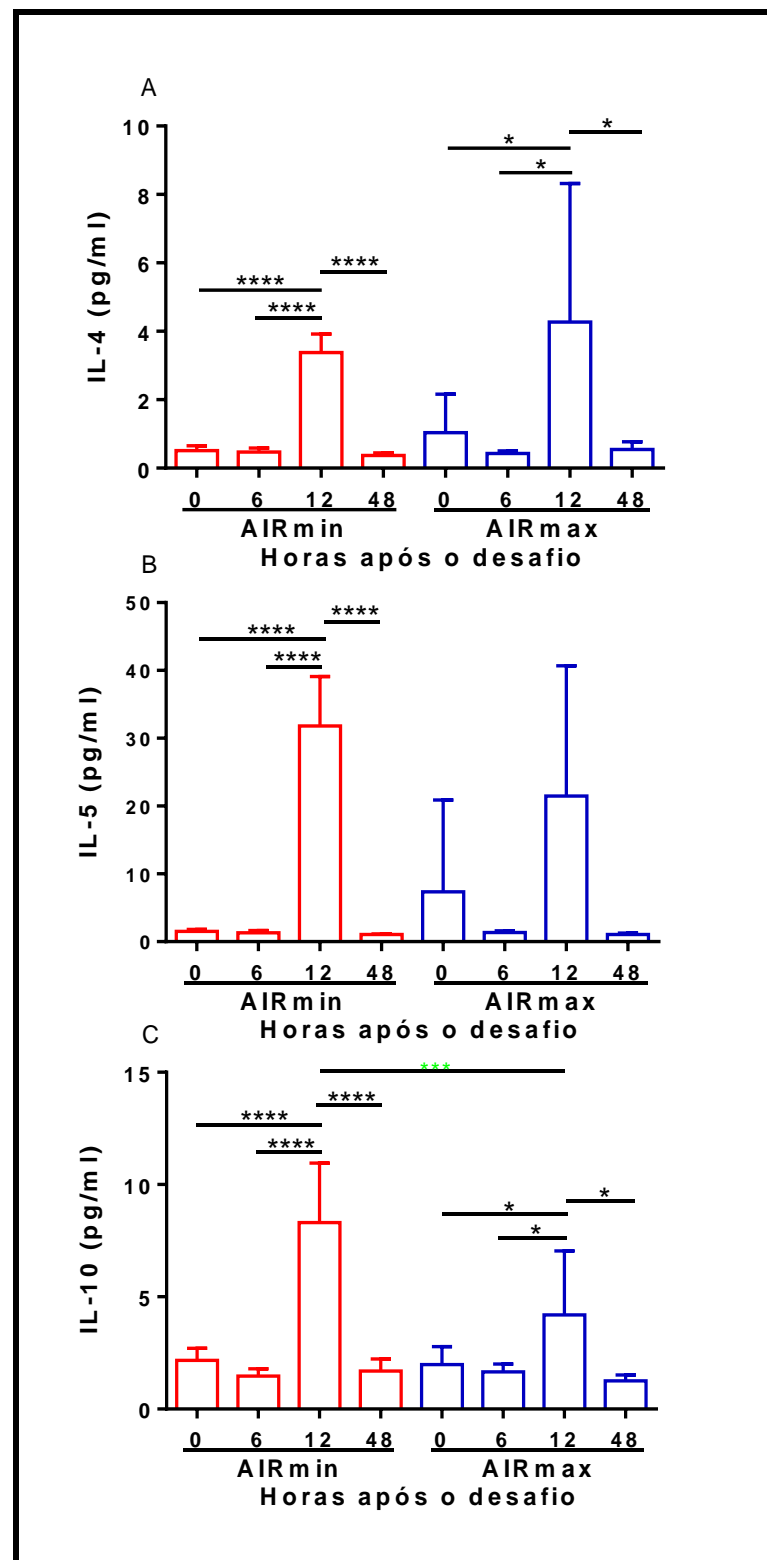


Figura 22 - Secreção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 do *S. pneumoniae*. Amostras de BALF foram coletadas antes e em diferentes tempos após o desafio intranasal. As células foram removidas por centrifugação e as citocinas foram quantificadas pelo kit de Luminex. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$, Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Com relação à citocina IL-4, foi observado um pico de secreção em ambas as linhagens de camundongos em 12 h após o desafio. Contudo, esta indução foi mais

homogênea na linhagem AIRmin, com todos os camundongos apresentando concentrações semelhantes de IL-4. Por outro lado, apesar de aumentar significativamente em relação aos níveis basais, a secreção de IL-4 foi variável nos camundongos AIRmax. Em 48 h, a secreção de IL-4 nos BALFs das duas linhagens de camundongos retornou aos níveis basais (Figura 22A).

Foram observados picos de secreção de IL-5 em ambas as linhagens de camundongos em 12 h após o desafio. Da mesma forma que para IL-4, o pico foi mais homogêneo nos camundongos AIRmin com diferença estatística em relação a todos os pontos avaliados. Apesar do aumento em 12 h, houve variação grande entre os níveis de IL-5 observados nos camundongos AIRmax e não houve diferença estatística. Em 48 h, a secreção de IL-5 retornou aos níveis basais em ambas as linhagens de camundongos (Figura 22B).

Com relação à citocina anti-inflamatória IL-10, também foram observados picos de secreção em 12 h após o desafio em ambas as linhagens de camundongos. Porém, o pico de secreção foi significativamente maior nos camundongos AIRmin quando comparado ao observado na linhagem AIRmax. Em 48 h após o desafio, os níveis de IL-10 retornaram aos níveis basais nas duas linhagens de camundongos (Figura 22C).

A secreção de interleucina 17 (IL-17) uma citocina relacionada à proteção contra colonização por pneumococo e do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) são mostrados na Figura 23 (A) e (B), respectivamente.

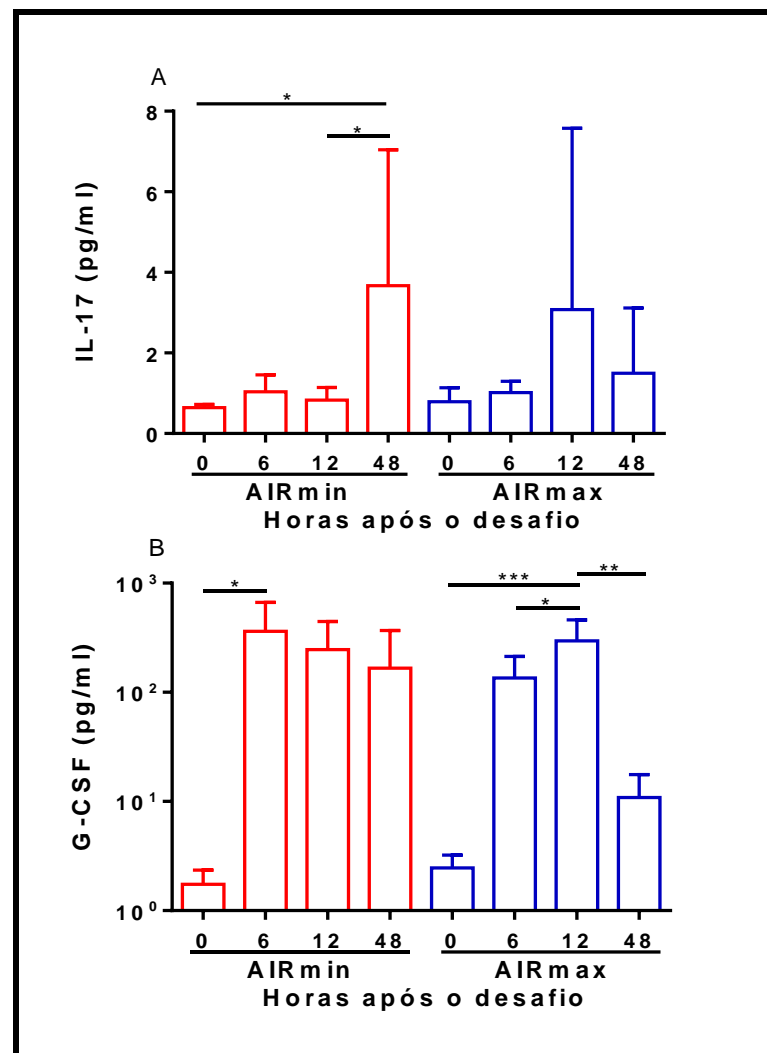


Figura 23 - Secreção de citocinas IL-17 e G-CSF nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 do *S. pneumoniae*. Amostras de BALF foram coletadas antes e em diferentes tempos após o desafio intranasal. As células foram removidas por centrifugação e as citocinas foram quantificadas pelo kit de Luminex. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Um aumento significativo de secreção de IL-17 no BALF dos camundongos AIRmin foi observado em 48 h após o desafio, apesar da variação entre os animais. Por outro lado, apenas um camundongo AIRmax apresentou aumento na secreção de IL-17 em 12 h após o desafio, resultando em comparação não significativa em relação aos níveis basais de secreção (Figura 23A).

Foi possível observar um aumento na secreção de G-CSF em 6 h após o desafio em ambas às linhagens de camundongos. Entretanto, enquanto os níveis de G-CSF se mantiveram altos nos BALFs dos camundongos AIRmin, uma redução significativa foi observada nos camundongos AIRmax em 48 h após o desafio (Figura 23B).

As citocinas interleucina-1 α e β (IL-1 α e IL-1 β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-9 (IL-9), interleucina-12 (IL-12, p40 e p70) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) também foram avaliadas, mas não foram encontradas diferenças entre os grupos. As interleucinas IL-7, IL-13 e IL-15 não foram detectadas nas condições estudadas (dados não mostrados).

Além da secreção de citocinas, o perfil de secreção de algumas quimiocinas relacionadas ao recrutamento de leucócitos foi avaliado nos camundongos AIRmin e AIRmax (Figura 24).

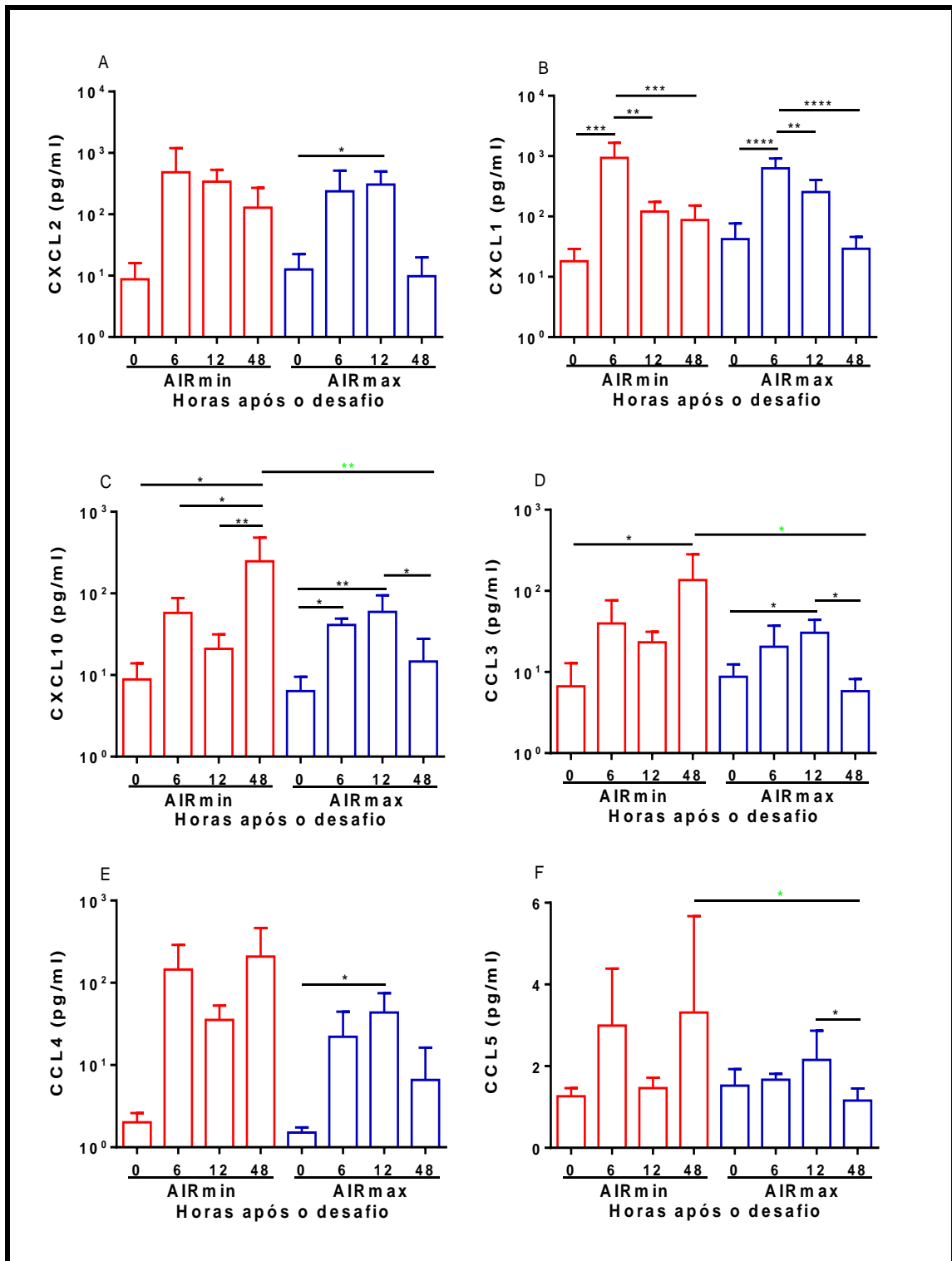


Figura 24 - Secreção de quimiocinas CXCL2, CXCL3, CXCL10, CCL3, CCL4 e CCL5 nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 do *S. pneumoniae*. Amostras de BALF foram coletadas antes e em diferentes tempos após o desafio intranasal. As células foram removidas por centrifugação e as quimiocinas foram quantificadas pelo kit de Luminex. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

A secreção da quimiocina CXCL2, um aumento não significativo foi observado em 6 h nos camundongos AIRmin e os níveis se mantiveram nos tempos seguintes. Por outro lado, um pico significativo foi observado em 12 h nos camundongos AIRmax, retornando aos níveis basais em 48 h (Figura 24A).

A secreção da quimiocina CXCL1 foi semelhante em ambas às linhagens de camundongos, com picos de secreção em 6 h após o desafio. Nos tempos seguintes foram observadas reduções significativas na secreção de CXCL1 nos BALFs dos camundongos AIRmin e AIRmax (Figura 24B).

Um aumento significativo da secreção de CXCL10 no BALF dos camundongos AIRmin foi observado em 48 h após o desafio. Por outro lado, na linhagem AIRmax o pico máximo de secreção de CXCL10 ocorreu 12 h após o desafio, com redução significativa em 48 h, atingindo níveis próximos ao basal. Ainda em 48 h após o desafio foi possível observar uma diferença significativa na secreção de CXCL10 entre as amostras dos camundongos AIRmin e AIRmax (Figura 24C).

