

Irineu Francisco Delfino Silva Massaia

**Avaliação da resposta imune inata *in situ* no pulmão na
doença pneumocócica invasiva**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Irma Seixas
Duarte

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Massaia, Irineu Francisco Delfino Silva

Avaliação da resposta imune inata *in situ* no pulmão na doença pneumocócica invasiva / Irineu Francisco Delfino Silva Massaia. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Maria Irma Seixas Duarte.

Descritores: 1.*Streptococcus pneumoniae* 2.Doença pneumocócica invasiva
3.Imunidade inata 4.Resposta inflamatória aguda

USP/FM/DBD-316/10

Dedico esta tese a minha filha Sara

Agradecimentos

Agradeço a Deus onipotente, que nos deu o dom da vida e ilumina todos os nossos passos.

Agradeço a minha família, em especial, a minha mãe Lucia, que nunca mediu esforços para me tornar um homem melhor.

Agradeço ao meu amor Adriana, que soube tornar minha vida completa.

Agradeço hoje e sempre a Professora Maria Irma Seixas Duarte, minha orientadora e exemplo de dedicação, brilhantismo e entusiasmo acadêmico.

Agradeço a Prof^ª Dr^ª Roosecelis Araújo Brasil, virtuosa amiga, exemplo de generosidade e humildade sem perder a retidão de caráter e profissionalismo.

Agradeço ao Prof. Dr. Valdir Golin, Diretor Clínico da Santa Casa de São Paulo, modelo de líder, médico e professor para toda a minha geração acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Conceição Lima, constante encorajador de minhas ações acadêmicas.

Agradeço aos meus protetores e padrinhos de coração, Prof. Dr. Igor Mimica e Prof^ª. Dr^ª Lycia Mara Jenné Mimica.

Agradeço a Prof^ª. Dr^ª. Vera Luiza Capelozzi, por sua colaboração com os controles e por suas valiosas sugestões.

Agradeço a minha amiga Luciane Kanashiro, não só pela confecção das reações imunohistoquímicas, mas também pela paciência nas frequentes solicitações e dúvidas.

Agradeço a Dr^ª Carla Pagliari, pela presteza e dedicação, não só na confecção das lâminas e reações, mas também pelo incentivo nos momentos atribulados.

Agradeço aos amigos do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis, em especial Rosana e também Cleusa, Wellington, Elaine e Mônica, que tornaram inesquecíveis os dias de convivência no Laboratório e colaboraram diretamente na concretização desta tese.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo pelo fornecimento das hemoculturas dos casos.

Agradeço a Fundação Antonio-Antonieta Cintra Gordino, em especial, ao Dr. Wail Chaves (in memorian), meu segundo pai, Dr. Carlos Alberto Pereira (in memorian) e Dr. Ismar Augusto Procópio de Oliveira.

Agradeço aos meus amigos Felipe Marinho, Nelson Samesima e Antonio Appezzato.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro para a pesquisa.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Epidemiologia da infecção pneumocócica	5
3.2 Panorama da infecção por <i>Streptococcus pneumoniae</i>	5
3.3 O <i>Streptococcus pneumoniae</i> , agente infeccioso determinante da DPI	9
3.4 Mecanismos de resistência do <i>Streptococcus pneumoniae</i> à penicilina	15
3.5 Fatores de mortalidade pelo <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
3.6 Síndromes clínicas causadas pelo <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
3.7 Diagnóstico do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	23
3.8 Prevenção ao <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
3.9 Imunopatogênese da infecção pelo <i>Streptococcus pneumoniae</i>	30
3.9.1 Complemento	31
3.9.2 Proteínas surfactantes	33
3.9.3 Receptores Toll	34
3.9.4 Células dendríticas	35
3.9.5 O papel das citocinas	37
4. MÉTODOS	40
4.1 Casuística	40
4.2 Critérios de inclusão e exclusão	41
4.3 Processamento das amostras	41
4.4 Métodos imuno-histoquímicos	42
4.5 Método imuno-histoquímico para citocinas	46
4.6 Técnica de imunomarcção para determinação de Caspase-3	48
4.7 Estudos semiquantitativo e quantitativo	48
4.8 Análise estatística	51
5. RESULTADOS	52
5.1 Aspectos clínicos e laboratoriais	52
5.2 Alterações histopatológicas do pulmão na DPI	54
5.2.1. Epitélio e luz alveolar	54
5.2.2 Septos alveolares	55
5.2.3 Alterações morfológicas brônquicas	56
5.3 Avaliação imune no pulmão na DPI	56
5.3.1. Avaliação de linfócitos TCD4, TCD8 e TCD20 na DPI e nos controles	58
5.3.2 Avaliação dos macrófagos	60
5.3.3 Avaliação de células Natural Killer (NK)	61
5.3.4 Avaliação das células dendríticas	62
5.3.5 Avaliação de complemento, ICAM-1, Toll-2 e SP-A	63
5.3.6 Avaliação da Caspase-3	66
5.4 Avaliação de citocinas	69
6. DISCUSSÃO	77

6.1 Considerações clínico-laboratoriais	77
6.2 Achados histopatológicos na DPI em comparação com a literatura	81
6.3 Como se dá a progressão do pneumococo e a reação do tecido pulmonar na DPI?	82
6.4 Resposta imune	84
6.4.1 Macrófagos (CD68 e CD14) e pneumococo na DPI	85
6.4.2 Células Natural Killer (NK) na DPI	86
6.4.3 Células de Langerhans CD1a na DPI	87
6.4.4 Células dendríticas S-100 na DPI	88
6.4.5 Apoptose, citocinas pró-inflamatórias, Toll e SP-A na DPI	88
7. CONCLUSÃO	94
8. ANEXOS	96
9. REFERÊNCIAS	110

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag-Ac	Antígeno-anticorpo
ADE	<i>Antibody dependent enhancement</i> , anticorpos facilitadores
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , célula apresentadora de antígeno
BALT	Tecido linfoide associado à mucosa brônquica
BSA	Solução de albumina bovina
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , grupo de diferenciação
C3	Fração 3 do complemento
DAB	Diamino-benzidina
DC	Dendritic cell, célula dendrítica
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
ELISA	<i>Enzyme – Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	E outros
gyrA	Gene <i>gyrA</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	<i>Human immunodeficiency vírus</i> , vírus da imunodeficiência adquirida
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i> , antígeno leucocitário humano
ICAM	<i>Intracellular Cell Adhesion Molecule</i> , molécula de adesão intracelular
IFNα	<i>Interferon-alpha</i>
IFNγ	<i>Interferon-gamma</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IRAK-4 associada 4	<i>Interleukin-1receptor-associated kinase 4</i> , Interleucina -1 receptor quinase
LTA	Ácido lipoteicoico
LTCD4+	Linfócitos TCD4+
LTCD8+	Linfócitos TCD8+
mefA	
MIC	Concentração inibitória mínima
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , fator de histocompatibilidade maior
NF-κB	Nuclear factor κ B, fator nuclear κ B
NK	Natural Killer, assassinas naturais
PBP	Proteínas Ligadoras de Penicilina
PBS	Solução salina de fosfato tamponada
PPG	Peptideoglicano
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> , receptores de padrão de reconhecimento
PAMP patógeno	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , padrão molecular associado a
parC	Gene <i>parC</i>
PspA	Proteína de superfície pneumocócica A
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
SABC	<i>Streptavidin-biotin complex</i> , complexo estreptavidina-biotina
SP-A	Proteína surfactante A
SP-D	Proteína surfactante D
SPEA	Super antígeno A
SPEC	Super antígeno C
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor – Alpha</i> , fator de necrose tumoral alpha