A secreção de CCL3 e CCL4 apresentaram perfis semelhantes após o desafio, apesar de algumas diferenças nas análises estatísticas. Foram observados aumentos na secreção destas duas quimiocinas nos BALFs dos camundongos AIRmax e AIRmin em 6 h após o desafio. Em AIRmin, os níveis permaneceram altos em todos os pontos após o desafio, com picos em 48 h. Nos camundongos AIRmax, os níveis de secreção de CCL3 e CCL4 aumentaram significativamente em 12 h após o desafio e reduziram em 48 h. Quando comparadas as duas linhagens de camundongos, em 48 h após o desafio foram observados níveis significativamente mais altos de CCL3 nos camundongos AIRmin em relação aos níveis observados nos camundongos AIRmax (Figura 24D e 24E).

Uma flutuação na secreção da quimiocina CCL5, foi observada nos BALFs dos camundongos AIRmin, sem diferença significativa entre os pontos. Na linhagem AIRmax, os níveis de secreção permaneceram semelhantes até o ponto de 12 h após o desafio, com uma queda significativa em 48 h. Em 48 h após o desafio a secreção de CCL5 foi significativamente maior nos BALFs dos camundongos AIRmin quando comparada ao observado nos camundongos AIRmax (Figura 24F).

A quimiocina CCL2 também foi avaliada, mas não foi encontrada diferença entre os grupos.

Um estudo realizado por Hong e colaboradores mostrou a importância das metaloproteases de matriz (MMPs) para o controle da infecção por pneumococo. Camundongos *knockout* para as MMPs 2 e 9 não sobrevivem à infecção. Os camundongos apresentam alta carga bacteriana nos pulmões, diminuída capacidade dos neutrófilos em eliminar as bactérias e altos níveis de IL-17, CXCL10 e CCL5 (Hong et al., 2011). Algumas destas características foram também observadas nos camundongos AIRmin, portanto decidimos avaliá-las no nosso modelo.

A Figura 25 mostra a expressão das MMPs nos BALFs dos camundongos AIRmin e AIRmax utilizando a tecnologia LUMINEX.

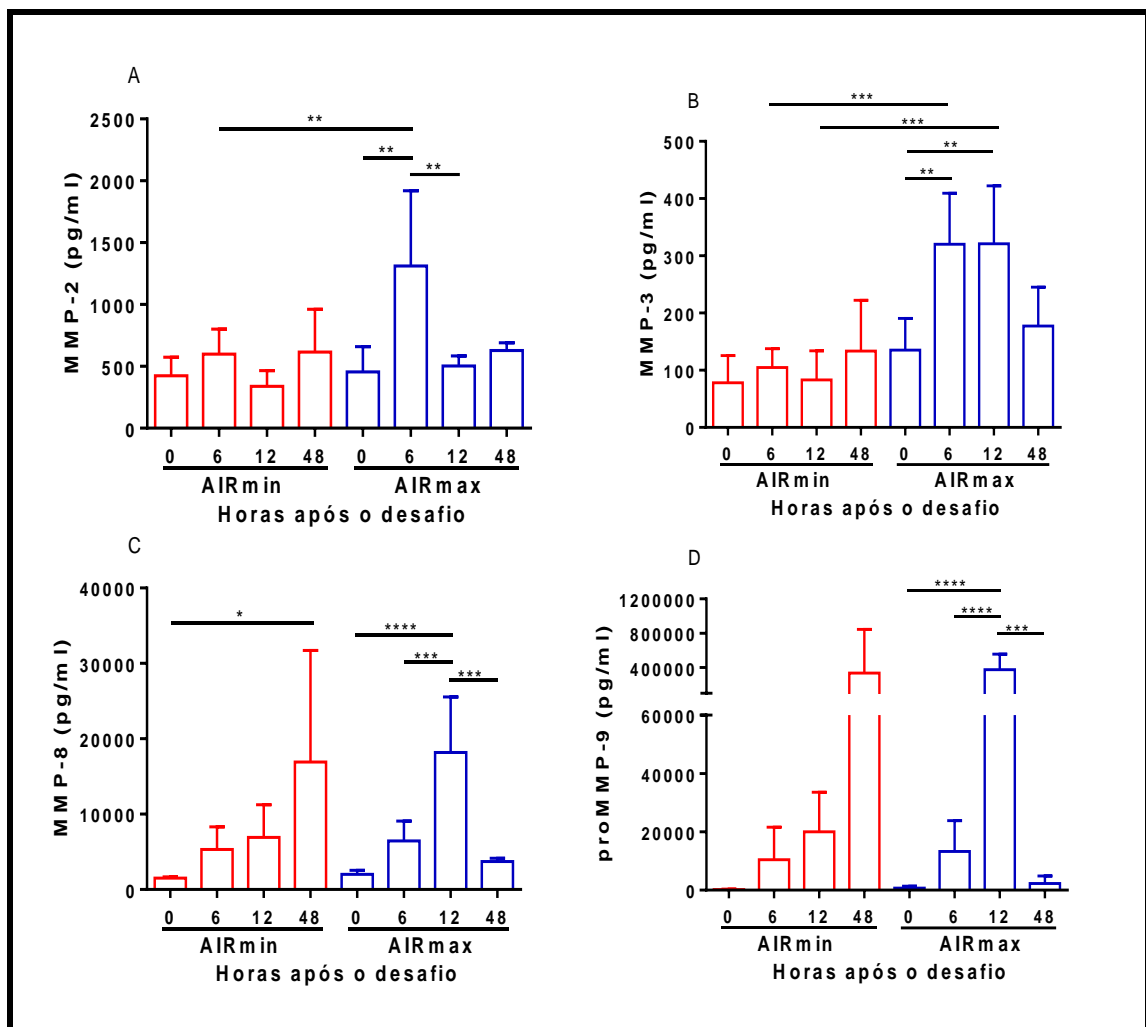


Figura 25 - Expressão de MMPs nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Amostras de BALF foram coletadas antes e em diferentes tempos após o desafio intranasal. As células foram removidas por centrifugação e as MMPs foram quantificadas pelo kit de Luminex. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; Teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey). Os valores abaixo de 0 indicam resultados abaixo do nível de detecção indicado pelo fabricante. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Um aumento significativo da expressão da MMP-2 foi observado em 6 h após o desafio nos BALFs dos camundongos AIRmax, sendo logo controlado em 12 h após o desafio. Por outro lado, nos BALFs dos camundongos AIRmin não foi observado aumento da expressão da MMP-2 após o desafio. Pode-se observar também que a expressão da MMP-2 em 6 h após o desafio foi significativamente maior nos camundongos AIRmax em relação aos camundongos AIRmin (Figura 25A).

A expressão de MMP-3 nos BALFs dos camundongos AIRmax aumentou significativamente em 6 h após o desafio e manteve elevada em 12 h após o desafio. A expressão foi controlada em 48 h após o desafio. Por outro lado, não foi observado aumento da expressão desta MMP após o desafio nos camundongos AIRmin. Foi possível observar também que a expressão da MMP-3 em 6 h e 12 h após o desafio foi significativamente maior nos camundongos AIRmax quando comparada aos níveis encontrados nos camundongos AIRmin (Figura 25B).

Foi possível observar um aumento crescente significativo da expressão da MMP-8 48 h após o desafio nos camundongos AIRmin. Por outro lado, um aumento da expressão da MMP-8 foi observado em 12 h após o desafio nos camundongos AIRmax. A expressão foi controlada em 48 h após o desafio (Figura 25C).

Um perfil semelhante ao observado na MMP-8 foi observado na expressão da proMMP-9. Um aumento crescente, porém não significativo, da expressão da proMMP-9 foi observado em 48 h após o desafio nos camundongos AIRmin. Por outro lado, um aumento significativo foi observado em 12 h após o desafio nos camundongos AIRmax, que foi controlado em 48 h após o desafio (Figura 25D).

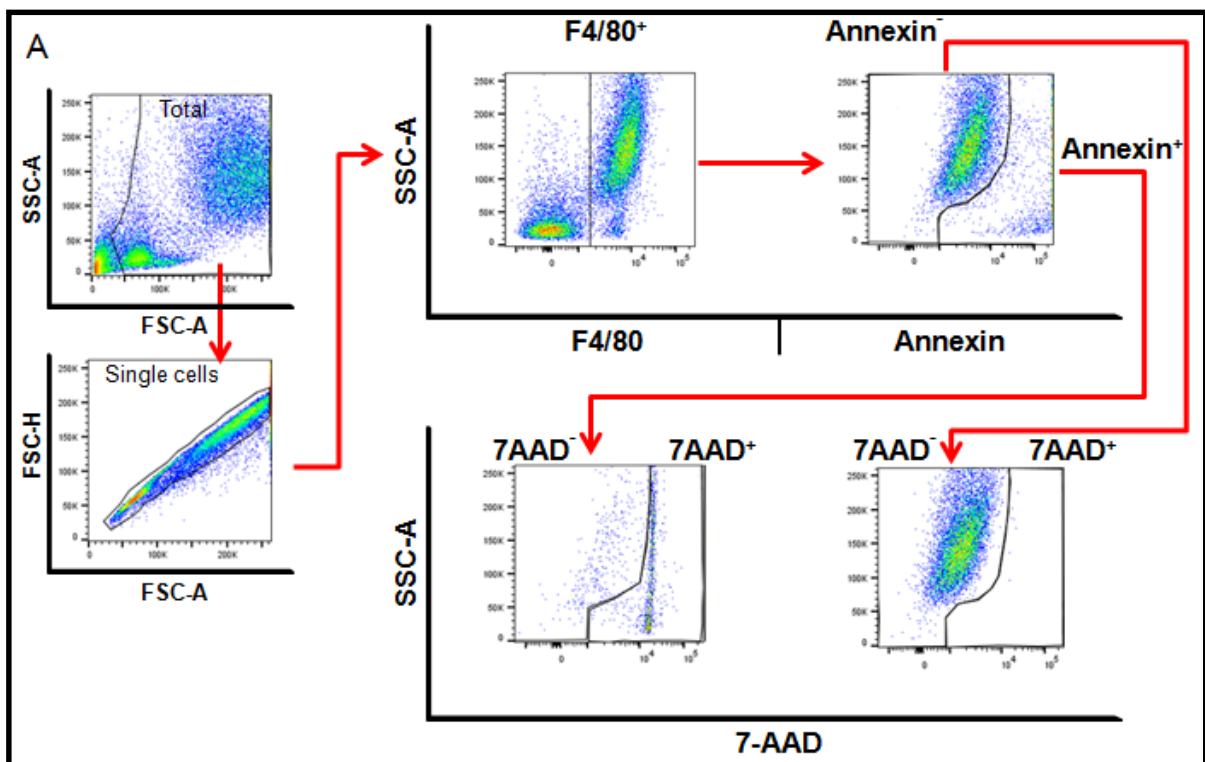
A expressão de MMP-12 no BALF dos camundongos antes e após o desafio também foi avaliada; contudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Devido às diferenças com relação às populações de macrófagos e neutrófilos em resposta ao desafio com o pneumococo nos camundongos AIRmin e AIRmax, decidiu-se avaliar a morte celular por apoptose neste modelo. Durante os estágios iniciais da apoptose, há um rearranjo na fosfatidilserina presente bicamada lipídica da membrana celular, resultando em sua exposição extracelular. Pela capacidade de se ligar à fosfatidilserina, a anexina V é comumente usada como marcador para apoptose. Em estágios mais tardios (apoptose tardia ou necrose), ocorre perda da

integridade da membrana celular possibilitando a entrada de marcadores de viabilidade como o iodeto de propídio e o 7-AAD. Portanto, o marcador de anexina V é comumente utilizado em conjunto com 7-AAD ou outro marcador de viabilidade celular para análise da apoptose ou necrose. As características da análise são: (i) células viáveis são caracterizadas como negativas para ambos os marcadores (ii) células apoptóticas precoces são caracterizadas por negativas para 7-AAD e positivas para anexina V e (iii) células que estão em apoptose final ou necrose são caracterizadas como positivas para ambos os marcadores.

Os resultados apresentados a seguir são preliminares e ainda precisam ser confirmados.

A Figura 26 (A) mostra a estratégia de análise e as figuras 26 (B) e (C) mostram a porcentagem de macrófagos em apoptose ($F4/80^+Annexin^+7-AAD^-$) e necrose ($F4/80^+Annexin^+7-AAD^+$), respectivamente, antes e após o desafio.



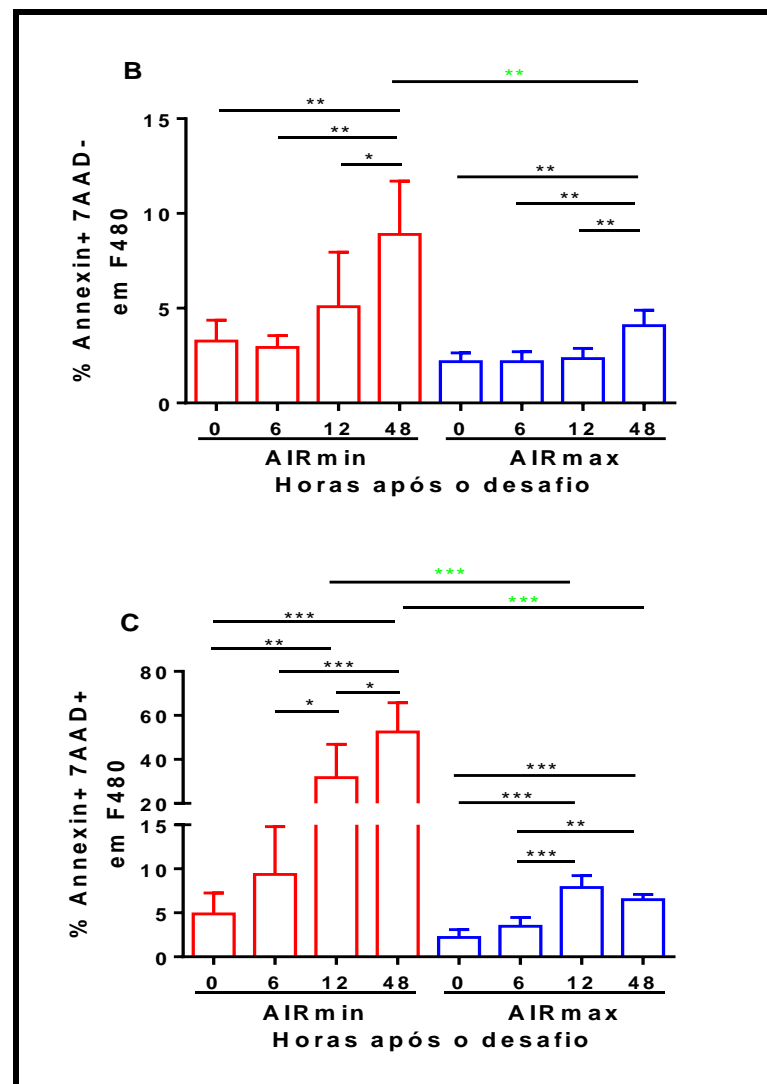


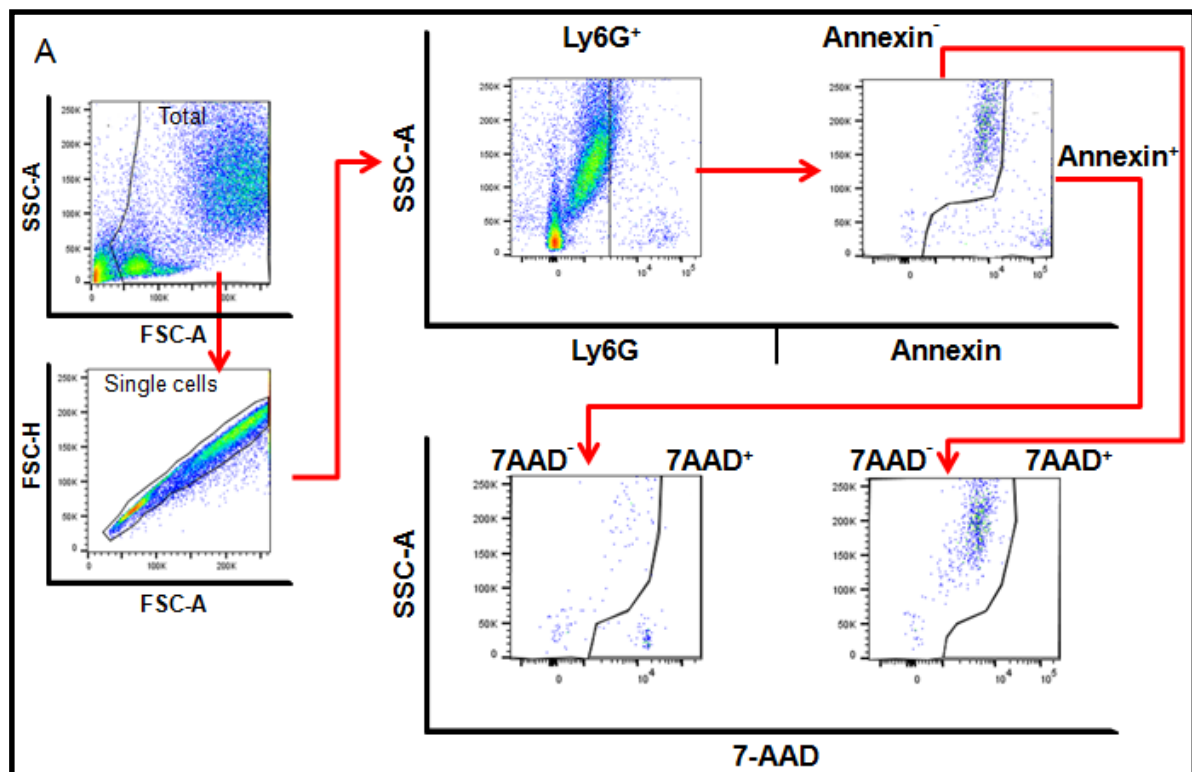
Figura 26 - Estratégia de análise (A) e número total de macrófagos em apoptose (B) ou necrose (C) nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Os macrófagos em apoptose foram detectados pela marcação F4/80⁺Annexin+7-AAD⁻ (B) e os macrófagos em necrose foram detectados pela marcação F4/80⁺Annexin+7-AAD⁺ (C), pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (*P<0,05; **P<0,01; *P<0,001; Teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey).**

Na Figura 26 (B) foi observado um aumento da porcentagem de macrófagos em apoptose 48 h após o desafio nos camundongos AIRmin. Nos camundongos AIRmax também foi observado um aumento da porcentagem em 48 h após o desafio, porém significativamente inferior a observada nos camundongos AIRmin.

Um aumento gradativo foi observado na porcentagem de macrófagos em necrose após o desafio nos camundongos AIRmin. Uma porcentagem de aproximadamente 52% de macrófagos entraram em necrose 48 h após o desafio com o pneumococo. Por outro lado, embora foi observado um aumento gradativo na porcentagem de macrófagos em necrose após o desafio nos camundongos AIRmax,

esse número foi aproximadamente 7% (Figura 26C). Pode-se observar também que os níveis de macrófagos em necrose observados em 12 h e 48 h após o desafio foram significativamente maiores nos camundongos AIRmin em relação aos níveis observados nos camundongos AIRmax.

A Figura 27 (A) mostra a estratégia de análise e as figuras 27 (B) e (C) mostram a porcentagem de neutrófilos em apoptose ($\text{Ly6G}^+\text{Annexin}^+7\text{-AAD}^-$) e necrose ($\text{Ly6G}^+\text{Annexin}^+7\text{-AAD}^+$), respectivamente, antes e após o desafio.



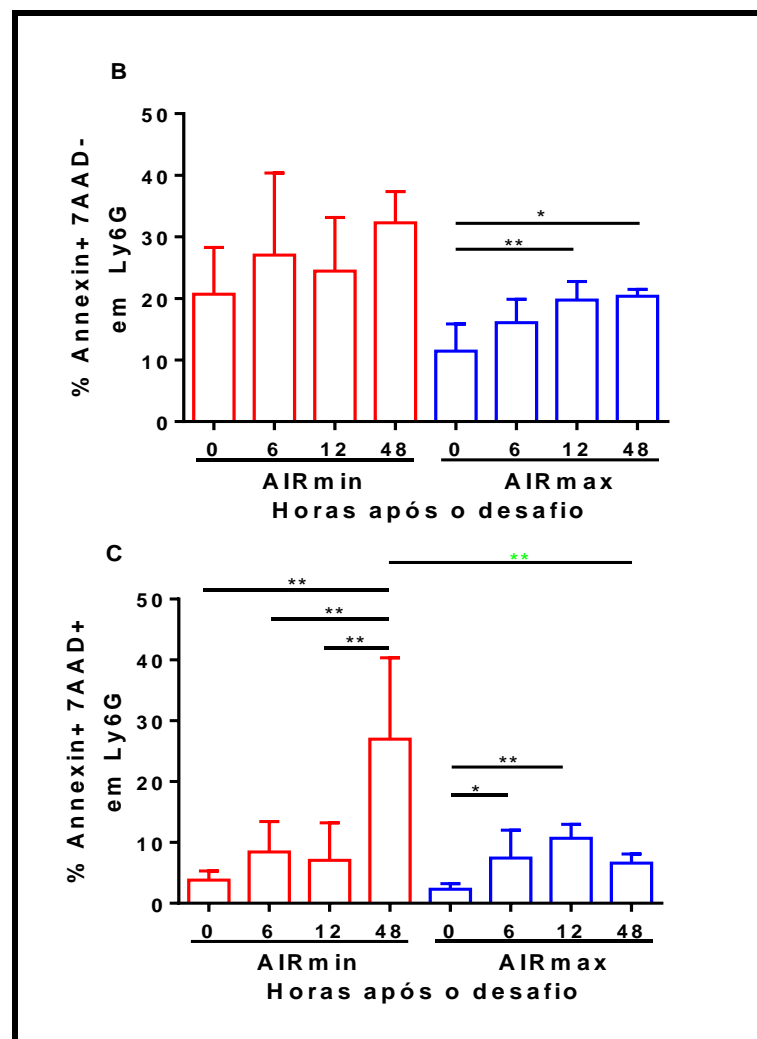


Figura 27 - Estratégia de análise (A) e número total de neutrófilos em apoptose (B) ou necrose (C) nas amostras de BALF dos camundongos AIRmin e AIRmax antes (0 h) e 6 h, 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Os neutrófilos em apoptose foram detectados pela marcação Ly6G⁺Annexin⁺7-AAD⁻ (B) e os neutrófilos em necrose foram detectados pela marcação Ly6G⁺Annexin⁺7-AAD⁺ (C), pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão (*P<0,05; **P<0,01; Teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey).

A Figura 27 (B) mostra que não foram observadas diferenças estatísticas na porcentagem de neutrófilos em apoptose após o desafio nos camundongos AIRmin. Por outro lado, um aumento significativo na porcentagem de neutrófilos em apoptose foi observado nos camundongos AIRmax. Entretanto, a máxima porcentagem de neutrófilos em apoptose encontrada nos camundongos AIRmax foi inferior a mínima encontrada nos neutrófilos dos camundongos AIRmin.

Um aumento significativo na porcentagem de neutrófilos em necrose foi observado nos camundongos da linhagem AIRmin, em 48 h após o desafio, atingindo aproximadamente 27% do total de neutrófilos. Por outro lado, um aumento gradativo e significativo na porcentagem de neutrófilos em necrose foi observado

nos camundongos AIRmax em 12 h, atingindo aproximadamente 10% do total de neutrófilos (Figura 27C). Aparentemente há uma tendência à diminuição da porcentagem de neutrófilos em necrose em 48 h após o desafio.

4.1.2 Avaliação da susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax no modelo de infecção respiratória invasiva com a linhagem ATCC6301 (sorotipo 1) do *Streptococcus pneumoniae*.

A susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax ao desafio respiratório invasivo foi também avaliada usando um sorotipo diferente de pneumococo (linhagem ATCC6301, sorotipo 1). O objetivo deste experimento foi observar se a maior resistência dos camundongos AIRmax camundongos AIRmax, neste modelo, não se restringia ao sorotipo 3 de pneumococo.

A Figura 28 mostra a curva de sobrevivência após o desafio com a linhagem ATCC6301.

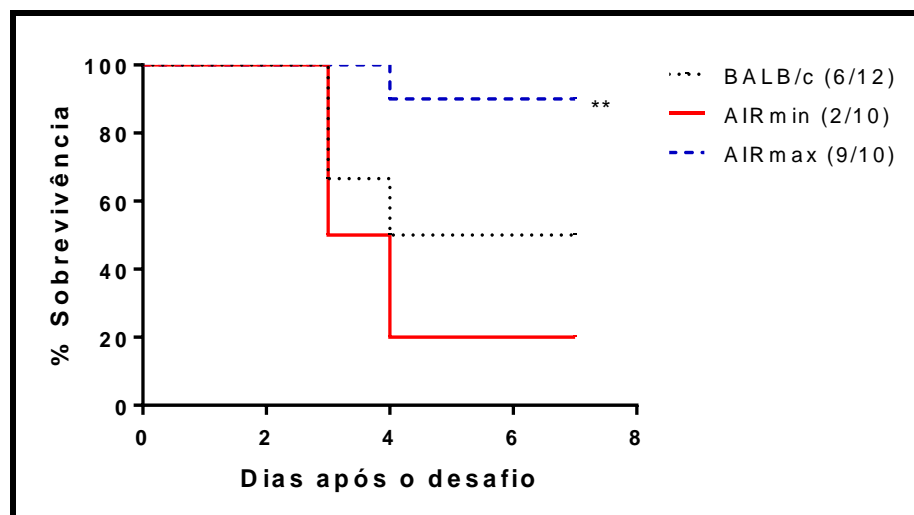


Figura 28 - Curva de sobrevivência após desafio intranasal com a linhagem ATCC6301 de *S. pneumoniae* na dose de 3×10^5 . Os camundongos foram anestesiados e desafiados por via intranasal. Os animais foram observados por 15 dias e foram sacrificados quando atingiram elevado nível de doença (**P < 0,001, quando comparados os grupos AIRmin e AIRmax; curva de sobrevivência analisada pelo teste de Log-Rank). Gráfico composto por dados de dois experimentos independentes.

A figura 28 mostra a curva de sobrevivência dos camundongos das diferentes linhagens após o desafio respiratório invasivo com a linhagem de pneumococo ATCC6301. Nas condições testadas, apenas 50% dos camundongos BALB/c morreram após o desafio. Por outro lado, camundongos AIRmin se mostraram bastante susceptíveis à infecção por esta linhagem de pneumococo. Apenas 20% dos animais sobreviveram ao desafio. Já os camundongos AIRmax foram altamente resistentes e 90% sobreviveram ao desafio.

4.1.3 Avaliação da susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax no modelo de infecção respiratória não invasiva com a linhagem M10 (sorotipo 11A) do *Streptococcus pneumoniae*.

O modelo de desafio com a linhagem de pneumococo M10 é caracterizado por uma infecção localizada nos pulmões em camundongos BALB/c. Em poucos dias, os camundongos são capazes de controlar a infecção, resultando em 100% de sobrevivência dos camundongos desafiados. (Ferreira et al., 2009). A susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax ao desafio respiratório com a linhagem M10 foi avaliada. As Figuras 29 (A) e (B) mostram a recuperação de bactérias nos BALFs e as figuras 29 (C) e (D) mostram a recuperação de bactérias nos pulmões dos animais em 24 h e 48 h após o desafio.

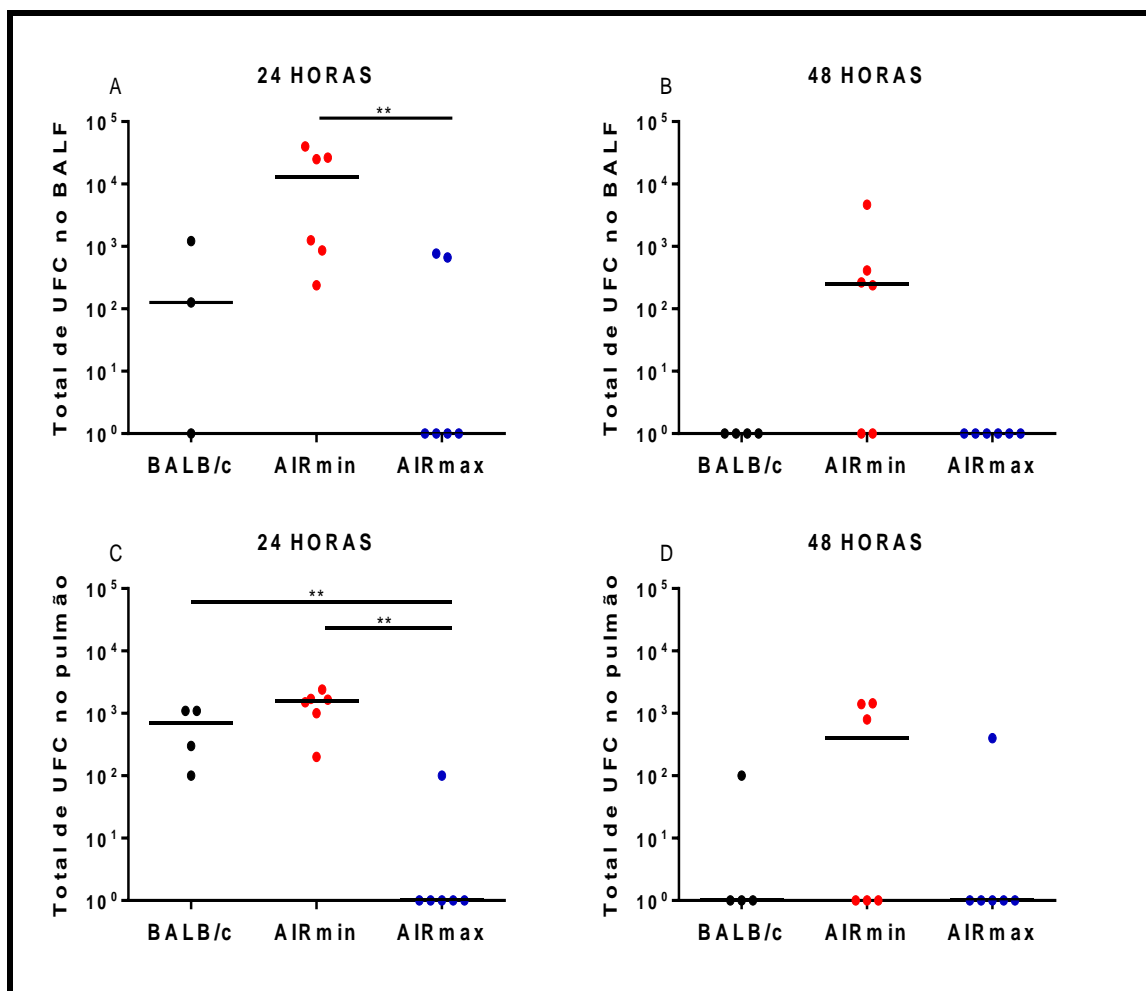


Figura 29 - Recuperação de bactérias dos BALFs (A) e (B) e dos pulmões (C) e (D) em 24 h e 48 h após o desafio com a linhagem M10 de *S. pneumoniae*. Amostras de BALF e pulmão foram coletadas em diferentes tempos após o desafio intranasal (grupos de 3 ou 4 animais da linhagem BALB/c e grupos de 6 animais das linhagens AIRmin e AIRmax). Os pontos indicam os dados individuais e o traço indica a mediana dos grupos (**P < 0,01; Teste de Mann Whitney). Os pontos em 10^0 indicam animais em que não foram recuperadas bactérias. O limite de detecção da técnica é de 120 bactérias para o BALF e 100 bactérias para o pulmão.