TGFβ	<i>Transforming Growth Factor – Beta</i> , fator de transformação do crescimento
beta	
TLR-2	<i>Toll-like receptor 2</i> , receptor semelhante a Toll-2
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i> , receptor semelhante a Toll-4
Tris\EDTA	Tampão ácido acético diaminotetraetileno
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> , molécula de adesão de célula vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gram no escarro (A) e cultura (B) de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	10
Figura 2: Formas de apresentação da doença pneumocócica.	23
Figura 3: Demonstração do método quantitativo da imunomarcção das células TCD8. Aumento de 40 vezes.	50
Figura 4: DPI – Pneumonia lobar: A – Visão panorâmica (HE- X 40); B – Pneumonia lobar e hemorragia intra-alveolar (HE- X 40); C – Pneumonia lobar em fase de hepatização cinzenta (HE- X 100); D – Alvéolo pulmonar preenchido por neutrófilos, macrófagos e debris celulares, espessamento septal associado à edema, congestão capilar e discreto infiltrado inflamatório (HE- X 400).	56
Figura 5: Pulmão – DPI – Imunomarcção de linfócitos TCD4 (A) e TCD8 (B), CD68 (C), CD57 (D), CD14 (E), CD1a (F) (SABC, X 400).	67
Figura 6: Pulmão – DPI – Imunomarcção de S100 (A) e ICAM-1 (B), SP-A (C), Toll-2 (D), Caspase (E) e CD34 (F) (SABC, X 400).	68
Figura 7: Pulmão – DPI – Imunomarcção de IL-6 (A) e IL-8 (B), IL-10 (C), TNF- α (D), IFN- γ (E) e IL1- β (F) (SABC, X 400).	76
Figura 8: Patogênese da doença pneumocócica invasiva no pulmão.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de anticorpos empregados em imuno-histoquímica.	47
Tabela 2 – DPI : Distribuição por sexo e idade de 22 casos de necropsia de doença pneumocócica invasiva do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2003.	52
Tabela 3 – Perfil epidemiológico: fatores de risco e de mortalidade na doença pneumocócica invasiva.	53
Tabela 4 – Doença pneumocócica invasiva: análise quantitativa dos fenótipos celulares do pulmão, C3, ICAM-1, SP-A, Caspase e Toll-2 na DPI e controles.	57
Tabela 5 – Doença pneumocócica invasiva: análise quantitativa no pulmão <i>in situ</i> da produção de citocinas celulares em áreas selecionadas envolvidas na DPI e controles (C).	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição celular em luz alveolar de pacientes com DPI demonstrando o predomínio de células do fenótipo CD68+ e CD14+.	58
Gráfico 2 – Distribuição celular em septos alveolares de pacientes com DPI demonstrando o predomínio de células do fenótipo CD68+, CD14+ e TCD4+.	58
Gráfico 3 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para linfócitos TCD4 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	59
Gráfico 4 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para linfócitos TCD8 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	59
Gráfico 5 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para linfócitos CD20 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	60
Gráfico 6 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para macrófagos (CD68) na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o- luz alveolar) (● - septos).	61
Gráfico 7 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para macrófagos (CD14) na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	61
Gráfico 8 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para CD57 na luz alveolar e septos na DPI (o - luz alveolar) (● - septos).	62
Gráfico 9 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para S100 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o- luz alveolar) (● - septos).	63
Gráfico 10 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para CD1a na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	63
Gráfico 11 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para C3 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	64
Gráfico 12 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcacão para ICAM-1 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	64

Gráfico 13 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para Toll-2 na luz alveolar e septos na doença pneumocócica invasiva e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	65
Gráfico 14 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para SP-A na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	65
Gráfico 15 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para Caspase-3 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	66
Gráfico 16 – Imunoexpressão de citocinas em luz alveolar de pacientes com DPI.	70
Gráfico 17 – Imunoexpressão de citocinas septos alveolares de pacientes com DPI.	70
Gráfico 18 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para IL1 β na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	71
Gráfico 19 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para IL-2R na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	71
Gráfico 20 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para IL-4 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	72
Gráfico 21 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para IL-6 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	72
Gráfico 22 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para IL-8 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	73
Gráfico 23 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para IL10 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	73
Gráfico 24 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para IFN γ na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	74
Gráfico 25 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para TNF α na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	74
Gráfico 26 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para TGF β na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).	75

Massaia IFDS. Avaliação da resposta imune inata *in situ* no pulmão na doença pneumocócica invasiva [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2010. 148p.

INTRODUÇÃO: A doença pneumocócica invasiva (DPI) tem alta mortalidade sendo o pulmão órgão de intenso acometimento. Na DPI caracterizou-se localmente importante processo inflamatório agudo com expressivo aumento de macrófagos, polimorfonucleares e fenômenos exsudativos como edema e hemorragia intra-alveolar. Concretizou-se uma resposta inflamatória proeminente com redução dos fenômenos de apoptose que se traduziu por aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias, exceto IL-6 e IL-8, aumento de Toll-2, ativação do complemento, aumento de expressão de ICAM- 1 e CD 14 que em conjunto favorecem o estabelecimento dos fenômenos inflamatórios. A diminuição significativa das células NK e das células de Langherhans, IL-6 e IL-8 reflete comprometimento da imunidade inata. Tal comprometimento poderia ser responsável pela diminuição dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ com consequente baixa produção de IFN γ . Em resumo, as lesões teciduais graves na DPI seriam decorrentes do comprometimento parcial da imunidade inata, em especial das células NK e das células de Langherhans, do prejuízo da imunidade adaptativa e da redução da apoptose como possível estratégia defensiva do pneumococo.

Descritores: 1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Doença pneumocócica invasiva 3. Imunidade inata 4. Resposta inflamatória aguda

Massaia IFDS. Evaluation of the innate immune response *in situ* in lung in invasive pneumococcal disease [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2010. 148p.

INTRODUCTION: Invasive pneumococcal disease (IPD) is a condition with high mortality rates, the lungs being intensely attacked. The *in situ* immune response was determined, in blocks recovered from 22 necropsies of adults who died from IPD in the lungs, by quantitative immune cell phenotype (CD57-NK, CD1a, CD68, antigen S-100, TCD4, TCD8, CD20), Complement-C3, ICAM-1, CD14, Caspase-3 and cytokine (interferon γ , TNF α , TGF β , interleukin - IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10), Toll-2 and SP-A (surfactant). A locally important acute inflammation process was characterized in IPD, with significant rise in macrophages, neutrophils and exsudative phenomena such as edema and intra-alveolar hemorrhage. Compared with the lungs from age-matched controls, results from patients with IPD showed significant depletion of NK, CD1a, CD4+, CD8+, CD20+ cells, interferon γ , IL-4, IL-6, IL-8, TGF β and Caspase-3 (apoptosis). On the other hand, S-100, Toll-2, IL-1, IL-2R, IL-10, ICAM-1, CD14 and SP-A were more frequently seen in the alveoli of patients with IPD than in controls. A pronounced inflammatory response was detected, with decrease in apoptosis phenomena that translated into significant increase of pro-inflammatory cytokines, except for IL-6 and IL-8, increase in Toll-2, complement activation, increased ICAM-1 and CD-14 expression, which altogether favored installation of the inflammatory processes. A significant decrease in NK and Langherhans cells, IL-6 and IL-8 reflect the harm to the innate immune system. This could respond for the decrease in TCD4+ and TCD8+ lymphocytes, with a consequent low IFNy output. Briefly, the severe tissue lesions in IPD could be a consequence of the partial damage to the innate immunity, particularly of NK and Langherhans cells, of adaptive immune dysfunction, and of apoptosis reduction possibly as a defense strategy of the pneumococcus.

Descriptors: 1. *Streptococcus pneumonia* 2. Invasive pneumococcal disease 3. Innate immunity 4. Acute inflammatory response

1 – Introdução

A infecção pneumocócica é alvo de preocupação em todo o mundo em virtude de sua gravidade e frequência. *Streptococcus pneumoniae* é um patógeno humano de excelência, podendo causar desde infecções menos graves como conjuntivites, otites, sinusites e pneumonias não bacterêmicas até infecções muito graves em que o pneumococo é encontrado se multiplicando em locais estéreis (doença pneumocócica invasiva) como pneumonias bacterêmicas, infecção de corrente sanguínea, meningites, osteomielites, empiemas, endocardites, artrites e peritonites (Jetté et al., 2001; Kertész et al., 1998; Feikin et al., 2000). O pneumococo causa mais mortes por infecção invasiva do que qualquer outra bactéria e é a quinta causa de morte em todo o mundo (International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, <http://www.slidesonline.com/isppd02/welcome.htm>). A literatura registra que pouca mudança houve na epidemiologia da infecção pneumocócica a despeito da introdução de agentes antimicrobianos ativos e que um significativo número de mortes continuou ocorrendo (Austrian et al., 1964). É crescente a emergência de cepas resistentes a antibióticos, tornando a decisão terapêutica cada vez mais desafiadora (Brandileone et al., 1998; Hortal et al., 2001; Schito et al., 2005). A prevenção por meio de vacinação tem sido recomendada em diversos países (MMWR, 1997; WHO, 1998; Protin et al., 2005). Entretanto, a efetividade da vacina polissacarídica 23 valente é questionável, tendo potência reduzida em idosos (Schenkein et al., 2008 A; Schenkein et al., 2008 B; Shapiro et al., 1991). Os avanços

obtidos com as vacinas para o pneumococo não podem ser considerados a solução completa em razão das limitações das vacinas frente à variabilidade de sorotipos e à plasticidade genômica do pneumococo (Kadioglu et al., 2004). Existem mais de 90 sorotipos de pneumococo e a doença invasiva geralmente ocorre nos primeiros dias de colonização de um novo sorotipo (Gray et al., 1986).