A recuperação de bactérias nos BALFs 24 h após o desafio foi significativamente superior nos camundongos AIRmin quando comparados com os camundongos AIRmax (Figura 29A). Ainda nesse ponto, ambas as linhagens BALB/c e AIRmin, apresentaram carga bacteriana significativamente superior no pulmão quando comparadas à linhagem AIRmax (Figura 29C). A maioria dos camundongos AIRmax já não apresentou bactérias no trato respiratório neste ponto (Figuras 29 A e C). Em 48h após o desafio, apesar de não haver diferenças significativas, foi possível observar que 100% dos camundongos AIRmax e BALB/c não apresentaram bactérias nos BALFs. Por outro lado, 4 de 6 camundongos AIRmin ainda apresentaram bactérias nestas amostras (Figura 29B), chegando a níveis entre 10^2 e 10^3 bactérias. No pulmão, apesar de também não haver diferenças significativas na comparação da carga bacteriana, foi possível observar que em 48 h após o desafio, 100% dos camundongos AIRmax e 75% dos camundongos BALB/c conseguiram controlar a infecção com a linhagem M10 (Figura 29D). Por outro lado, 3 de 6 camundongos AIRmin ainda apresentaram bactérias no trato respiratório inferior (Figura 29D).

4.1.4 Avaliação da susceptibilidade dos camundongos AIRmin e AIRmax no modelo de colonização nasal com a linhagem 0603 (sorotipo 6B) do *Streptococcus pneumoniae*.

Após a observação da diferença de susceptibilidade dos camundongos AIRmax e AIRmin aos modelos de infecção respiratória invasiva e não invasiva, decidiu-se avaliar a colonização nasal destes camundongos por pneumococo. Neste modelo, um volume menor da suspensão bacteriana é inoculado por via nasal nos camundongos e após alguns dias, os animais são sacrificados e a carga bacteriana é avaliada em lavados nasais

A Figura 30 mostram a recuperação de bactérias no LN em 5 dias após o desafio. Camundongos C57BL/6 foram utilizados neste experimento como controle conhecido.

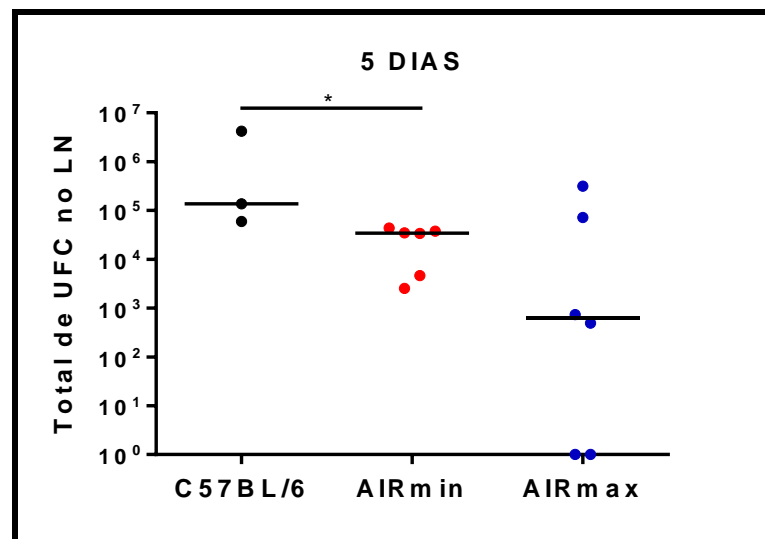


Figura 30 - Recuperação de bactérias do LN em 5 dias após o desafio com a linhagem 0603 de *S. pneumoniae*. Amostra do LN foi coletada em 5 dias após o desafio intranasal (grupos de 3 animais da linhagem C57BL/6 e grupos de 6 animais das linhagens AIRmin e AIRmax). Os pontos indicam os dados individuais e o traço indica a mediana dos grupos (* $P < 0,05$; Teste de Mann Whitney). Os pontos em 10^0 estão abaixo do limite de detecção da técnica que é de 40 bactérias.

A recuperação de bactérias dos LNs 5 dias após o desafio foi significativamente superior nos camundongos C57BL/6 quando comparada à recuperação dos camundongos AIRmin. Os camundongos AIRmin apresentaram níveis entre 10^3 e 10^5 bactérias. Por outro lado, os camundongos AIRmax apresentaram resultados bastante dispersos, sendo que em 2 de 6 camundongos a carga bacteriana foi abaixo do limite de detecção da técnica (Figura 30). Entretanto, não houve diferença estatística entre a colonização observada nos camundongos AIRmin e AIRmax.

4.2 Caracterização da resposta imune no trato respiratório de camundongos vacinados com a formulação PspA5-wP

Em estudos prévios, nosso grupo mostrou a ação protetora da formulação vacinal PspA5-wP contra o desafio invasivo pela linhagem de pneumococo ATCC6303. Os dados indicaram um papel importante no controle da inflamação na proteção induzida pela vacina (Lima et al., 2012). Por este motivo, decidimos avaliar a resposta dos camundongos vacinados ao desafio, com enfoque nas subpopulações de macrófagos, visando determinar se há fatores em comum com a resposta inata protetora observada nos camundongos AIRmax.

Os níveis de IgG anti-PspA5 foram avaliados nos soros dos animais após a imunização (Figura 31).

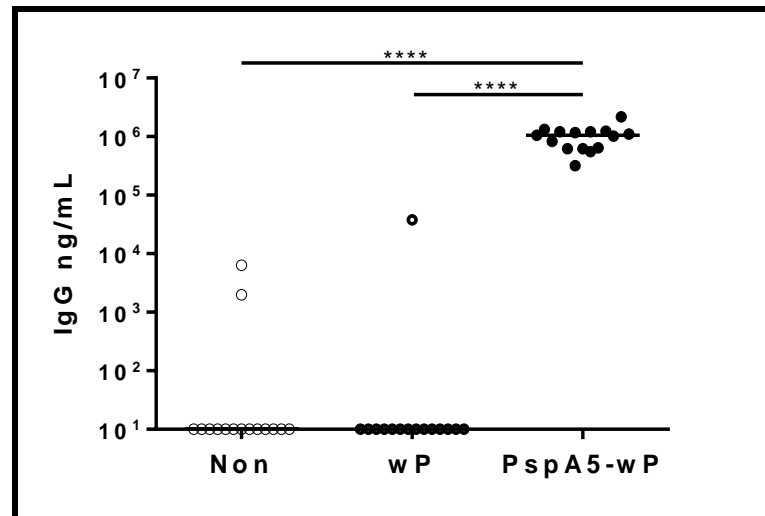


Figura 31 - Indução de IgG anti-PspA5 vinte dias após a segunda imunização. Camundongos BALB/c foram submetidos à sangria e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a mediana dos grupos (**** $P < 0,0001$, teste de Mann Whitney). 10^1 indica o limite de detecção da técnica.

Conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo, a imunização com duas doses de PspA5-wP induziu níveis significativos de IgG anti-PspA5 no soro dos animais imunizados (Figura 31).

As figuras 32 (A) e (B) mostram a recuperação de bactérias nos BALFs e as figuras 32 (C) e (D) mostram a recuperação de bactérias nos pulmões dos animais em 12 h e 48 h após o desafio.

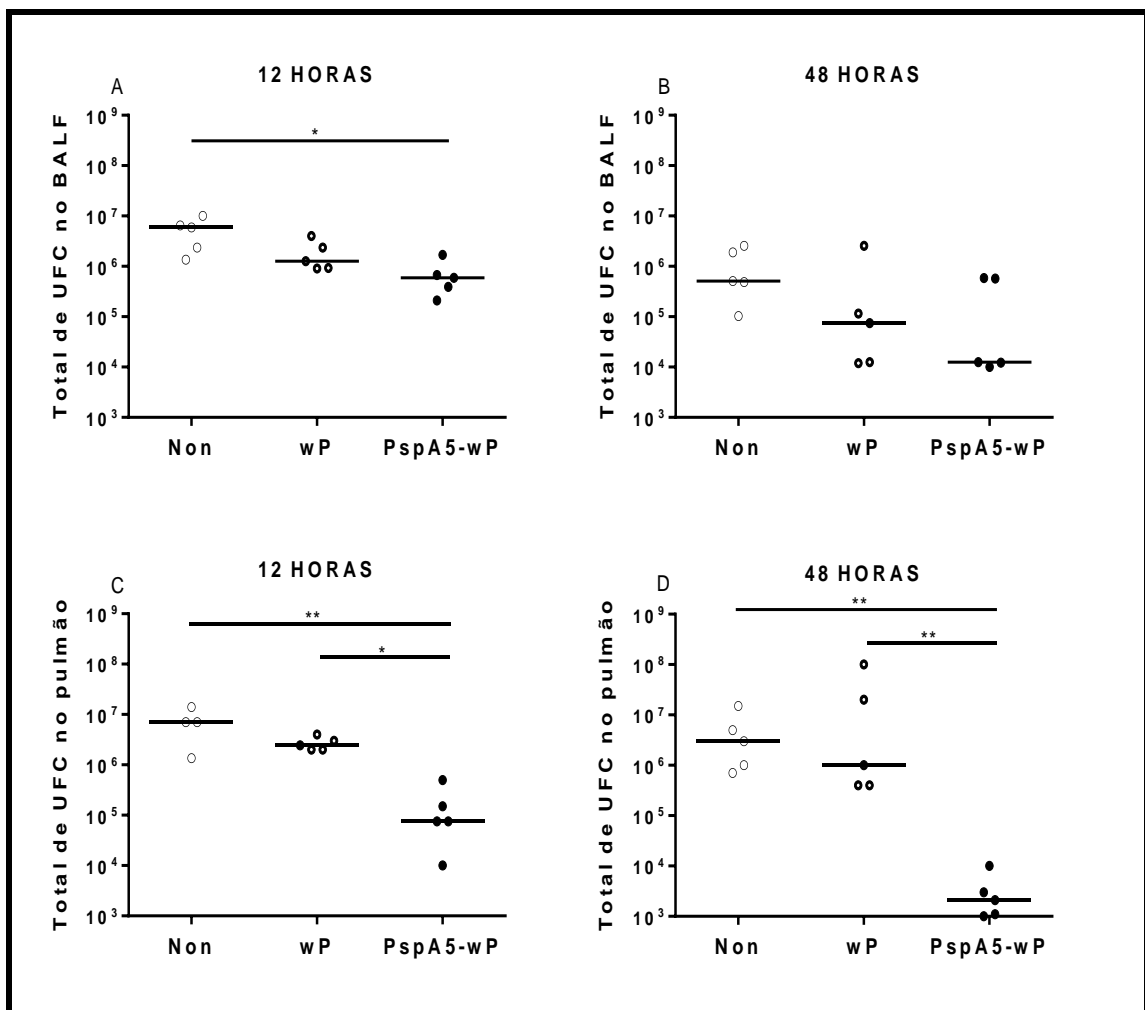


Figura 32 - Recuperação de bactérias dos BALFs (A) e (B) e dos pulmões (C) e (D) em 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Amostras de BALF e pulmão foram coletadas em diferentes tempos após o desafio intranasal (grupos de 5 animais). Os pontos indicam os dados individuais e o traço indica a mediana dos grupos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; Teste de Mann Whitney). Limite mínimo de detecção da técnica é de 120 bactérias para o BALF e 100 bactérias para o pulmão. Non = camundongos não imunizados.

A recuperação de bactérias nos BALFs 12 h após o desafio foi significativamente superior nos camundongos não imunizados (Non) quando comparados aos camundongos imunizados com PspA5-wP (Figura 32A). Ainda neste ponto, ambos os grupos controle, não imunizados (Non) e imunizados com wP, apresentaram níveis significativamente mais altos de bactérias nos pulmões dos animais, em 12 h após o desafio (Figura 32C). Apesar de não haver diferenças estatísticas na comparação da carga bacteriana nos BALFs dos diferentes grupos, em 48 h após o desafio (Figura 32B), os animais vacinados com PspA5-wP apresentaram níveis significativamente menores de bactérias nos pulmões neste ponto em relação aos grupos controle (Figura 32D).

A Figura 33 mostra o total de bactérias recuperadas no sangue em 48 h após o desafio.

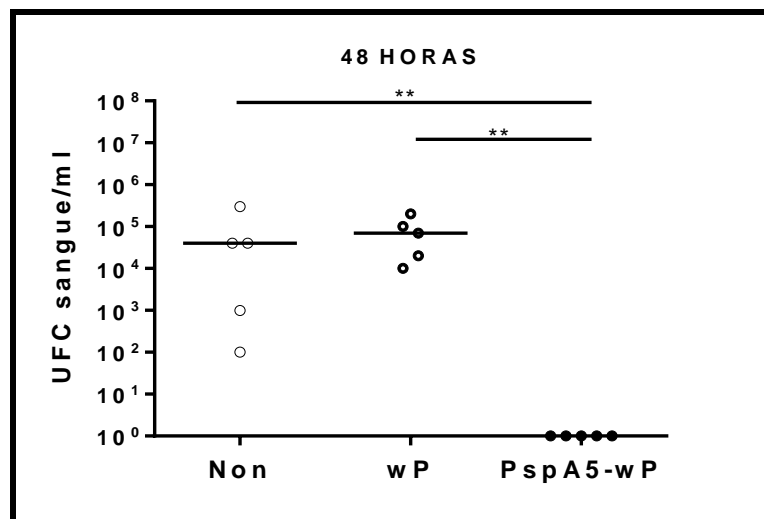


Figura 33 - Recuperação de bactérias no sangue em 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Os pontos indicam os dados individuais e o traço indica a mediana dos grupos (** $P < 0,01$; Teste de Mann Whitney). Limite mínimo de detecção da técnica é de 100 bactérias/ml de sangue, sendo que o valor 10^0 representa animais onde não foram recuperadas bactérias. Non = camundongos não imunizados.