A parede celular do pneumococo possui várias camadas de um polímero linear composto de ácido N-acetil glucosamina-N-acetil murâmico chamado peptídeoglicano (PPG), que serve de gatilho para a inflamação mediada pela resposta imune inata (Garcia-Bustos et al., 1987; Dziarski et al., 1998). Outros constituintes da parede celular são os ácidos teicoicos (LTA) e os ácidos telurônicos, ligados covalentemente ao PPG. A união PPG-LTA tem atividade “endotoxina-like”, que promove ativação celular de mediadores inflamatórios, ativação de neutrófilos, do complemento, da opsonização, produção de óxido nítrico e citocinas (TNF, IL-1 e IL-6) (Fischer et al., 1997; Rijineveld et al., 2001; Bergeron et al., 1998).

O pneumococo produz enzimas importantes no processo de infecção, capazes de aumentar a invasão e a disseminação tais como a pneumolisina, responsável pela inibição da quimiotaxia de neutrófilos, pela proliferação de linfócitos, pela síntese de imunoglobulinas, facilitando a adesão microbiana e consequente infecção (Rijineveld et al., 2002). Outras enzimas auxiliam na virulência do pneumococo como a neuraminidase, a hialuronidase e a autolisina (Kadioglu et al., 2004). A resposta do hospedeiro se caracteriza por intensa ativação de macrófagos e neutrófilos, expressão de citocinas (IL-

1, TNF- α , IL-8, IL-12) (Rijneveld et al., 2001; Takashima et al., 1997; Lauw et al., 2002), além da ativação do complemento notadamente a via clássica (Paterson et al., 2006). Participam também dessa resposta do hospedeiro, os receptores de reconhecimento de padrão microbiano (PRRs) que reconhecem constituintes moleculares associados a patógenos (PAMPs). Exemplos de PRRs são a proteína C reativa e a família de receptores Toll-like (TLR) notadamente TLR-2 (Paterson et al., 2006). Por outro lado, as proteínas surfactantes, além de agirem impedindo o colapso alveolar durante a expiração, também desempenham importante papel na imunidade inata com a promoção da fagocitose do pneumococo e modulação da imunidade celular (Paterson et al., 2006; Whitsett et al., 2005).

A habilidade da resposta inflamatória em controlar a multiplicação bacteriana sem liberar debris inflamatórios por lise bacteriana excessiva é essencial para a recuperação e representa o divisor de águas entre vida e morte no curso da doença pneumocócica invasiva (DPI).

Acreditamos que há um campo importante de investigação na interação parasita-hospedeiro e seus mecanismos de indução de sepse, principalmente no tocante à resposta imune inata, necessitando de conhecimentos mais aprofundados que possam contribuir para modificar o atual cenário dramático da DPI.

2 – Objetivo

Na doença pneumocócica invasiva pretende-se contribuir para a avaliação da resposta imune inata dos pulmões através de:

- Caracterização das alterações histopatológicas à microscopia de luz por meio de análise semiquantitativa dos cortes de pulmão corados pela hematoxilina-eosina.
- Avaliação qualitativa e quantitativa dos fenômenos de morte celular (necrose e apoptose) nos pulmões por meio de técnicas imuno-histoquímicas.
- Caracterização fenotípica das células do infiltrado inflamatório pulmonar (NK, CD68, CD1A, CD14, CD34, S100, TCD4, TCD8, CD20), de citocinas (IL-1 β , IL-2R, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TGF- β), Toll 2, Complemento (C3), presentes no pulmão por meio da técnica de imunomarcção.

3 – Revisão da Literatura

3.1 Epidemiologia da infecção pneumocócica

A frequência e a gravidade tornaram a infecção pneumocócica alvo de preocupação em todo o mundo. Homens são mais acometidos pela doença pneumocócica tanto crianças quanto adultos (Klein, 1981; Robinson et al., 2001). Em estudo entre adultos imunocompetentes com faixa etária entre 18 e 64 anos, com doença pneumocócica invasiva (DPI) identificada, o sexo masculino foi fator de risco individual para doença invasiva verificado em análise de caso-controle após controle de raça, doenças de base, cigarro, nível educacional e contato com crianças (Nuorti et al., 2000). Certas raças e grupos étnicos parecem ter um risco maior de DPI, como negros e índios norte-americanos (Cortese et al., 1992; Pastor et al., 1998) e aborígenes da Austrália Central (Torzillo et al., 1995; Trotman et al., 1995). Fatores contribuintes para essas ocorrências raciais são multifatoriais e podem incluir diferenças nas condições de vida e alta prevalência de imunocomprometimento (Dworkin et al., 2001; Gebo et al., 1996; Nuorti et al., 2000).

3.2 Panorama da infecção por *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae é um patógeno humano de excelência, sendo relevante causa de pneumonia, meningite, otite média e septicemia,

tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (Austrian et al., 1981; Austrian et al., 1986; Austrian et al., 1992; Bohr et al., 1984; Brandileone et al., 1998). Nos primeiros, lidera a mortalidade em crianças com menos de 5 anos, ultrapassando um milhão de mortes anualmente (CDC, 1995); além de ser preocupante causa de infecção invasiva em idosos (Dee et al., 1977), esplenectomizados (Ejstrud et al., 2000; Moore et al., 2000; Nielsen et al., 1996; Van Dam et al., 1990; Wara et al., 1981) e imunocomprometidos (Durand et al., 1993). A doença pneumocócica foi a principal causa de morte na era pré-antibiótica (Ejstrud et al., 2000) porém, a despeito do uso de antimicrobianos e cuidados de terapia intensiva, a mortalidade continua elevada (Finland et al., 1982; Hortal et al., 2001). Não menos preocupante, são os sobreviventes com sequelas permanentes, podendo chegar a 50% nos casos de meningite (Mitchell et al., 1997).

A nasofaringe é o nicho ecológico do pneumococo, colonizando até 80% dos lactentes e de 20 a 60% dos adultos saudáveis (Goldman et al., 2009; Mandell, 2005; Brandileone et al., 2006). A colonização parece começar já desde os primeiros dias de vida e ser inversamente proporcional à idade. É possível a colonização por mais de um tipo capsular, parecendo ser a colonização assintomática um gatilho para a imunização, uma vez que anticorpos anticapsulares homólogos foram identificados em indivíduos colonizados com um tipo sorológico específico (Goldman et al., 2009; Mandell, 2005). O carreamento em orofaringe de um determinado sorotipo tem períodos variáveis, sendo a duração média nos lactentes de sete

semanas (Mandell, 2005). Todos os 90 sorotipos têm potencial patogênico, variando a frequência com a geografia, condição socioeconômica e comorbidades (Goldman et al., 2009; Mandell, 2005; Brandileone et al., 2006; Nicoletti et al., 2007; Cardozo et al., 2008; Berizin et al., 2007).

Os casos de doença pneumocócica ocorrem geralmente durante os meses de inverno, onde as taxas de transmissão são maiores (Dowell et al., 2003). Apesar do aumento de casos de doença pneumocócica no inverno, a maior parte das infecções parece ocorrer esporadicamente. Surtos podem ocorrer em instituições de longa permanência, tais como asilos, creches, unidades militares, albergues, escolas e penitenciárias (CDC, 2001; Gleich et al., 2000; Gray et al., 1999; DeMaria et al., 1980; Subramanian et al., 2003; Martin et al., 2003; Proulx et al., 2002). A transmissão do *Streptococcus pneumoniae* ocorre por meio de gotículas da via respiratória de pessoas com doença pneumocócica ou, mais comumente, de pessoas sem doença que são carreadoras desse microrganismo na nasofaringe (Musher, 2003). Seguindo essa exposição ao pneumococo, este pode se estabelecer na nasofaringe do novo hospedeiro. Geralmente, isso resulta em colonização assintomática e o organismo é carregado por semanas a meses (Ek Dahl et al., 1997; Loda FA et al., 1975). Entretanto, algumas vezes, o pneumococo recém-adquirido consegue vencer os mecanismos de defesa do hospedeiro e causa doença. Estudos em crianças sugerem que o risco de progressão de colonização assintomática para a doença parece ser maior imediatamente após a exposição e aquisição do pneumococo na nasofaringe (Gray BM et al., 1980), mas a doença

pneumocócica pode também se desenvolver após meses de colonização (Austrian R et al., 1977).

Em muitas pessoas, a colonização é um evento imunizante, resultando em produção de anticorpos dirigidos contra a cápsula polissacáride da cepa colonizante (Gray BM, et al., 1988; Musher DM, 2003). Deste modo, na grande maioria dos casos, a colonização pode ser caracterizada como uma coexistência pacífica, embora transitória, entre hospedeiro e patógeno potencial. Entretanto, mesmo na ausência de doença, a situação não é inteiramente benigna. Os pneumococos carregados na nasofaringe podem ser transmitidos para outras pessoas e causarem doença nas susceptíveis (Musher DM, 2003). Além disso, caso as pessoas colonizadas recebam antibióticos, as cepas carregadas podem desenvolver resistência (Hermans et al., 1997; Henriques N et al., 2001).