Foi possível recuperar o pneumococo dos grupos não imunizados e imunizados com wP. Nenhum camundongo imunizado com PspA5-wP apresentou níveis detectáveis de bactérias no sangue, sendo este resultado significativamente diferente quando comparado aos grupos controle.

A seguir o influxo de células no BALF dos camundongos imunizados foi avaliado.

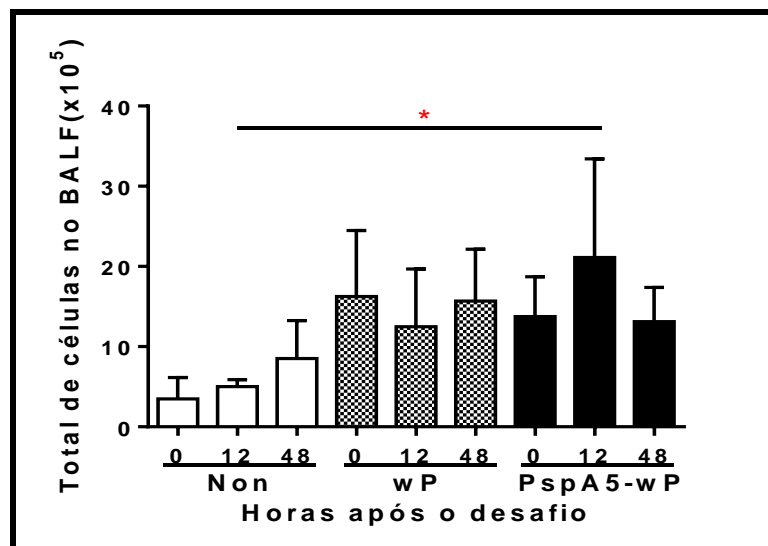


Figura 34 - Número total de células nos BALFs dos camundongos vacinados (4 a 6 animais por grupo) antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer em duplicata. As barras representam as médias obtidas nos grupos com os desvios padrão. (* $P < 0,05$; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey). Non = camundongos não imunizados.

A figura 34 mostra que o total de células se apresentou ligeiramente aumentado nos animais imunizados com wP ou PspA5-wP com relação aos camundongos não imunizados, apesar dos dados não serem significativos. Em 12 h após o desafio, no entanto, o número total de células foi significativamente superior nos camundongos imunizados com PspA5-wP em relação aos camundongos não imunizados.

Para a melhor caracterização dos tipos celulares e identificação de subpopulações, a técnica de citometria de fluxo foi realizada com utilização de anticorpos para marcação celular.

A Figura 35 mostra os números de macrófagos recuperados nos diferentes grupos após a imunização e o desafio com a linhagem de pneumococo ATCC6303. A estratégia de análise adotada foi a mesma utilizada na figura 16 (A).

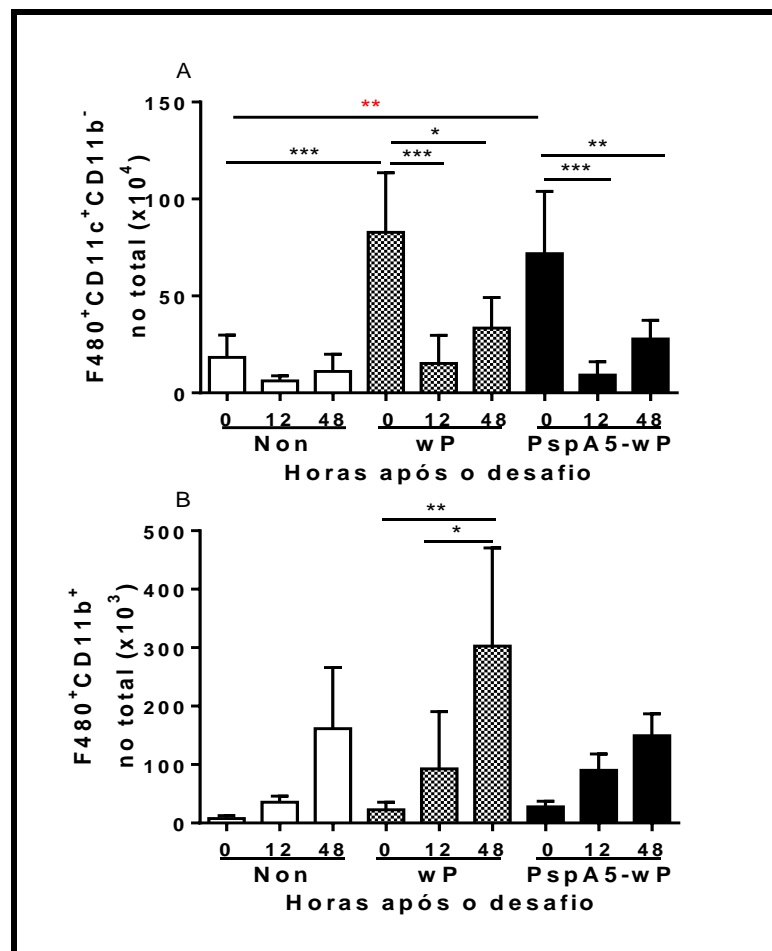


Figura 35 - Número total de macrófagos nos BALFs dos camundongos vacinados (5 animais por grupo) antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Os macrófagos alveolares (MA) foram detectados pela marcação F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻ (A) e os macrófagos teciduais foram detectados pela marcação F4/80⁺CD11b⁺ (B), pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias dos números de macrófagos no total de células para cada grupo com os desvios padrão

(*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey). Non = camundongos não imunizados.

Antes do desafio, os camundongos que receberam a vacina PspA5-wP ou apenas o adjuvante wP apresentaram números significativamente mais altos de MA no BALF, em relação aos animais não imunizados. Após o desafio, uma redução significativa dos MA foi observada nos animais dos grupos wP e PspA5-wP. Por outro lado, os MA permaneceram inalterados nos animais não imunizados. (Figura 35A). O número de macrófagos teciduais recuperados antes do desafio foi baixo em todos os grupos de camundongos e aumentou progressivamente após o desafio, sendo que nos animais inoculados com wP o aumento foi significativo em relação aos níveis basais (Figura 35B).

As Figuras 36 (A), (B) e (C) apresentam o número total de MA expressando as moléculas co-estimulatórias CD80 ou CD86 ou o receptor de manose CD206 respectivamente, após a imunização e o desafio com a linhagem de pneumococo ATCC6303. A estratégia de análise adotada foi a mesma utilizada na figura 17 (A).

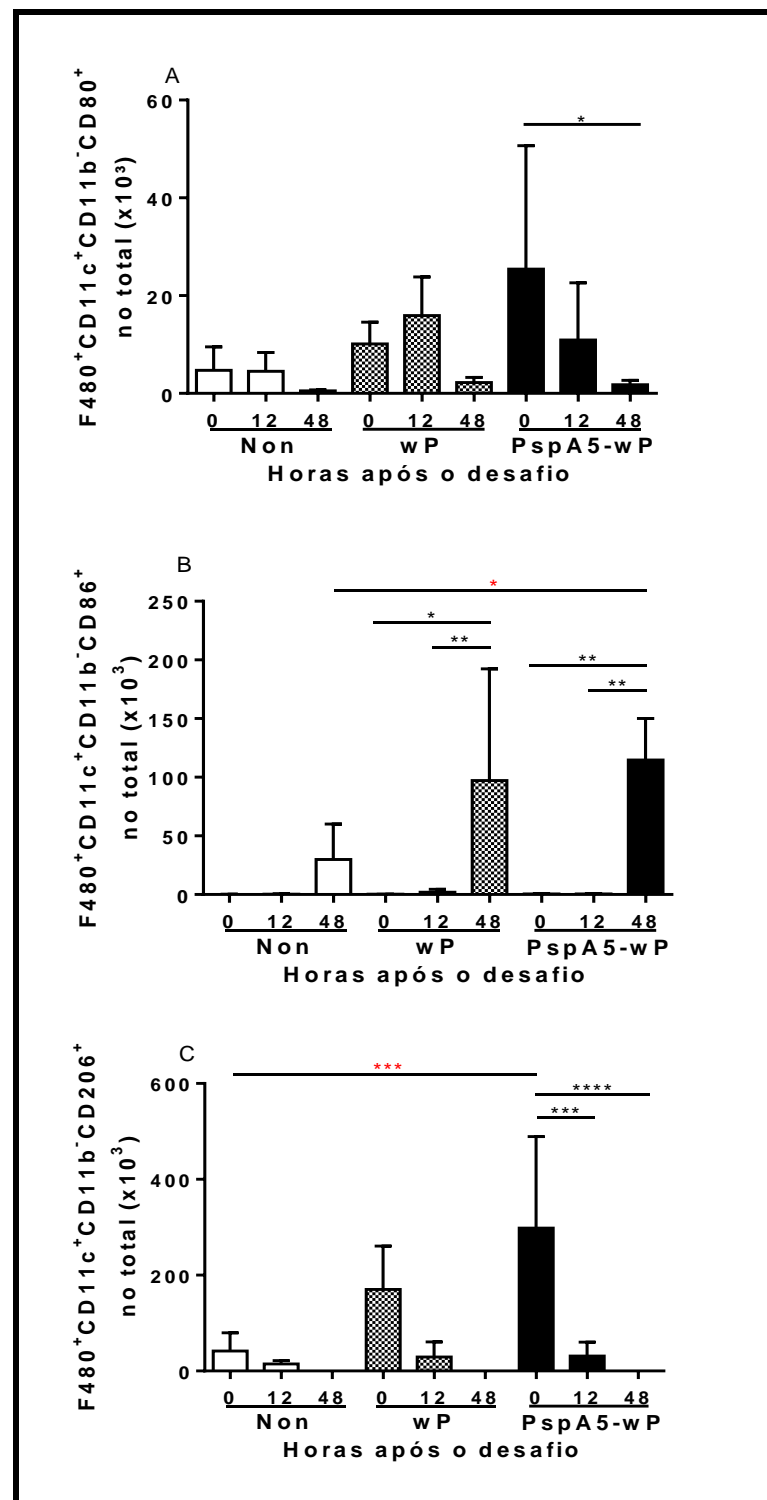


Figura 36 - Número total de MA expressando CD80, CD86 ou CD206 nos BALFs dos camundongos vacinados (5 animais por grupo) antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. As populações foram detectadas pela marcação F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD80⁺ (A), F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD86⁺ (B) ou F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD206⁺ (C), pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias dos números de MA expressando as moléculas co-estimulatórias ou o receptor de manose no total de células para cada grupo com os desvios padrão (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001, Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey). Non = camundongos não imunizados.

O desafio com pneumococo levou à redução do número de MA expressando CD80, após 48 h, em todos os grupos. Esta diminuição foi significativa para os animais imunizados com PspA5-wP que foram os animais que apresentaram os níveis basais mais altos (Figura 36A). Por outro lado, o número de MA expressando CD86 aumenta ao longo do desafio em todos os grupos, sendo que números significativamente maiores que os observados antes do desafio foram recuperados nos animais inoculados com wP ou PspA5-wP. Os dados obtidos dos animais imunizados com PspA5-wP foram menos variáveis e o aumento de MA expressando CD86 foi significativamente maior neste grupo em comparação aos animais não imunizados (Figura 36B). A avaliação do número de MA expressando CD206 mostra uma redução após o desafio com pneumococo nos três grupos. Esta redução foi significativa nos animais imunizados com PspA5-wP, que apresentaram os níveis mais altos de MA expressando CD206, antes do desafio. A imunização com PspA5-wP levou a um aumento significativo da população de MA CD206⁺ em comparação aos animais não imunizados (Figura 36C).

A análise do balanço das subpopulações de MA, CD80⁺, CD86⁺ e CD206⁺ dentro do total de MA ao longo do desafio, não mostrou diferenças significativas entre os grupos (dados não mostrados). A análise dos níveis de expressão de CD80⁺, CD86⁺ e CD206⁺ na população de MA foi realizada pela mediana de intensidade de fluorescência (MFI) (Figura 37).

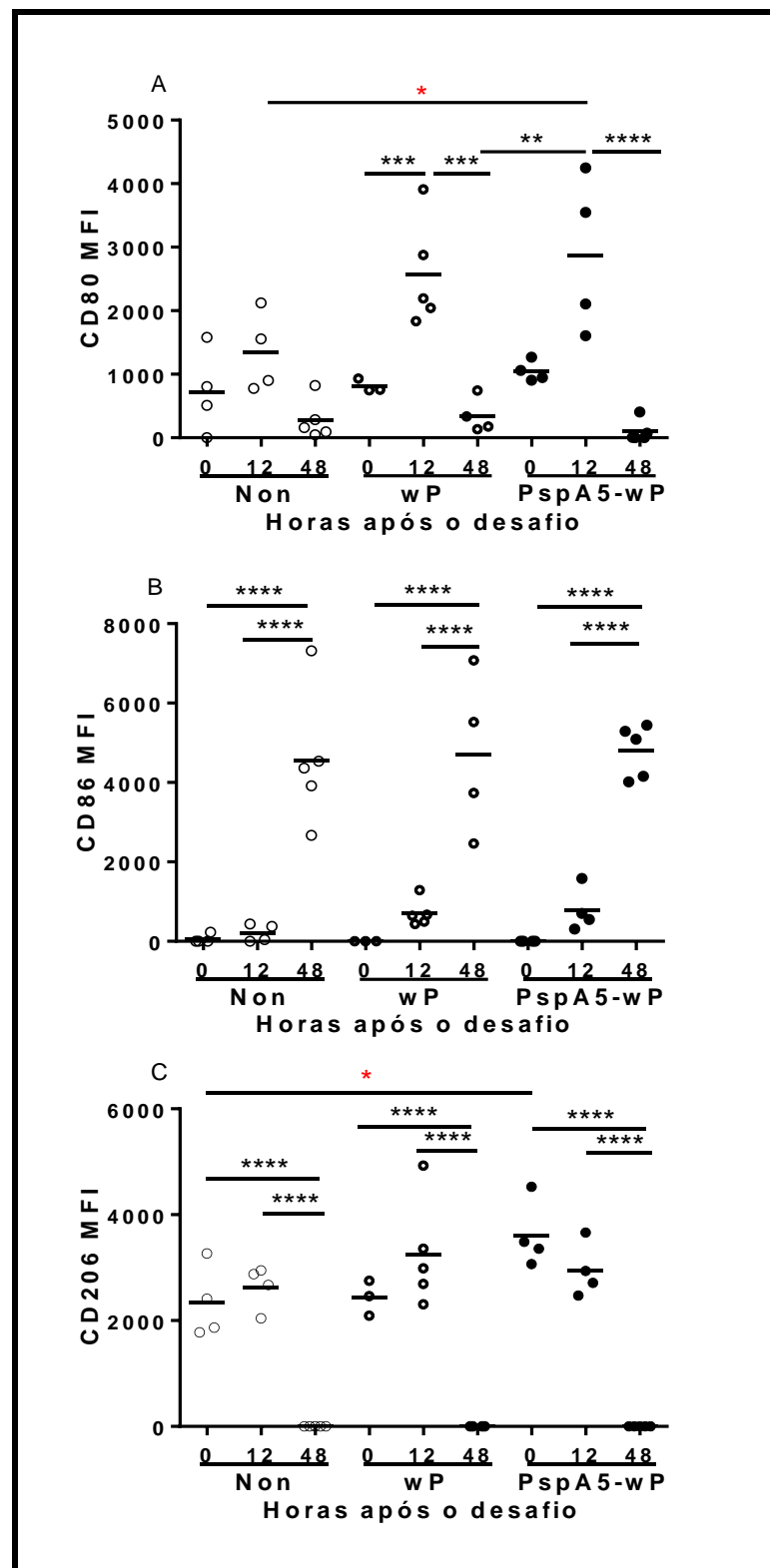


Figura 37 - Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CD80, CD86 ou CD206 nos MA dos BALFs dos camundongos vacinados antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. A mediana da intensidade de fluorescência de CD80, CD86 ou CD206 foi calculada para os MA, usando o software FlowJo. Os pontos indicam os resultados individuais e os traços indicam as medianas de cada grupo (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey). Non = camundongos não imunizados.**

A expressão de CD80 foi baixa nos MA em todos os grupos, em 48 h após o desafio (Figura 37A) e estes dados acompanham a diminuição destas células neste ponto, mostrada na Figura 36A. Entretanto, a análise da expressão de CD80 mostrou um aumento significativo destas moléculas em 12 h após o desafio, nos MA dos camundongos inoculados com wP ou PspA5-wP. Este aumento ocorre, portanto, apesar de não haver um aumento no número de MA CD80⁺. A expressão de CD86 aumentou significativamente em todos os grupos analisados, em 48 h após o desafio com pneumococo (Figura 37B). Neste ponto, portanto, foram observados aumentos tanto na expressão destas moléculas nos MA, como no número total destas células (Figura 36B). Por fim, uma redução significativa na expressão de CD206 pelos MA foi observada nos três grupos, em 48 h após o desafio (Figura 37C). Esta redução acompanhou a redução no número total de MA CD206⁺ observada neste ponto (Figura 36C). Pode-se observar também que, antes do desafio, os MA dos camundongos vacinados com PspA5-wP apresentam expressão significativamente maior de CD206 que os MA dos camundongos não vacinados (Figura 37C). Estes dados acompanham as diferenças nos números destas células observadas nestes dois grupos antes do desafio (Figura 36C).