Embora a doença pneumocócica ocorra em somente uma pequena proporção de pessoas que se tornam colonizadas, a ubiquidade do pneumococo na população humana resulta em grande magnitude de doença (Burman et al., 1985). Diversos fatores característicos de cepas pneumocócicas específicas e a situação imunológica do hospedeiro estão implicados na progressão da colonização assintomática para a doença pneumocócica (Austrian, 1981; Amber et al., 1990; Arlievsky et al., 1998).

A partir da década de 1970, houve descrição de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina em vários países do mundo (Finland et al., 1982) e a outros antibióticos comumente empregados

no tratamento dessas. Já a partir da década de 1980, surgiram relatos crescentes de infecções por cepas multirresistentes (Hortal et al., 2001).

São fatores de risco para a doença pneumocócica invasiva a demência, os distúrbios convulsivos, a insuficiência cardíaca, a doença cerebrovascular, a doença pulmonar obstrutiva crônica, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), as doenças respiratórias virais prévias, o alcoolismo, o tabagismo, a desnutrição, o baixo nível socioeconômico, o diabetes, a cirrose hepática, a anemia falciforme, a insuficiência renal, a deficiência de IgG, a deficiência da função fagocítica e os esplenectomizados (Robinson et al., 2001; Burman et al., 1985; Pastor et al., 1998; Gebo et al., 1996; Shimada et al., 2002).

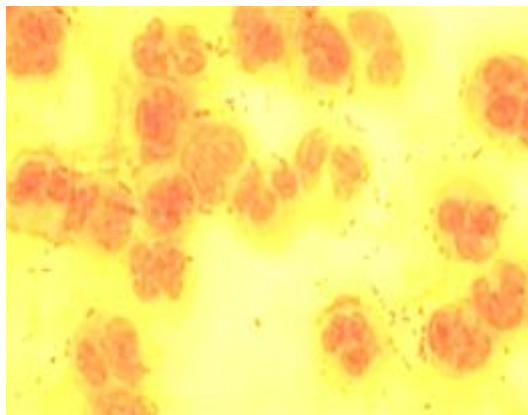
Não obstante, a efetividade da vacina polissacarídica polivalente contra o pneumococo é questionável (Torres et al., 1998; Wara et al., 1981; WHO, 1998).

3.3 O *Streptococcus pneumoniae*, agente infeccioso determinante da DPI

Trata-se de um diplococo gram-positivo, pertencente à família Lactobacillaceae. São cocos com cerca de 1 micrómetro, anaeróbios facultativos, com preferência a condições anaeróbias, gerando energia pela fermentação de carboidratos. Agrupam-se sempre aos pares (diplococos) ou em curtas cadeias, e as estirpes patogênicas possuem cápsula. Não têm motilidade e não formam esporos. Eles são alfa-hemolíticos, ou seja, em

cultura de sangue produzem um halo mucoide esverdeado de destruição parcial de eritrócitos. Os pneumococos são exigentes no meio de cultura, necessitando de vários nutrientes, normalmente fornecidos em cultura de sangue (de vaca ou outro animal).

A



Pneumococos corados pelo método de Gram no escarro

B



Colônias de pneumococo crescendo em placa de ágar

Copyright 2009 Elsevier Inc. www.netterimages.com Netter's International Medicine, 2e

Figura 1: Gram no escarro (A) e cultura (B) de *Streptococcus pneumoniae*

Os pneumococos são sensíveis à optoquina ou bÍlis, detergentes fracos, ao contrário de outros estreptococos, e esta característica é útil para distingui-los.

Nas membranas mucosas, algumas espécies da microflora são comensais e outras são patogênicas (Austrian et al., 1981; Austrian et al., 1986). Os pneumococos são agentes colonizantes de narinas, faringe e laringe em até 60% dos indivíduos adultos (Moore et al., 2000). O carreamento simultâneo de mais de um sorotipo é bem documentado e pode refletir em infecções mistas (Nielsen et al., 1996).

Sua cápsula é o produto microbiano que mais caracteriza a virulência, uma vez que é composta de polissacarídeos antigênicos com ação antifagocítica (WHO, 1998). Existem mais de 90 sorotipos conhecidos (WHO, 1998) servindo de base para a produção de vacinas. A vasta maioria da doença pneumocócica é causada por um número relativamente pequeno de sorotipos. O número de sorotipos pneumocócicos encontrados colonizando pessoas numa determinada comunidade é geralmente maior do que o número de sorotipos causadores de doença invasiva na mesma comunidade (Brueggemann et al., 2003). Em geral, a taxa de doença pneumocócica na população depende da frequência com que os sorotipos invasivos são carreados na nasofaringe (Roberts et al., 1985). Alguns sorotipos podem ser considerados especialmente virulentos com a etapa de carreador constituindo um estado transitório na infecção pneumocócica. Outros sorotipos são frequentemente carreados, mas raramente causam doenças; podendo persistir colonizantes nos pacientes carreadores sãos. A

infecção parece ocorrer mais facilmente seguida de aquisição recente de algum sorotipo quando comparada aos sorotipos que são carregados por longo período, sugerindo que o carregamento nasofaríngeo do pneumococo é acompanhado de desenvolvimento de proteção à infecção para o sorotipo. A taxa de carregamento é inversamente proporcional à idade e aos níveis de anticorpos anticapsulares, sendo o estado imunológico do hospedeiro importante determinante da prevalência e longevidade da manutenção do estado de carreador (Austrian et al., 1986; Singer et al., 1973).

A parede celular possui várias camadas de um polímero linear composto de ácido N-acetil glucosamina-N-acetil murâmico chamado peptídeoglicano (PPG). Pontes peptídicas ligam essas camadas formando uma treliça tridimensional. O PPG compõe 40 a 80% da parede celular nos estreptococos (Van Dam et al., 1990). Outros constituintes da parede celular são os ácidos teicoicos (LTA) e os ácidos telurônicos, ligados covalentemente ao PPG. A união PPG-LTA tem atividade “endotoxina-like” que promove a ativação celular de mediadores inflamatórios, ativação de neutrófilos, do complemento, opsonização, produção de óxido nítrico e citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) (Torres et al; 1998).

A membrana plasmática do pneumococo é composta de lipoproteína ligada ao ácido lipoteicoico por interação hidrofóbica. As proteínas ligadoras de penicilina (PBP) representam pequena porcentagem das proteínas de membrana e são alvos bioquímicos primário da ação de vários antimicrobianos (Van Dam et al., 1990).

O pneumococo produz enzimas importantes no processo de infecção capazes de aumentar a invasão e a disseminação tais como:

Autolisina

Responsável pela quebra das ligações do PPG quando o pneumococo entra na fase estacionária de crescimento (Van Dam et al., 1990), além de indiretamente contribuir com a virulência e resposta inflamatória (Mitchell et al., 1997).

Hialuronidase

Responsável pela degradação da matriz extracelular, uma vez que despolimeriza o ácido hialurônico, facilitando a invasão. Contribui também para a invasão porque degrada o fator C3 do complemento (Bohr et al., 1984).

Pneumolisina

Responsável pela inibição da quimiotaxia de neutrófilos, proliferação de linfócitos, síntese de imunoglobulinas, diminuição do batimento ciliar do epitélio respiratório, facilitando a adesão microbiana e consequente infecção (Austrian et al., 1992; Dee et al., 1977; Durand et al., 1993; Ejstrud et al., 2000; Finland et al., 1982; Feldman et al., 2002).

Neuraminidase

Enzima proteolítica responsável pela promoção da colonização pneumocócica, além de estar implicada na patogênese da meningite por este agente (Brandileone et al., 1998; CDC, 1995).

A proteína de superfície pneumocócica A (PspA) tem estrutura única, apesar de apresentar similaridade com outras proteínas de superfícies de bactérias gram-positivas, e confere poder de invasão ao pneumococo.

O pneumococo também é capaz de produzir exotoxinas:

Toxina Alfa

Proteína responsável pela formação de poros e estimulação de mediadores pró-inflamatórios.

Toxina Pirogênica

Composta pelos superantígenos (SPEA e SPEC) responsáveis pela promoção da febre, choque, coagulação intravascular disseminada, além da produção de imunoglobulinas e autoanticorpos.

Peróxido de Hidrogênio

Toxina que, em associação com a pneumolisina, causa dano pulmonar direto e pode, por difusão livre para dentro das células, oxidar mitocôndrias e DNA com toxicidade celular direta (Pericone et al., 2000; Spellerberg et al., 1996; Berry et al., 1989).

3.4 Mecanismos de resistência do *Streptococcus pneumoniae* à penicilina

A alteração de permeabilidade celular não tem papel na resistência do *Streptococcus pneumoniae* à penicilina. Neste, não há produção de beta-lactamases e a resistência à penicilina não é mediada por plasmídeos.

A resistência envolve alterações de proteínas ligadoras de penicilina (PBP), advindas de múltiplas mutações em vários genes, possivelmente ocorridas por vários caminhos genéticos (Van Dam et al., 1990). Também é aceita a hipótese de uma ou mais introduções de um gene PBP 2b a partir de uma espécie bacteriana não identificada, levando à resistência (Van Dam et al., 1990). O grau de afinidade à PBP 2b confere ao *Streptococcus pneumoniae* a sensibilidade ou a resistência à penicilina (Hortal et al; 2001), sendo a inibição da PBP 2b pela penicilina necessária ao desenvolvimento de lise (Nielsen et al., 1996). As PBPs são enzimas transpeptidases e carboxipeptidases implicadas na síntese da parede bacteriana e constituem os locais de ação primária para os beta-lactâmicos. A resistência aos macrolídeos, antibióticos amplamente usados em infecções pneumocócicas, ocorre por meio de diversos mecanismos, principalmente pela modificação do sítio alvo e por meio de uma bomba de efluxo. A modificação do sítio alvo é causada por uma metilase ribossomal codificada pelo gene *ermB*. Alterações no rRNA 23S mediadas por esse gene podem resultar em resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (Goldman et al., 2009). Já o mecanismo de efluxo ocorre por codificação do gene *mefA*. A

resistência resultante da modificação do sítio alvo está tipicamente associada à resistência de alto nível, em que as concentrações inibitórias mínimas (MICs) são iguais ou superiores a 64 µg/mL, enquanto a resistência resultante da bomba de efluxo está mais relacionada à resistência de baixo nível com MICs de 1 a 32 µg/mL. Outro antibiótico usado amplamente nas infecções pneumocócicas atualmente é a fluoroquinolona. A resistência a esta opção terapêutica ocorre por alterações em um ou em ambos os sítios alvo (topoisomerase II e IV), que geralmente resultam de mutações nos genes *gyrA* e *parC*, respectivamente (Goldman et al., 2009). Em estudo (tese de doutorado) feito por Levin ASS em 1996 na Universidade de São Paulo, para avaliar fatores associados à infecção/colonização por *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina, ele concluiu que a faixa etária de até 3 anos está associada à resistência à penicilina. Sugeriu que as cepas resistentes tinham menor capacidade de invasão, uma vez que a resistência foi associada a uma menor frequência de bacteremias. Demonstrou também alta incidência de resistência à penicilina em nosso meio (22,4%) com letalidade de 24%, sendo 33% em adultos. Estudos mais recentes no Brasil apontam, em média, 15 a 21% de cepas resistentes à penicilina, principalmente associadas aos sorotipos 6B, 14, 19A e 23F (Roberts et al., 1985). Outro estudo com foco na doença pneumocócica invasiva, realizado entre 1993 e 2004, identificou 6.470 casos no Brasil com a prevalência de cepas resistentes variando de 10% a 28% e predominando o sorotipo 14 (Brandileone et al., 2006). Pouco se sabe quanto à participação da resistência antimicrobiana na mortalidade, porém já existem

estudos que não demonstram associação entre resistência a penicilinas e a cefalosporinas e aumento da mortalidade (Hortal et al., 2001).

Mecanismo diferente da resistência bacteriana é a tolerância. Esse fenômeno consiste no fato de a bactéria não sofrer lise, apesar da parada ou da diminuição do seu ritmo de crescimento frente ao antimicrobiano em concentrações equivalentes à concentração inibitória mínima (MIC), ou muito superior a ela (Hortal et al; 2001; Nielsen et al., 1996). A tolerância do *Streptococcus pneumoniae* à penicilina pode ocorrer por deficiência de autolisina (Nielsen et al., 1996; Roberts et al., 1985). Entretanto, existem cepas de pneumococo tolerantes à penicilina com atividade autolítica normal, podendo nestas cepas a autolisina não ser ativada pelo antimicrobiano (Nielsen et al., 1996). A autolisina é responsável por aproximadamente 25% da perda de viabilidade bacteriana durante o tratamento com penicilina (Roberts et al., 1985).

Outros fatores podem influir sobre a tolerância. Cepas tolerantes a 32° C podem sofrer lise a 37° C e cepas líticas em concentrações equivalentes a até 20 vezes a MIC podem ser tolerantes em concentrações muito mais elevadas (“efeito paradoxal”). Estudos mostram que cepas resistentes à lise causam infecções mais graves e com pior evolução em pacientes imunocomprometidos (Roberts et al., 1985).

3.5 Fatores de mortalidade pelo *Streptococcus pneumoniae*

Muitos pacientes morrem devido à doença pneumocócica a despeito do uso efetivo dos agentes antimicrobianos e dos cuidados de terapia intensiva. Alguns fatores determinam esta má evolução:

Bacteremia

17 a 35% dos pacientes que apresentam disseminação do pneumococo em corrente sanguínea morrem (Van Dam et al., 1990; Wara et al., 1981).

Foco extrapulmonar

A mortalidade é muito maior nos casos em que a infecção não é contida no pulmão (Van Dam et al., 1990).

Sorotipo específico

Alguns estudos sugerem que os sorotipos 1, 3, 5, 7, 8 e 12 foram associados à maior mortalidade (Van Dam et al., 1990; Moroney et al., 2001; Martens et al., 2004; Colman et al., 1998; Brueggemann et al., 2003).

Idade

Extremos de idade (menor de 2 anos e maiores de 65) são mais suscetíveis à bacteremia e, portanto, à maior mortalidade (WHO, 1998; Alanee et al., 2007; Gilbert et al., 1994; Kalin et al., 2000; Macfarlane et al., 1982; Fine et al., 1996).

Antígeno capsular polissacáride pneumocócico

Titulos elevados são diretamente proporcionais à mortalidade (WHO, 1998).

Anticorpo capsular polissacáride pneumocócico

Títulos elevados são inversamente proporcionais à mortalidade (WHO, 1998).

Doença de base

Piora o prognóstico, principalmente o diabetes mellitus, a insuficiência renal crônica, as miocardiopatias crônicas, os estados de imunossupressão (HIV, transplantados), doenças linfoproliferativas e leucopenia (Hortal et al., 2001; Roberts et al., 1985; Alanee et al., 2007; Gilbert et al., 1994; Kalin et al., 2000; Macfarlane et al., 1982; Fine et al., 1996).

Complemento

Quanto menor a atividade deste, maior a mortalidade (Hortal et al., 2001). É bem estabelecida a função essencial do complemento na opsonização, fagocitose e morte do *Streptococcus pneumoniae* (Angel et al., 1994; Alper et al., 1970; Cheng et al., 2000; Alcantara et al., 2001; Brown et al., 2002).

3.6 Síndromes clínicas causadas pelo *Streptococcus pneumoniae*

A despeito das características de não ser móvel e de não formar esporos, podendo passar uma falsa impressão de repertório patogênico limitado, o *Streptococcus pneumoniae* tem propriedades fascinantes que lhe

conferem a capacidade de ora colonizarem, ora causarem inflamação e ora invadirem tecidos humanos.

A maior parte das doenças pneumocócicas ocorre quando esta bactéria é carregada de uma área colonizada para outra que, normalmente, não é colonizada ou é estéril (doença pneumocócica invasiva) como a corrente sanguínea, o sistema nervoso central, o pulmão etc. Além disso, pode causar infecções em mucosas, notadamente envolvendo o trato respiratório superior (Musher, 1992). *Streptococcus pneumoniae* é o mais comum agente causal identificado em pneumonias adquiridas na comunidade (Fang et al., 1990; Marston et al., 1997; Marrie, 2001), meningite bacteriana (Schuchat et al., 1997), otite média aguda (Del Beccaro et al., 1992; Block, 1997) e sinusite bacteriana aguda (Lew, et al., 1984; Wald, 1992; Wald et al., 1981). Manifestações menos comuns incluem artrite piogênica (Ross et al., 2003), osteomielite (Arlievsky N et al., 1998), piomiosite (Breton et al., 2001), fascíte necrotizante (Ballon-Landa et al., 2001), endocardite (Aronin et al., 1998), pericardite (Saenz et al., 1998), aneurisama micótico (Naktin et al., 1999), abscesso em sistema nervoso central (Butler et al., 2003), peritonite (Dugi et al., 2001), infecções genito-urinárias (Sirotnak et al., 1996), parotidite (Giglio, et al., 1997), epiglotite (Kessler et al., 1980), celulite periorbitária ou bucal (Givner et al., 2000), mastoidite (Kaplan et al., 2000), endoftalmite (Mulhern et al., 1997) e conjuntivite (Taylor et al., 1999).