A Figura 38 mostra o número de neutrófilos recuperados no BALFs dos camundongos antes e após o desafio com a linhagem de pneumococo ATCC6303. A estratégia de análise adotada foi a mesma utilizada na figura 15 (A).

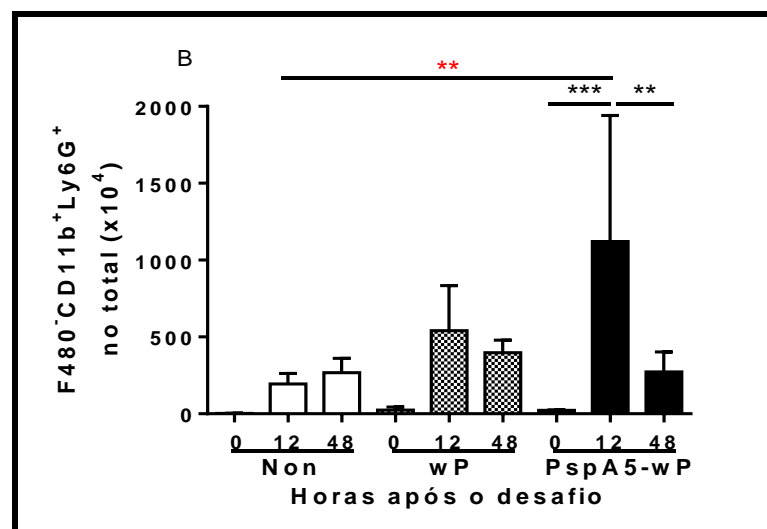


Figura 38 - Número total de neutrófilos nos BALFs dos camundongos vacinados (5 animais por grupo) antes (0 h) e 12 h e 48 h após o desafio com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. Os neutrófilos foram detectados pela marcação F4/80⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺, pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados foram analisados com software FlowJo. As barras representam as médias dos números de neutrófilos no total de células para cada grupo com os desvios padrão (**P<0,01; ***P<0,001; Teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Nos três grupos foi possível observar o aumento de neutrófilos recuperados no BALF após o desafio. Este aumento foi significativo em 12 h após o desafio nos camundongos imunizados com PspA5-wP. O influxo destas células, entretanto, foi rapidamente controlado neste grupo em 48 h após o desafio. Nos camundongos não imunizados (Non) ou inoculados com wP os neutrófilos foram detectados a partir de 12 h após o desafio, e os níveis permaneceram altos ao longo do tempo.

5 DISCUSSÃO

Streptococcus pneumoniae coloniza o trato respiratório superior de humanos saudáveis, podendo permanecer por semanas ou até meses sem causar doenças. Apesar disso, as infecções causadas pelo pneumococo estão entre as principais causas de morte no mundo, acometendo principalmente crianças e idosos (Miyaji et al., 2013). Diversos fatores podem levar ao desenvolvimento das doenças pneumocócicas. Entre eles, pode-se destacar a expressão de fatores de virulência pela bactéria ou o desenvolvimento de uma resposta imune inata ineficiente por parte do hospedeiro (Weiser, 2010). Algumas condições predispõem às infecções pneumocócicas, como por exemplo a asma (Jounio et al., 2010; Klemets et al., 2010; Talbot et al., 2005) ou infecções virais, como a influenza (Mina; Mccullers; Klugman, 2014). A resposta inflamatória inadequada ou exacerbada, presente nestas situações, pode predispor o desenvolvimento da doença pneumocócica. A compreensão dos mecanismos envolvidos durante a colonização e a doença são importantes para o desenvolvimento de terapias profiláticas e terapêuticas contra o pneumococo. Neste sentido, os modelos animais de infecção por pneumococo são importantes ferramentas de estudo. Em nosso laboratório, o modelo de infecção respiratória invasiva em camundongos, estabelecido principalmente com a linhagem de pneumococo ATCC6303, vem sendo aplicado no desenvolvimento de novas vacinas e no estudo da resposta imune inata contra o pneumococo (Ferreira et al., 2009; Lima et al., 2012; Lima et al., 2013; Oliveira et al., 2010). O controle da inflamação parece ser um componente importante tanto na proteção induzida pelas vacinas estudadas quanto nos mecanismos inatos de eliminação das bactérias do trato respiratório.

A defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas é dependente inicialmente de uma rápida eliminação do patógeno por macrófagos e neutrófilos. O recrutamento de leucócitos para o local da infecção envolve a expressão de moléculas de adesão, como intreginas e selectinas e o estabelecimento de gradientes de fatores quimiotáticos secretados pelas células do hospedeiro.

As linhagens de camundongos AIRmin e AIRmax foram selecionadas geneticamente para resposta inflamatória aguda mínima e máxima, respectivamente, e representam um interessante modelo para o estudo da infecção respiratória por pneumococo (Ibanez et al., 1992). Camundongos AIRmax são mais

resistentes que camundongos AIRmin contra infecções por patógenos intracelulares como *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* (Araujo et al., 1998). Em nossos experimentos, pudemos observar maior resistência dos camundongos AIRmax ao desafio respiratório invasivo e não invasivo por *S. pneumoniae* em comparação aos camundongos AIRmin. A maior resistência dos camundongos AIRmax foi comprovada com as linhagens invasivas de pneumococo ATCC6303 (sorotipo 3) e ATCC6301 (sorotipo 1) e na linhagem não invasiva M10 (sorotipo 11 A), indicando que esta não é uma característica dependente do sorotipo ou do componente genético da bactéria. Em conjunto, estes resultados mostram que duas linhagens de camundongos apresentam diferenças de susceptibilidade tanto à infecção por patógenos intracelulares, como é o caso da *Salmonella typhimurium* e da *Listeria monocytogenes* como à infecção por patógenos extracelulares, como é o caso do *S. pneumoniae*.

A colonização nasal com a linhagem 0603 do *Streptococcus pneumoniae* não foi diferente entre as duas linhagens de camundongos estudadas. Foi possível observar uma grande dispersão no número de bactérias recuperadas do LN dos camundongos AIRmax; porém, não houve diferença estatística entre as duas linhagens.

A contagem de UFC recuperadas dos BALFs e dos pulmões mostraram que as diferenças nas cargas bacterianas foram melhor observadas no ponto de 48 h após o desafio. Os camundongos AIRmax apresentaram diminuição significativa neste ponto em relação aos camundongos AIRmin. Quando comparados os dados de BALF e pulmão individualmente de cada camundongo, nos pontos distintos, foi possível concluir que os animais que estavam com elevado número de bactérias no BALF, também estavam com bactérias no pulmão. O ponto de 48 h, nos dois casos reflete melhor a diferença de sobrevivência ao desafio respiratório invasivo com pneumococo, entre as linhagens de camundongos.

A recuperação de bactérias na corrente sanguínea 48 h após o desafio foi realizada, porém os dados não se mostraram reprodutíveis. Desta forma, não foi possível definir se a sobrevivência dos camundongos AIRmax está relacionada ao controle da carga bacteriana nos pulmões, sem invasão das bactérias para a corrente sanguínea. Trabalhos do nosso grupo mostram que a proteção induzida pela vacina PspA5-wP em camundongos BALB/c está relacionada ao controle da

carga bacteriana nos pulmões, sem invasão de bactérias para a corrente sanguínea (Oliveira et al., 2010). É importante ressaltar, no entanto, que nos animais vacinados, níveis altos de anticorpos anti-PspA são encontrados nos pulmões e participam no controle da infecção (Lima et al., 2012; Oliveira et al., 2010).

Quando utilizamos uma dose de desafio não letal, foi possível observar também que os camundongos AIRmin apresentaram capacidade reduzida de eliminação das bactérias dos pulmões em comparação aos camundongos AIRmax.

O desafio invasivo com pneumococo não induziu influxo significativo de células totais nos pulmões dos camundongos AIRmax e AIRmin. Entretanto, foram observadas alterações significativas dos tipos celulares presentes antes e depois do desafio. Uma das alterações mais significativas foi o influxo de neutrófilos após o desafio com a linhagem ATCC6303. Estas células são raras no trato respiratório inferior de camundongos saudáveis, mas exercem papel importante no controle da pneumonia pneumocócica, por intermédio da fagocitose e morte das bactérias (Calbo; Garau, 2010). De fato, praticamente não foram observados neutrófilos nos BALFs nos camundongos AIRmax e AIRmin antes do desafio. Em 12 h após o desafio, o influxo de neutrófilos no trato respiratório dos camundongos AIRmax foi significativamente superior ao influxo de neutrófilos observado nos camundongos AIRmin, sugerindo uma intensidade de resposta maior dos camundongos AIRmax. Ribeiro e colaboradores mostraram que os neutrófilos infiltrados no local da inflamação em camundongos AIRmax são mais resistentes à apoptose (Ribeiro et al., 2003). É possível que esta resistência contribua para a recuperação significativamente maior destas células durante o pico da infecção nos camundongos AIRmax. No entanto, em 48 h os níveis de neutrófilos no trato respiratório destes camundongos retornaram aos níveis basais. Estes dados mostram claramente que há um controle da resposta inflamatória neste ponto. É importante ressaltar que estes resultados se referem aos camundongos AIRmax que são capazes de controlar a infecção e apresentam redução significativa na carga bacteriana nos pulmões neste ponto. Como a resposta à infecção pneumocócica nesta linhagem foi heterogênea, com aproximadamente 60% dos camundongos capazes de sobreviver ao desafio, as análises foram restritas a esta parcela dos animais. Por outro lado, um influxo contínuo de neutrófilos foi observado nos camundongos AIRmin. O efeito deletério do acúmulo contínuo e excessivo destas

células, levando a danos nos tecidos é bem caracterizado (Craig et al., 2009). Este fator pode ter contribuído para a susceptibilidade dos camundongos AIRmin ao desafio. Apesar do influxo de neutrófilos, estes animais não foram capazes de controlar a carga bacteriana nos pulmões.

Normalmente, macrófagos alveolares contam aproximadamente 95% das células do trato respiratório inferior (Martin; Frevet, 2005). Essas células formam a primeira linha de defesa contra microrganismos para eliminar os patógenos. De fato, em ambas as linhagens, AIRmin e AIRmax, estas células representavam a maioria da população total de células presentes no trato respiratório, antes do desafio. Porém, após o desafio foi observada uma redução no número de MA nos camundongos AIRmax, sendo esta substituída pela população de neutrófilos. Por outro lado, o número de MA nos camundongos AIRmin permaneceu estável após o desafio. A morte celular de macrófagos por apoptose, no trato respiratório de camundongos desafiados com *S. pneumoniae*, é sugerida como um dos eventos importantes para o controle da infecção, já que contribuiria para a eliminação das bactérias fagocitadas (Aberdein et al., 2013). É possível que a diminuição dos MA observada após o desafio nos camundongos AIRmax esteja relacionada à apoptose dos macrófagos infectados contribuindo para o controle da infecção. Os macrófagos teciduais permaneceram praticamente inalterados em ambas as linhagens de camundongos, indicando que não houve influxo destas células no trato respiratório em resposta a desafio.

Os macrófagos possuem duas vias de diferenciação, macrófagos ativados pela via clássica (denominados M1) e macrófagos ativados pela via alternativa (M2). Os macrófagos M1 envolvem produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β e síntese de ácido nítrico, que está envolvido na atividade microbicida dos macrófagos, em resposta à patógenos ou a IFN- γ . Por outro lado, os macrófagos M2 envolvem produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 em resposta a citocinas Th-2 como IL-4 e IL-13. Além da produção de uma resposta anti-inflamatória, estes macrófagos estão relacionados com resposta humoral, alérgica ou anti-parasitária (Benoit; Desnues; Mege, 2008; Gordon; Martinez, 2010). A polarização M1 dos macrófagos, tanto em modelos murinos como em humanos, está associada com o controle da infecção (Benoit; Desnues; Mege, 2008). Os macrófagos M1 suportam resistência a infecções por bactérias intracelulares e

conseguem controlar a fase aguda da infecção. Porém, uma prolongada e excessiva resposta M1 pode ser deletéria para o hospedeiro (Benoit; Desnues; Mege, 2008). Em nosso modelo, os MA foram caracterizados quanto à expressão de moléculas co-estimulatórias presentes na superfície, que são indicativos do estado de ativação das células. Além disso, a expressão do receptor CD206, que é um receptor característico de macrófago M2 também foi avaliada.

O desafio com pneumococo não alterou a população de MA expressando CD80 em ambas as linhagens de camundongos. E, os camundongos AIRmin e AIRmax apresentaram um leve aumento no número de MA expressando a molécula CD86 após o desafio com pneumococo. Entretanto, quando o nível de expressão destas moléculas foi avaliado na população de MA, observou-se um aumento significativo da expressão de CD80 em 6 h após o desafio apenas nos camundongos AIRmax. Por outro lado, a expressão de CD86 foi aumentada nos MA em resposta ao desafio em ambas as linhagens de camundongos. As moléculas CD80⁺ e CD86⁺ são expressas por diferentes células apresentadoras de antígeno e participam na sinalização aos linfócitos T por intermédio dos receptores de superfície CD28 e CD152. Evidências em diferentes modelos indicam que o balanço entre estas moléculas pode propiciar um ambiente menos ou mais inflamatório, sendo que a presença de CD80⁺ poderia estar relacionada com um estado menos inflamatório (Sansom; Manzotti; Zheng, 2003). É possível que o aumento de expressão de CD80 nos MA dos camundongos AIRmax contribuam para uma resposta inflamatória mais controlada, evitando danos excessivos no tecido.