Justamente quando falham os mecanismos de clareamento bacteriano nos diferentes tecidos do corpo humano, o pneumococo pode

proliferar e assim estimular uma intensa resposta inflamatória. A chegada de polimorfonucleares e a exsudação de plasma podem servir para interromper a invasão se anticorpos contra constituintes de superfície opsonizarem o pneumococo para a fagocitose. Caso não estejam presentes esses anticorpos, a resposta inflamatória continua e, no caso do trato respiratório, esta inflamação é a doença. Outra situação é quando o pneumococo alcança uma área após quebra de uma barreira natural, por exemplo, lesão da dura-máter leva à invasão das meninges, perfuração do intestino causa peritonite ou abscesso abdominal. Além disso, o pneumococo pode causar doença pela invasão da corrente sanguínea (bacteremia). Esta invasão pode ocorrer no local de colonização, por exemplo, na nasofaringe, causando bacteremia sem foco de infecção reconhecido (bacteremia primária) ou nos pulmões ou em qualquer outro órgão, como consequência de uma infecção estabelecida (bacteremia secundária). Em adultos, a maioria das bacteremias pneumocócicas é secundária e por complicação de pneumonias (Musher et al., 2003). Os mecanismos locais de invasão serão discutidos mais adiante. Uma vez ocorrendo bacteremia, o pneumococo pode causar o que é conhecido tradicionalmente como infecção hematogênica. Quando os receptores de células endoteliais são ativados, ocorre a multiplicação bacteriana localmente, que causa endocardite (raro), trombos murais infectados (ainda mais raro) ou atravessam as células endoteliais e provocam a doença em diversos órgãos do corpo. As infecções resultantes serão então: meningites, peritonite primária, artrite séptica, osteomielite e infecção de tecidos moles. Empiema, complicação comum da pneumonia

pneumocócica e também a pericardite podem ser resultados da disseminação hematogênica ou por contiguidade da pleura visceral a partir de um foco pulmonar. Em especial, a pneumonia pneumocócica tem sua manifestação clínica dependente de diversos fatores, incluindo a situação imunológica do paciente e a presença de comorbidades. Nesta, a temperatura corporal pode variar de 38° C a 39,5° C, acompanhada de tremores, calafrios e taquicardia. Tosse com expectoração purulenta, às vezes, com laivos de sangue, geralmente está presente. Até 46% dos pacientes se queixam de dor torácica e 20% apresentam sintomas gastrointestinais, como náusea, vômitos ou diarreia (Goldman et al., 2009). Pacientes idosos podem ter os sinais e sintomas citados previamente, mais brandos e sutis, privilegiando a manifestação de confusão mental flutuante (*dellirium*). O exame físico pode revelar um paciente apático, cianótico, taquipneico, às vezes com dor pleurítica. A propedêutica pulmonar pode revelar à percussão um som submaciço quando houver consolidação pulmonar e som maciço quando houver derrame pleural. Estertores, atrito pleural e alterações na broncofonia podem estar presentes. Radiograficamente não existe uma apresentação patognomônica da infecção pneumocócica (Goldman et al., 2009), mas, tipicamente, o envolvimento está limitado a um ou mais segmentos de um único lobo pulmonar. Este envolvimento é unilateral em 80% dos casos e cavitações ou abscessos são incomuns. O derrame pleural tem frequência em torno de 45%, mas apenas 15% destes têm volume suficiente para serem drenados. Os pacientes com consolidação lobar são mais propensos a apresentar

bacteremia, mas esta também pode ocorrer nos pacientes com pequena opacificação segmentar (Goldman et al., 2009). Nos casos de sepse, o paciente pode apresentar hipotensão e as manifestações de falência de órgãos como oligúria, anúria, acidose metabólica, insuficiência cardíaca, icterícia, coagulação intravascular disseminada, gangrena periférica e até púrpura fulminante (Figura 2).

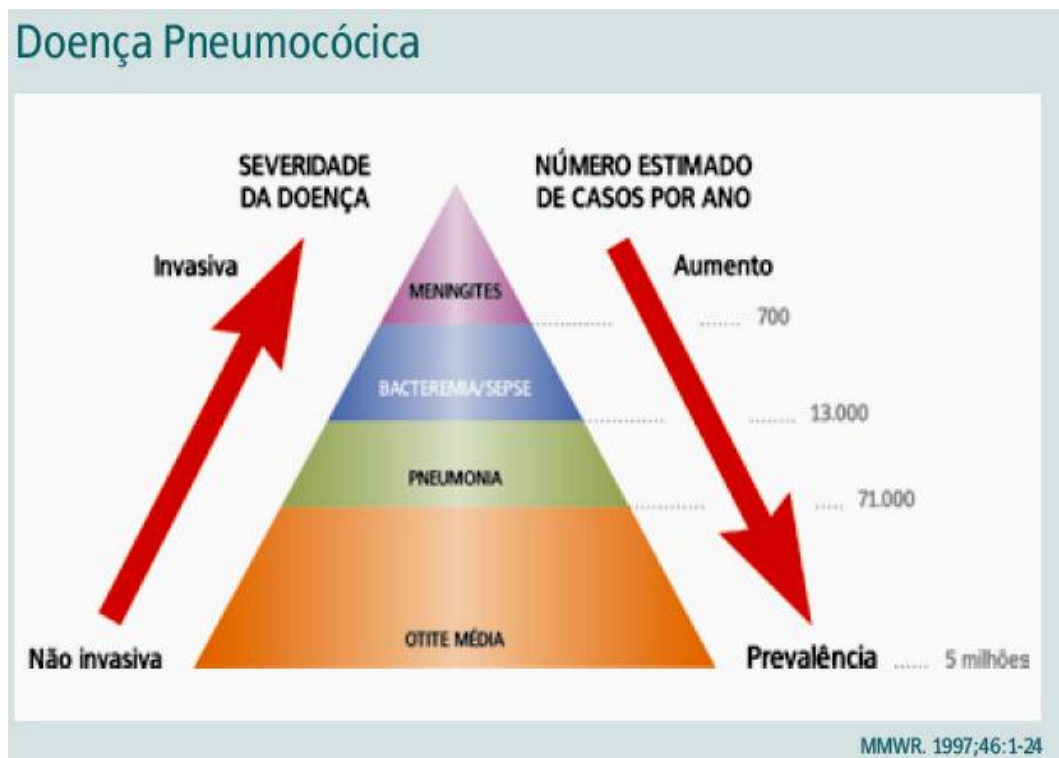


Figura 2: Formas de apresentação da doença pneumocócica

3.7 Diagnóstico do *Streptococcus pneumoniae*

Sendo o *Streptococcus pneumoniae* o agente bacteriano mais importante e principal causa de pneumonia adquirida na comunidade, o desenvolvimento de metodologias diagnósticas rápidas é essencial na

identificação desse microrganismo. Até recentemente, o único método rápido e não invasivo para o diagnóstico presuntivo de pneumonia pneumocócica era o exame bacterioscópico do escarro pelo método de Gram. Este teste é bastante específico e em determinadas situações pode ser bastante útil, revelando diplococos gram-positivos em formato de lanceta em meio a grupos de polimorfonucleares. Entretanto, amostras de escarro de boa qualidade são fundamentais para o desempenho adequado do exame, sendo apenas 50% das amostras de pacientes com pneumonia adequadas para a análise (Oplustil et al., 2004). Existe um teste rápido de detecção de antígenos na urina (Binax-NOW *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen Test, Binax, Inc., Maine), que apresenta vantagens sobre os testes microbiológicos aplicados no escarro, entre elas a rapidez (cerca de 15 a 20 minutos para o resultado) e a não interferência do uso prévio de antibióticos. A sensibilidade desse teste é em torno de 80% nos casos de pneumonia e de até 90%, nos casos de bacteremia (Oplustil et al., 2004). Quanto à especificidade, a detecção de antígenos na urina não é útil para se distinguir crianças com pneumonia pneumocócica daquelas apenas colonizadas em orofaringe. Esse fato é menos frequente na população adulta. O uso simultâneo do teste urinário e do Gram no escarro é capaz de detectar mais de 90% dos casos de pneumonia pneumocócica (Oplustil et al., 2004). As culturas de sangue são positivas em somente 5 a 14% dos pacientes com pneumonia pneumocócica e sofrem piora da sensibilidade caso tenha ocorrido uso prévio de antibióticos (Goldman et al., 2009). Apesar disso, nos hospitais e mesmo nos centros universitários, o isolamento do

pneumococo não é possível em metade ou mais dos pacientes com pneumonia, possivelmente, pela dificuldade de amostras adequada de escarro, pela indisponibilidade e custo do antígeno urinário e pelo uso prévio de antibiótico cada vez mais comum em nosso meio. Alguns autores já enfatizam que a anamnese, o exame físico, a radiografia de tórax, a coloração de Gram do escarro e as culturas de sangue e escarro não auxiliam na tomada de decisão terapêutica, e métodos mais invasivos (aspiração traqueal, endotraqueal, técnicas broncoscópicas, aspiração de líquido pleural e biópsia pulmonar) exigem treinamento especial e são raramente indicados (Goldman et al., 2009). Os pneumococos também podem ser detectados pela reação em cadeia da polimerase, mas essa técnica, apesar de sensível e bastante específica está limitada a laboratórios de pesquisa. Na prática, o conhecimento epidemiológico de que o *Streptococcus pneumoniae* é o agente mais comum de pneumonia comunitária e também das infecções da via aérea superior, orienta praticamente todos os regimes terapêuticos recomendados para a cobertura antibiótica adequada para esse patógeno e, por essa razão, a documentação da sua presença tem pouco ou nenhum efeito no resultado final (Goldman et al., 2009). O padrão anátomo-patológico da agressão pneumocócica no pulmão é de pneumonia lobar ou de broncopneumonia, preservando caracteristicamente a histoarquitetura pulmonar na fase aguda (Geraldo, 2006). A macroscopia pode revelar condensação de todo um lobo pulmonar.

3.8 Prevenção ao *Streptococcus pneumoniae*

O controle do carreamento do *Streptococcus pneumoniae* na nasofaringe é importante na prevenção da doença pneumocócica invasiva, uma vez que reduz a disseminação pessoa a pessoa. A vacina polissacarídica contém 25 µg de cada um dos 23 polissacarídeos capsulares responsáveis por 90% das infecções pneumocócicas invasivas (Goldman et al., 2009). Essa vacina estimula respostas de células B, produzindo anticorpos específicos e otimizando a destruição do pneumococo pelos fagócitos. Contudo, os antígenos utilizados são células T-independentes, não produzindo imunidade duradoura e sendo necessário revacinar os pacientes a cada 5 anos (Goldman et al., 2009). Estão disponíveis dois tipos de vacinas polissacarídicas: Pneumovax (Merck) e Pnu-Imune (Lederle). A eficácia delas varia de 56% a 81% (Goldman et al., 2009). Imunossuprimidos não são protegidos de maneira eficiente por essas vacinas, que também não são eficazes na prevenção da pneumonia pneumocócica sem bacteremia (Goldman et al., 2009; Shorr, 2005). As vacinas polissacarídicas são recomendadas para pessoas com idade igual ou superior a 65 anos; pessoas de 2 a 64 anos com doenças crônicas (doença cardiovascular, doença pulmonar crônica, diabetes mellitus, alcoolismo, doença hepática crônica, fístula liquórica); pessoas com asplenia funcional ou anatômica; pessoas que vivem em ambientes especiais ou grupos sociais suscetíveis ao pneumococo (asilos e determinados grupos de índios americanos). Apesar de essa vacina ser menos eficaz em pacientes imunossuprimidos, também

devem ser vacinadas as pessoas com infecção pelo HIV, leucemia, linfoma, doença de Hodgkin, mieloma múltiplo, carcinomatose, insuficiência renal crônica, transplantados de órgãos sólidos ou medula óssea e pacientes em tratamento com corticoides ou outros imunossupressores.

A vacina conjugada pneumocócica 7-valente (Prevenar, Wyeth-Lederle) tem como base a conjugação do polissacarídeo pneumocócico com uma proteína carreadora que leva à produção de antígenos dependentes de células T. Isso resulta em memória imunológica de longa duração para os sete sorotipos contemplados na vacina (4; 6B; 9V; 14; 18C; 19F e 23F). Esses são os sorotipos mais frequentes em crianças somando 80% das infecções invasivas nos menores de 6 anos (Goldman et al., 2009). A vacina pneumocócica conjugada deve ser administrada aos lactentes aos 2, 4, 6 e 12 a 15 meses de idade. Lactentes mais velhos não imunizados devem receber a vacina entre 7 e 11 meses de idade (duas doses a cada quatro semanas) e uma terceira dose aos 12 meses de idade ou mais. A segunda e a terceira doses devem ser separadas por um período mínimo de dois meses. Crianças dos 12 aos 23 meses devem receber duas doses com um intervalo mínimo de dois meses. Crianças dos 2 aos 9 anos devem receber uma dose. Crianças em grupos de risco (HIV, imunossuprimidos, doenças pulmonares crônicas, síndrome nefrótica, anemia falciforme, doenças cardíacas assintomáticas) devem receber duas doses com intervalo mínimo de dois meses.

A imunização com vacinas conjugadas reduzem o carreamento do pneumococo dos sorotipos contemplados nessas vacinas (Dagan et al.,

2001). Vacinas conjugadas reduzem a prevalência de carreamento por prevenirem nova aquisição e não por encurtarem a duração da colonização já existente (Dagan et al., 2002). Este fenômeno, apesar de bem estabelecido, não está completamente entendido, uma vez que a adesão do *Streptococcus pneumoniae* à superfície mucosa dos tecidos de mamíferos não é mediada por nenhum mecanismo conhecido envolvendo a cápsula polissacáride (Rapola et al., 2000; Simel et al., 2001). Uma especulação, frequentemente citada para o mecanismo desse fenômeno é que, quando em quantidade suficiente, os anticorpos se ligam à cápsula polissacáride e criam uma inibição da interação das proteínas de superfície do pneumococo com locais de ligação da superfície de células epiteliais de mamíferos. Estudos prévios sugeriram que o fator determinante para o efeito dessas vacinas é a presença de imunoglobulina anticapsular G na saliva (Eskola et al., 2003). A IgA secretora tem papel menor na proteção contra a colonização, possivelmente por causa da capacidade do *Streptococcus pneumoniae* em clivar essa imunoglobulina e não a IgG (Kilian et al., 1996). Entretanto, as vacinas conjugadas não conferem proteção cruzada contra outros sorotipos que não estejam contemplados nelas. Com o uso dessas vacinas é esperado o aumento do carreamento de outros sorotipos pneumocócicos, fenômeno conhecido como “serotype replacement”. Os mecanismos desse fenômeno são complexos e não completamente entendidos (Lipsitch, 2001) e suas consequências dependem da virulência dos sorotipos que terão sua frequência aumentada podendo, então, causar doenças (Spratt, et al., 2000). É bem estabelecido que o subtipo capsular

per se já é um determinante maior de virulência (Brueggemann et al., 2003), mas é, igualmente claro, que diversos sorotipos excluídos da vacina conjugada corrente, especialmente a 7-valente, são também capazes de provocar doença (Finland et al., 1977; Hausdorff et al., 2000; Hausdorff et al., 2000). Sorotipos cuja contribuição para doença invasiva é pequena, podem ser capazes de provocarem mais doença na ausência de competidores. Por outro lado, caso os novos sorotipos se apresentem como avirulentos, então, o fenômeno “serotype replacement” pode ser providencial e benéfico. Modelos matemáticos que avaliam o “serotype replacement” sugerem que esse fenômeno aumenta à medida que a cobertura vacinal também aumenta (Lipsitch, 1999). Além disso, outras espécies bacterianas, incluindo *H. influenzae* e *Staphylococcus aureus*, são inibidos *in vitro* pelos pneumococos pela secreção de peróxido de hidrogênio, principalmente (McLeod J et al., 1922; Pericone et al., 2000). Existe, então, a possibilidade de essas espécies bacterianas também aumentarem em frequência na colonização do trato respiratório superior, à medida que as vacinas pneumocócicas são usadas.

As vacinas polissacarídicas não conjugadas, em contraste com as vacinas conjugadas, não têm efeito significativo no carregamento do *Streptococcus pneumoniae* em crianças e adultos (Dagan et al., 1996; MacLeod et al., 1945). Embora também possa ocorrer o fenômeno “serotype replacement”, estudos da vacina polissacarídica não conjugada com significância clínica a esse respeito não foram encontrados na literatura consultada.

Quanto ao efeito das vacinas conjugadas na resistência antibiótica, diversos estudos evidenciaram redução significativa. Isso ocorreu pela redução do carreamento de *Streptococcus pneumoniae* resistente a antibiótico (Givon-Lavi et al., 2003), pela redução da utilização de antibióticos e redução da doença pneumocócica invasiva (Fireman et al., 2003; Klugman et al., 2003).