A população de MA expressando CD206 foi a que mais diferenciou a resposta dos camundongos AIRmax e AIRmin ao desafio com pneumococo. Em todos os pontos analisados, os camundongos AIRmin apresentaram números maiores destas células em comparação aos camundongos AIRmax, sendo que níveis significativamente superiores foram observados no ponto de 48 h após o desafio. A análise de porcentagem mostrou que mesmo antes do desafio, a população MA CD206⁺ nos camundongos AIRmin constitui aproximadamente 50% na população total de MA, em comparação a 20% nos camundongos AIRmax. Após o desafio, a porcentagem de MA CD206⁺ aumentou, chegando a 80% da população de MA, em 48 h após o desafio. Apesar de haver um aumento em porcentagem de MA CD206⁺ em resposta ao desafio nos camundongos AIRmax, esta população atinge um pouco

mais de 40% do total de MA, em 48 h após o desafio. Da mesma forma, a expressão de CD206 nos MA foi superior nos camundongos AIRmin em relação aos camundongos AIRmax. É interessante observar, que a resposta dos camundongos AIRmin, com relação a esta população também foi diferente em relação aos camundongos BALB/c.

O desafio com pneumococo induziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , IL-6 e TNF- α nos camundongos AIRmax e AIRmin. As diferenças observadas foram em relação ao controle da inflamação. Enquanto os camundongos AIRmax foram capazes de controlar a secreção destas citocinas rapidamente, a secreção contínua foi observada nos camundongos AIRmin. Ainda, o controle da inflamação nos camundongos AIRmax correspondeu ao controle da carga bacteriana no trato respiratório. Apesar da secreção das citocinas pró-inflamatórias, os camundongos AIRmin não foram capazes eliminar o pneumococo. A inflamação contínua nos camundongos AIRmin pode ter contribuído para o agravamento da infecção mediante a lesão do tecido pulmonar. A indução de respostas do tipo Th1, com secreção de IFN- γ , é bastante relacionada ao controle da infecção respiratória por pneumococo em camundongos, sendo a resposta do tipo Th2 menos eficiente (Ferreira et al., 2008). A secreção das citocinas do tipo Th2 IL-4 e IL-5 apresentou um pico em 12 h após o desafio que logo foi controlado nas duas linhagens de camundongos. Entretanto, uma variação muito grande foi observada nos camundongos AIRmax, mostrando que nem todos os animais responderam da mesma forma. Estes resultados podem refletir o fato de que parte da população controla a infecção, enquanto outra parte não. Entretanto, pelos experimentos realizados neste trabalho, não podemos correlacionar a maior secreção destas citocinas com uma piora na infecção.

O IL-17 tem um papel importante no controle da colonização nasal por pneumococo em camundongos. Zhang e colaboradores mostraram que a depleção de IL-17 ou de células T CD4⁺ produtoras desta citocina pode bloquear o recrutamento de macrófagos não residentes demorando para eliminar o pneumococo do trato respiratório superior (Zhang; Clarke; Weiser, 2009). Já o papel de IL-17 na infecção pulmonar e sepse por pneumococo é controverso. IL-17 também está relacionado ao influxo de neutrófilos e a sua expressão excessiva e contínua pode ser deletéria. Um aumento na secreção de IL-17 foi observado nos

camundongos AIRmin em 48 h após o desafio, ponto em que estes animais apresentam alta carga bacteriana nos pulmões. É possível que a secreção de IL-17 neste ponto contribua para a piora na infecção mediante danos nos tecidos.

As quimiocinas avaliadas apresentaram um perfil semelhante ao das citocinas pró-inflamatórias. Ambas as linhagens de camundongos responderam à infecção com a secreção de quimiocinas, porém somente os camundongos AIRmax controlaram a secreção em 48 h. Um estudo realizado com camundongos Swiss CD1 para caracterizar os fatores microbianos e inflamatórios que acarretam a morte ou sobrevivência dos camundongos após o desafio intranasal com pneumococo mostrou que a morte dos camundongos é precedida de um elevado crescimento bacteriano e também está associada a um aumento crescente de citocinas e quimiocinas, entre elas, IL-6, CCL3, CXCL2, CCL2, CXCL3 e também ao recrutamento de neutrófilos (Dallaire et al., 2001). Estes dados estão de acordo com o observado nos camundongos AIRmin.

O desafio dos camundongos AIRmin com pneumococo induziu elevados níveis da citocina IL-17 e das quimiocinas CXCL10 e CCL5 no trato respiratório, além de um influxo de leucócitos no trato respiratório; entretanto, esta resposta não foi suficiente para diminuir a carga bacteriana e conferir sobrevivência aos animais. Um estudo realizado com uso de camundongos *knockout* para duas metaloproteases de matriz, MMP-2 e MMP-9, mostrou que a deficiência de ambas as MMPs confere aos camundongos menor sobrevivência a um desafio respiratório invasivo com uma linhagem pneumococo do sorotipo 4. Apesar de haver recrutamento de um maior número de leucócitos polimorfonucleares no pulmão dos camundongos *Mmp2/9^{-/-}* após o desafio, os animais não foram capazes de controlar a carga bacteriana. Além disso, os camundongos apresentaram elevados níveis da citocina IL-17 e das quimiocinas CXCL10 e CCL5 nos pulmões (Hong et al., 2011). Este perfil de resposta é muito semelhante ao observado nos camundongos AIRmin, o que nos levou a avaliar a expressão de algumas MMPs no trato respiratório dos camundongos AIRmin e AIRmax após o desafio com pneumococo. Os camundongos AIRmax responderam ao desafio com um aumento transitório da expressão da MMP-2 e da MMP-3. Por outro lado, a expressão destas MMPs permanece inalterada nos camundongos AIRmin. Além disso, o desafio com pneumococo induziu um aumento significativo da MMP-8 e proMMP-9 em 12 h após

o desafio nos camundongos AIRmax. O aumento da expressão destas MMPs nos camundongos AIRmin só foi observado em 48 h após o desafio, quando a carga bacteriana nos pulmões já estava muito alta. Assim, houve um atraso na resposta. As MMPs são uma família de enzimas dependentes de zinco que participam em processos inflamatórios e nas respostas imunes inata e adaptativa. Entre as atividades descritas para as diferentes MMPs, há a degradação de proteínas de matriz e de adesinas, influenciando na migração de células para o local da inflamação. Algumas MMPs, como por exemplo MMP2, MMP8, MMP9 e MMP12 são ainda responsáveis pela clivagem de citocinas e quimiocinas, entre elas TNF- α , CCL7, IL-17 e CXCL5, resultando na diminuição ou no aumento da sua atividade (Hong et al., 2011; Parks et al., 2004). A expressão diferencial das MMPs nos camundongos AIRmax e AIRmin em resposta ao desafio por pneumococo é um resultado interessante que indica um possível papel no controle da inflamação neste modelo.

O efeito protetor de macrófagos e neutrófilos às infecções bacterianas está bastante relacionado à capacidade de fagocitose e de eliminação das bactérias. Após a morte das bactérias, as próprias células fagocíticas podem entrar em apoptose e a sua eliminação diminui o processo inflamatório. Hong e colaboradores mostraram que os neutrófilos de camundongos *Mmp9*^{-/-} entraram em apoptose mais rápido do que os neutrófilos de camundongos selvagem após o desafio com pneumococo. Os autores discutem que a meia vida menor destas células pode ter contribuído para a ineficácia em combater a infecção por pneumococo (Hong et al., 2011). Usando um modelo de inflamação induzida por biogel, Ribeiro e colaboradores mostraram que neutrófilos dos camundongos AIRmax quando infiltrados no local da inflamação apresentam maior resistência à apoptose (Ribeiro et al., 2003). Em nosso modelo, os resultados preliminares indicam que uma porcentagem maior de macrófagos e neutrófilos dos camundongos AIRmin apresentaram apoptose em estágios mais iniciais ou mais tardios (necrose) após o desafio com pneumococo. Estes resultados corroboram o mecanismo proposto por Hong e colaboradores para a limitada capacidade dos camundongos *Mmp9*^{-/-} em eliminar a infecção por pneumococo. Apesar de haver um aumento nas células apoptóticas após o desafio, os níveis foram menores nos camundongos AIRmax.

O desenvolvimento de vacinas proteicas contra o pneumococo é uma das linhas de pesquisa do nosso grupo. Entre os antígenos estudados está o PspA, uma proteína de superfície capaz de induzir a proteção contra diferentes modelos de infecção em pneumococo (Miyaji et al., 2013). Embora a porção N-terminal de PspA apresente variabilidade na sequência de aminoácidos, levando ao agrupamento das variantes em 6 clados (Hollingshead; Becker; Briles, 2000) os epítomos protetores mapeiam nesta região. Em nosso laboratório foram selecionados duas variantes de PspA, dos clados 4 e 5 (PspA4 e PspA5) que são capazes de induzir anticorpos com reatividade cruzada contra PspAs dos 6 clados (Moreno et al., 2010). Estudos com a formulação composta por PspA5 e a wP produzida no Instituto Butantan, como adjuvante, tem se mostrado bastante promissores. A vacina PspA5-wP foi capaz de induzir a proteção de camundongos contra diferentes modelos de desafio com pneumococo, realizados com linhagens que expressam PspAs de diferentes clados (Oliveira et al., 2010). A resposta imune induzida por esta vacina, inoculada em camundongos por via nasal, é caracterizada pela indução de altos níveis de anticorpos anti-PspA5 no sangue e nas mucosas. Após o desafio dos animais imunizados, foi observada a indução de citocinas pró-inflamatórias e do influxo de células, principalmente neutrófilos, de forma controlada. Os linfócitos também se apresentam em maior número no trato respiratório dos animais imunizados. Esta resposta é altamente eficaz em controlar a carga bacteriana no trato respiratório, evitando a invasão das bactérias para a corrente sanguínea (Lima et al., 2012; Oliveira et al., 2010). Até o momento, a população de MA presente em animais imunizados com PspA5-wP e desafiados não havia sido caracterizada. Por este motivo, neste trabalho realizamos uma caracterização similar a realizada com os camundongos AIRmax e AIRmin.

Conforme o esperado, nos experimentos aqui apresentados, a imunização dos camundongos com PspA5-wP foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos anti-PspA5, diminuição significativa da carga bacteriana no trato respiratório dos animais e impediu a invasão da bactéria no sangue. Também conforme o esperado, os animais inoculados com wP ou PspA5-wP apresentaram um número total de células no BALF ligeiramente aumentado em relação aos animais não imunizados e um pico em 12 h após o desafio foi observado nos animais vacinados com PspA5-wP. O Influxo de neutrófilos também seguiu o perfil observado anteriormente pelo

nosso grupo, com um pico rapidamente controlado nos animais imunizados com PspA5-wP e um influxo persistente nos animais não imunizados ou inoculados apenas com wP.

A caracterização dos macrófagos mostrou que o número de MA está aumentado antes do desafio nos animais imunizados com wP ou PspA5-wP em relação aos animais não imunizados. Portanto, esta população deve, pelo menos em parte, contribuir para o total de células aumentado nestes grupos. Além disso, como o grupo wP apresentou um aumento dos MA antes do desafio, concluímos que esta deve ser uma resposta induzida pelo adjuvante no trato respiratório. O desafio com pneumococo, no entanto levou à diminuição significativa destas células nestes dois grupos. Por outro lado, o número de macrófagos teciduais se mostrou baixo em todos os grupos antes do desafio e aumentou após este. Apesar de não haver diferenças significativas entre os grupos, o aumento de macrófagos teciduais no BALF dos camundongos parece ser um pouco mais moderado em 48 h após o desafio nos animais imunizados com PspA5-wP. O influxo de macrófagos teciduais no BALF dos animais caracteriza um estado de inflamação, já que estas são células ativadas após o desafio. Entretanto, apesar do influxo destas células para os alvéolos, não houve controle da carga bacteriana nos animais não imunizados ou imunizados com wP. É possível que a presença de anticorpos anti-PspA5 que estão presentes no trato respiratório após a imunização com PspA5-wP (Lima et al., 2012; Salcedo-Rivillas et al., 2014) facilitem o reconhecimento das bactérias pelos receptores de Fc da imunoglobulina, e, conseqüentemente a fagocitose.

Com relação às subpopulações de MA estudadas, os resultados mostraram que o desafio com pneumococo modulou diferentemente a população de MA expressando CD80 ou CD86. O número de MA CD80⁺ diminuiu em todos os grupos após o desafio e esta diminuição se mostrou significativa para os animais imunizados com PspA5-wP, já que este grupo apresentou maior número destas células antes do desafio. Quando foram avaliados os níveis de expressão de CD80 pelos MA, os dados mostraram um aumento significativo em 12 h após o desafio nos grupos imunizados com wP ou PspA5-wP. Assim, apesar de não haver aumento no número de MA CD80⁺, as células que estão presentes neste ponto apresentaram aumento de expressão. O fato de ambos os grupos, wP e PspA5-wP apresentarem esta resposta, sugere uma modulação inespecífica do adjuvante, que pode contribuir

com a eficácia da resposta imune à vacina na presença de outros fatores estimulados pelo reconhecimento do antígeno.

O inverso pode ser observado com relação aos MA CD86⁺. É interessante observar que os animais imunizados com PspA5-wP apresentaram um aumento mais homogêneo do número destas células em 48 h após o desafio, que foi significativamente superior aos animais não imunizados. Além da homogeneidade no aumento do número de MA CD86⁺, observou-se também homogeneidade quanto ao aumento de expressão destas moléculas pelos MA após o desafio. Estes aumentos podem contribuir, portanto, para a apresentação dos antígenos bacterianos de forma mais eficaz e consequente eliminação das bactérias.

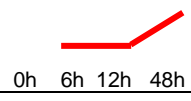
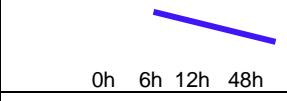
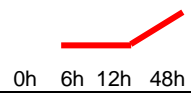
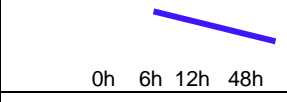
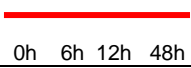
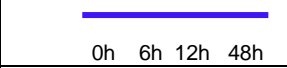
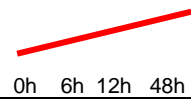
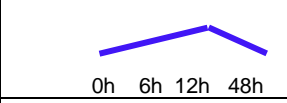

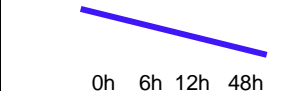
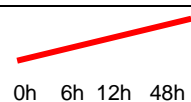
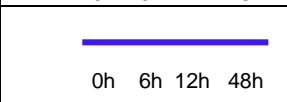
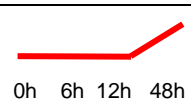
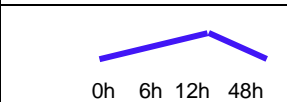
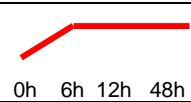
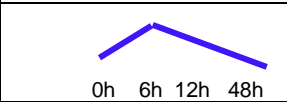
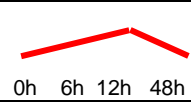
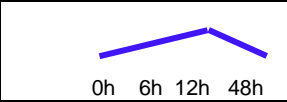
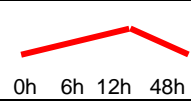
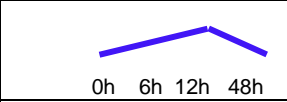
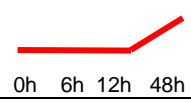
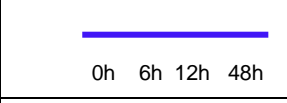
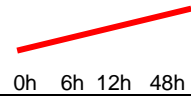
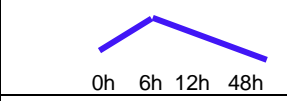
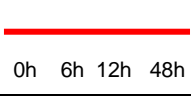
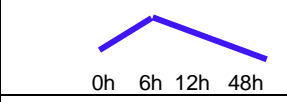
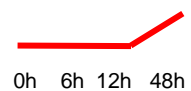
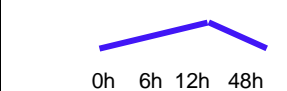
Por fim, números significativamente maiores de MA expressando CD206 foram observados nos animais imunizados com PspA5-wP antes do desafio. Estes números também estavam levemente elevados nos animais imunizados com wP. O desafio com pneumococo modulou negativamente o número destas células, e também o nível de expressão de CD206 por elas, em todos os grupos. Entretanto, pelo caráter menos inflamatório de populações de macrófagos expressando CD206, conforme discutido acima, é possível que o aumento destas células induzido pela vacina PspA5-wP tenha contribuído para uma resposta inflamatória mais moderada após o desafio.

Comparando o perfil da resposta ao desafio entre os camundongos BALB/c dos experimentos de imunização e os camundongos AIRmin e AIRmax, alguns fatores chamam a atenção: (1) O número de MA CD86⁺ e a expressão desta molécula aumentaram em resposta ao desafio em todas as condições avaliadas. Assim, apesar de participar na ativação de células T, esta população sozinha não consegue conter a infecção; (2) apesar de haver uma diminuição do número de MA CD80⁺ nos camundongos AIRmax e nos camundongos imunizados com wP ou PspA5-wP, observou-se um aumento de expressão desta molécula em 6 h após o desafio nos camundongos AIRmax e em 12 h após o desafio nos camundongos imunizados com wP ou PspA5-wP. Estes dados podem indicar um estado mais “ativado” dos MAs destes animais e esta população pode contribuir para a eliminação da bactéria, dependendo de outros fatores, como a presença de anticorpos, por exemplo; (3) o aumento da população de MA CD206⁺ nos animais vacinados com PspA5-wP é claro antes do desafio. No entanto, o desafio com

pneumococo modula negativamente esta população em todas as condições testadas, menos nos camundongos AIRmin. Isto ocorre quando avaliamos tanto o número total de MA CD206⁺, a porcentagem destas células dentro da população de MA e os níveis de expressão desta molécula. Assim, é claro que estes camundongos estão polarizando uma resposta diferente quanto a esta população, após o desafio com pneumococo.

A tabela abaixo resume os principais resultados obtidos com os camundongos AIRmax e AIRmin (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfil da resposta dos camundongos AIRmin e AIRmax ao desafio respiratório invasivo com a linhagem ATCC6303 de pneumococo.

	AIRmin	AIRmax
Sobrevivência 3×10^5	0%	63,6%
Carga bacteriana no BALF		
Carga bacteriana no pulmão		
Total de células no BALF		
Influxo de neutrófilos		
Macrófagos alveolares (MA)	 a	 a
CD206 ⁺		
IFN- γ		
TNF- α e IL-6		
IL-4 e IL-5	 b	
IL-10	 c	
IL-17		
CXCL10 e CCL5		
MMP-2 e MMP-3	 a	 a
MMP-8 e proMMP-9		

^a Níveis basais semelhantes; ^b Pico em 12 h mais homogêneo quando comparado com AIRmax; ^c Pico em 12 h mais elevado quando comparado com AIRmax.

6 CONCLUSÕES

Os camundongos AIRmax são mais resistentes que os camundongos AIRmin à infecção por pneumococo, sendo capazes de controlar a carga bacteriana no trato respiratório e a resposta inflamatória.

Os camundongos AIRmin responderam ao desafio por pneumococo com o aumento na população de MA CD206⁺. É possível que esta população esteja relacionada à maior susceptibilidade destes animais.

Algumas características encontradas na resposta inata dos camundongos AIRmin ao desafio por pneumococo, como a baixa expressão ou a expressão tardia de MMPs e a menor resistência dos macrófagos e neutrófilos à apoptose, podem ter contribuído para a falha no controle da infecção. Estas conclusões estão de acordo com dados publicados na literatura, utilizando outros modelos. Seria importante comparar a capacidade dos macrófagos e neutrófilos dos camundongos AIRmin e AIRmax em fagocitar o pneumococo.

O perfil dos MA nos camundongos PspA5-wP em resposta ao desafio com pneumococo foi semelhante ao observado nos animais imunizados apenas com wP. Assim, apesar do papel destas células não poder ser descartado, outros fatores, como a presença de anticorpos específicos, participam na resposta imune adaptativa induzida por esta vacina.

REFERÊNCIAS*

Aberdein JD, Cole J, Bewley MA, Marriott HM, Dockrell DH. Alveolar macrophages in pulmonary host defence the unrecognized role of apoptosis as a mechanism of intracellular bacterial killing. *Clinical and experimental immunology*. 2013 Nov;174(2):193-202.

Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods*. 1990 Sep;132(2):191-5.

AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev*. 1995 Dec;59(4):591-603.

Andrade AL, Ternes YM, Vieira MA, Moreira WG, Lamaro-Cardoso J, Kipnis A, et al. Direct effect of 10-valent conjugate pneumococcal vaccination on pneumococcal carriage in children Brazil. *PLoS One*. 2014;9(6):e98128.

Araujo LM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, et al. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol*. 1998 Sep;28(9):2913-20.

Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008 Sep;181(6):3733-9.

Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 Mar;19(3):187-95.

Borrego A, Peters LC, Jensen JR, Ribeiro OG, Koury Cabrera WH, Starobinas N, et al. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly *Nramp1*) effects in selected mouse lines. *Microbes Infect*. 2006 Oct;8(12-13):2766-71.

Calbo E, Garau J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Feb;35(2):107-13.

Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis*. 2010 Jul;202(1):29-38.

Carneiro PoS, Peters LC, Vorraro F, Borrego A, Ribeiro OG, Starobinas N, et al. Gene expression profiles of bone marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammations: searching for genes in acute inflammation modifier loci. *Immunology*. 2009 Sep;128(1 Suppl):e562-71.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Constenla DO. Economic impact of pneumococcal conjugate vaccination in Brazil, Chile, and Uruguay. *Rev Panam Salud Publica*. 2008 Aug;24(2):101-12.

Craig A, Mai J, Cai S, Jeyaseelan S. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun*. 2009 Feb;77(2):568-75.

Dallaire F, Ouellet N, Bergeron Y, Turmel V, Gauthier MC, Simard M, et al. Microbiological and inflammatory factors associated with the development of pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*. 2001 Aug;184(3):292-300.

Darrieux M, Moreno AT, Ferreira DM, Pimenta FC, de Andrade AL, Lopes AP, et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. *J Med Microbiol*. 2008 Mar;57(Pt 3):273-8.

Dockrell DH, Whyte MK, Mitchell TJ. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest*. 2012 Aug;142(2):482-91.

Domingues CM, Verani JR, Montenegro Renoier EI, de Cunto Brandileone MC, Flannery B, de Oliveira LH, et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. *Lancet Respir Med*. 2014 Jun;2(6):464-71.

dos Santos SR, Passadore LF, Takagi EH, Fujii CM, Yoshioka CR, Gilio AE, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Vaccine*. 2013 Dec;31(51):6150-4.

Ferreira DM, Darrieux M, Oliveira ML, Leite LC, Miyaji EN. Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Mar;15(3):499-505.

Ferreira DM, Moreno AT, Cianciarullo AM, Ho PL, Oliveira ML, Miyaji EN. Comparison of the pulmonary response against lethal and non-lethal intranasal challenges with two different pneumococcal strains. *Microb Pathog*. 2009 Sep;47(3):157-63.

Ghaffar F, Barton T, Lozano J, Muniz LS, Hicks P, Gan V, et al. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. *Clin Infect Dis*. 2004 Oct;39(7):930-8.

Gladstone RA, Jefferies JM, Faust SN, Clarke SC. Continued control of pneumococcal disease in the UK - the impact of vaccination. *J Med Microbiol*. 2011 Jan;60(Pt 1):1-8.

Gladstone RA, Jefferies JM, Faust SN, Clarke SC. Pneumococcal 13-valent conjugate vaccine for the prevention of invasive pneumococcal disease in children and adults. *Expert Rev Vaccines*. 2012 Aug;11(8):889-902.

Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010 May;32(5):593-604.

Hammerschmidt S, Agarwal V, Kunert A, Haelbich S, Skerka C, Zipfel PF. The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol*. 2007 May;178(9):5848-58.

Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis*. 2007 Nov;196(9):1346-54.

Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5889-900.

Hong JS, Greenlee KJ, Pitchumani R, Lee SH, Song LZ, Shan M, et al. Dual protective mechanisms of matrix metalloproteinases 2 and 9 in immune defense against *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol*. 2011 Jun;186(11):6427-36.

Hussel T, Bell TJ, et al. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb; 14(2):81-93.

Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, de Franco M, et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur J Immunol*. 1992 Oct;22(10):2555-63.

Jounio U, Juvonen R, Bloigu A, Silvennoinen-Kassinen S, Kaijalainen T, Kauma H, et al. Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. *Clin Respir J*. 2010 Oct;4(4):222-9.

Kadioglu A, Andrew PW. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol*. 2004 Mar;25(3):143-9.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews Microbiology*. 2008 Apr;6(4):288-301.

Kim SH, Song JH, Chung DR, Thamlikitkul V, Yang Y, Wang H, et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1418-26.

Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis*. 1981 1981 Mar-Apr;3(2):246-53.

Klemets P, Lyytikäinen O, Ruutu P, Ollgren J, Kaijalainen T, Leinonen M, et al. Risk of invasive pneumococcal infections among working age adults with asthma. *Thorax*. 2010 Aug;65(8):698-702.

Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol*. 2012 Apr;14(4):460-6.

Lima FA, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Palma GM, Ferreira JM, et al. Controlled inflammatory responses in the lungs are associated with protection elicited by a pneumococcal surface protein A-based vaccine against a lethal respiratory challenge with *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Sep;19(9):1382-92.

Lima FA, Miyaji EN, Quintilio W, Raw I, Ho PL, Oliveira ML. Pneumococcal Surface Protein A does not affect the immune responses to a combined diphtheria tetanus and pertussis vaccine in mice. *Vaccine*. 2013 May;31(20):2465-70.

Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(5):403-11.

Matthias KA, Roche AM, Standish AJ, Shchepetov M, Weiser JN. Neutrophil-toxin interactions promote antigen delivery and mucosal clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol*. 2008 May;180(9):6246-54.

Mina MJ, McCullers JA, Klugman KP. Live attenuated influenza vaccine enhances colonization of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in mice. *MBio*. 2014;5(1).

Misharin, AV, et al. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013,Oct;49(4):503-10.

Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*. 2010 May;16(5):411-8.

Miyaji EN, Oliveira ML, Carvalho E, Ho PL. Serotype-independent pneumococcal vaccines. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Sep;70(18):3303-26.

Moreno AT, Oliveira ML, Ferreira DM, Ho PL, Darrieux M, Leite LC, et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Mar;17(3):439-46.

Moyo SJ, Steinbakk M, Aboud S, Mkopi N, Kasubi M, Blomberg B, et al. Penicillin resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children under 5 years of age in Dar es Salaam, Tanzania. *J Med Microbiol*. 2012 Jul;61(Pt 7):952-9.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009 Sep 12;374(9693):893-902.

Oliveira ML, Miyaji EN, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Lima FA, et al. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. *PLoS One*. 2010;5(5):e10863.

Parks, WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):617-29.

Price KE, Greene NG, Camilli A. Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2012 Jul;194(14):3651-60. PubMed PMID: 22563048.

Quin LR, Onwubiko C, Moore QC, Mills MF, McDaniel LS, Carmicle S. Factor H binding to PspC of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines in vitro and enhances invasion of mouse lungs in vivo. *Infect Immun*. 2007 Aug;75(8):4082-7.

Ren B, Li J, Genschmer K, Hollingshead SK, Briles DE. The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci in vitro. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2012 Oct;19(10):1574-82.

Ren B, McCrory MA, Pass C, Bullard DC, Ballantyne CM, Xu Y, et al. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol*. 2004 Dec;173(12):7506-12.

Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):114-22.

Ribeiro OG, Maria DA, Adriouch S, Pechberty S, Cabrera WH, Morisset J, et al. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *J Leukoc Biol*. 2003 Oct;74(4):497-506.

Rudan I, O'Brien KL, Nair H, Liu L, Theodoratou E, Qazi S, et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *J Glob Health*. 2013 Jun;3(1):010401.

Salcedo-Rivillas C, Debrie AS, Miyaji EN, Ferreira JM, Raw I, Loch C, et al. Pertussis toxin improves immune responses to a combined pneumococcal antigen and leads to enhanced protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Jul;21(7):972-81.

Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol*. 2003 Jun;24(6):314-9.

Schreiber G, Tsykin A, Aldred AR, Thomas T, Fung WP, Dickson PW, et al. The acute phase response in the rodent. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;557:61-85; discussion - 6.

Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5031-40.

Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, Hammitt LL, Zulz T, Hurlburt DA, et al. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA.* 2007 Apr;297(16):1784-92.

Standish AJ, Weiser JN. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J Immunol.* 2009 Aug;183(4):2602-9.

Steel HC, Cockeran R, Anderson R, Feldman C. Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:490346.

Stiffel C, Ibanez OM, Ribeiro OG, Decreusefond C, Siqueira M, Mouton D, et al. Genetic regulation of the specific and non-specific component of immunity. *Immunol Lett.* 1987 Dec;16(3-4):205-17.

Talbot TR, Hartert TV, Mitchel E, Halasa NB, Arbogast PG, Poehling KA, et al. Asthma as a risk factor for invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med.* 2005 May;352(20):2082-90.

Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1999 Sep;67(9):4720-4.

van Rossum AM, Lysenko ES, Weiser JN. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect Immun.* 2005 Nov;73(11):7718-26.

Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet.* 2013 Apr;381(9875):1405-16.

Webster J, Theodoratou E, Nair H, Seong AC, Zgaga L, Huda T, et al. An evaluation of emerging vaccines for childhood pneumococcal pneumonia. *BMC Public Health.* 2011;11 Suppl 3:S26.

Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet.* 2011 Dec;378(9807):1962-73.

Weiser JN. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J Mol Med (Berl).* 2010 Feb;88(2):97-102. PubMed PMID: 19898768.

Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med*. 2003 May;348(18):1737-46.

Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J Clin Invest*. 2009 Jul;119(7):1899-909.