3.9 Imunopatogênese da infecção pelo *Streptococcus pneumoniae*

A função do sistema imune é proteger o hospedeiro contra infecções microbianas (Abbas et al., 2003; Forte, 2007). O desenvolvimento de doenças infecciosas em um indivíduo envolve complexas interações entre os microorganismos e o hospedeiro (Marrack et al., 1994). Os eventos principais durante a infecção incluem a entrada do microorganismo, o reconhecimento, a colonização, a invasão nos tecidos do hospedeiro, a evasão das defesas do hospedeiro que o microorganismo empreende e o dano tecidual ou funcional decorrentes dessas ações. A patogenicidade dos microorganismos é, em parte, relacionada à sua capacidade de resistir aos mecanismos de imunidade natural (Aderen et al., 1999). A imunidade inata consiste de mecanismos protetores prévios à infecção reagindo sempre de modo estereotipado (barreiras físicas e químicas, proteínas do sangue, fagócitos residentes, células NK, citocinas etc.) (Abbas et al., 2003; Forte, 2007). A resposta imune adquirida é resultado da sucessiva exposição a um

microorganismo particular, tendo grande especificidade, discriminando entre o próprio e o não próprio e produzindo memória.

Vale ressaltar a fundamental importância da resposta imune inata, uma vez que estimula a resposta imune adquirida e influencia a natureza de sua resposta. A resposta imune adquirida, por sua vez, utiliza muitos dos mecanismos efetores da imunidade inata para eliminar os microorganismos.

O pneumococo, bactéria extracelular, é capaz de se replicar fora das células do hospedeiro, por exemplo, na circulação, nos tecidos conjuntivos e nos espaços teciduais como o lúmen das vias respiratórias. Seus mecanismos de patogenicidade incluem a inflamação aguda induzida pelos constituintes de sua parede celular e as ações de suas enzimas proteolíticas e exotoxinas. Diferenças específicas em cada órgão acometido pelo pneumococo foram sugeridas por estudos experimentais em que a virulência intranasal não tinha reciprocidade com a virulência intraperitoneal (Nungester et al., 1936).

3.9.1 Complemento

Nos pulmões, os principais mecanismos da imunidade inata contra os pneumococos são a ativação do complemento, a fagocitose e a resposta inflamatória envolvendo inicialmente macrófagos alveolares residentes, seguidos de pesada infiltração de neutrófilos (Kadioglu et al., in press).

Há mais de cem anos era descrito o envolvimento do complemento na resposta imune ao pneumococo (Finland et al., 1982). Publicações atuais

confirmam o papel crucial do complemento contra as infecções pneumocócicas (Hortal et al., 2001; Mitchell et al., 1997; Moore et al., 2000; Nielsen et al., 1996), principalmente quando ativada a via clássica (Singer et al., 1973). Estudos murinos com perda de C1q ou de IgM secretória evidenciaram maior suscetibilidade à infecção nasal, deficiência no clareamento do pneumococo da circulação, deficiência de ativação macrofágica e maior progressão para septicemia (Singer et al., 1973). O peptídeoglicano da parede do pneumococo ativa a via alternativa do complemento, pois promove a formação da convertase C3 da via alternativa (Xu et al., 2001). A fagocitose eficiente do pneumococo depende da amplificação adequada da via alternativa (Brown et al., 2002). A via da Lectina tem papel pouco expressivo na ativação do complemento pelo pneumococo (Xu et al., 2001; Brown et al., 2002).

Outro papel de destaque envolve reguladores da ativação da família do complemento: os receptores CD21 e CD35. Estes têm como células de expressão principal as células dendríticas foliculares e as células B. O CD21 forma um complexo co-receptor com CD19 e CD81 para liberar sinais de ativação nas células B. O CD35 promove fagocitose de partículas revestidas C3b ou C4b e complexos imunes, regulando a ativação do complemento. A deficiência desses reguladores aumenta a suscetibilidade à infecção pneumocócica a despeito de imunização prévia (Brown et al., 2002), demonstrando a importância desses receptores no início da resposta protetora.

3.9.2 Proteínas surfactantes

No início da infecção, mecanismos de defesa pulmonares nativos são requisitados para efetivo clareamento e resistência ao pneumococo. Durante a última década, crescente atenção tem sido dada ao efeito do surfactante na resposta imune dos pulmões. Proteínas surfactantes A e D da família das colectinas demonstraram habilidade ímpar na modulação imune (Haas et al., 2002; Wright et al., 1997; Holmskov et al., 1999; Crouch et al., 2000). A proteína surfactante D (SP-D) é abundante no epitélio alveolar, onde é produzida por células claras não ciliadas e células alveolares tipo II (Lawson et al., 2000). A proteína surfactante A (SP-A), apesar de mais abundante no alvéolo, parece ter importância menor quando comparada à proteína D. Essas proteínas se ligam à superfície do pneumococo, favorecendo a fagocitose e citólise do agente agressor (Hass et al., 2002; Le Vine et al., 2001; Clark et al., 2002). Além disso, moléculas da proteína D (SP-D) podem ligar-se a três diferentes sorotipos do *Streptococcus pneumoniae*, causando agregação e facilitando a ação dos neutrófilos (Holmskov et al., 1999). Estudos em ratos com deficiência de SP-D confirmaram a importância dessas proteínas na resposta imune inata. A deficiência de SP-D aumenta a suscetibilidade à infecção pneumocócica intranasal nas primeiras 24 horas que seguem a infecção (Kadioglu et al., in press; Holmskov et al., 1999; Kadioglu et al., 2000), com significativa redução no clareamento pulmonar e traqueal do pneumococo. Esta deficiência também resultou em menor tempo de apresentação de bacteremia e maior inflamação tecidual com incremento

de IL-6 e TNF α (Kadioglu et al., in press; Holmskov et al., 1999; Le Vine et al., 2000; Le Vine et al., 2001; Clark et al., 2002; Kadioglu et al., 2000). Além disso, é sugerido que a deficiência de SP-D implica no incremento da apoptose de macrófagos, dificultando a destruição dos pneumococos (Clark et al., 2002; Kadioglu et al., 2000).

3.9.3 Receptores Toll

Recente descoberta foi a demonstração do envolvimento dos receptores Toll na infecção pneumocócica. Os receptores Toll são receptores de superfície dos fagócitos e de outros tipos celulares que sinalizam a ativação dos macrófagos em resposta aos produtos microbianos como toxinas na resposta imune inata. Compartilham homologia estrutural e vias de transdução de sinais com o receptor tipo 1 da IL-1. TLR-2 e TLR-4 reconhecem estruturas moleculares específicas do pneumococo (peptideoglicano) habilitando a resposta imune adaptativa (Yoshimura et al., 1999; Malley et al., 2003). Evidências preliminares de estudos com ratos mutantes com deficiência de TLR-4 mostram significativa suscetibilidade destes à doença pneumocócica invasiva e consecutiva evolução letal (Malley et al., 2003). Mutações no receptor de interleucinas associadas à cinase (IRAK-4), um intermediário-chave na via de sinalização dos receptores Toll foram recentemente descritas em indivíduos com infecções piogênicas de repetição em especial o pneumococo (Malley et al., 2003; Echannaoui et al., 2002).

3.9.4 Células dendríticas

São células que exercem importantes papéis na indução das respostas dos linfócitos T aos antígenos proteicos. São identificadas morfológicamente por suas projeções membranosas ou espiculares. Derivadas de precursores da medula óssea, são relacionadas na sua linhagem aos fagócitos mononucleares. As células dendríticas imaturas são localizadas nos epitélios da pele e dos sistemas gastrointestinal e respiratório (Abbas et al., 2003; MacLennan, 1994). Os protótipos dessas células dendríticas são as células de Langerhans da epiderme. Estas células são funcionalmente imaturas, uma vez que expressam baixos níveis de molécula de superfície (moléculas do complexo de histocompatibilidade principal e co-estimuladoras) necessários para estimular eficientemente os linfócitos T. Sua principal função é capturar e transportar os antígenos proteicos para drenagem em linfonodos (Inaba et al., 1990; Inaba et al., 1993; Ingulli et al., 1997). Durante sua migração para os linfonodos, as células dendríticas amadurecem para se tornarem extremamente eficientes na apresentação do antígeno e na estimulação das células T virgens. As células dendríticas maduras residem nas regiões contendo células T dos linfonodos e nessa localização exibem os antígenos às células T (Svensson et al., 1997; Wykes et al., 1998). As células dendríticas estão também presentes no interstício da maioria de outros órgãos. Compõem, portanto, instrumento da resposta imune inata fazendo parte do grupo das células acessórias, sendo elementos não linfóides das quais depende o início e o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Abbas et al., 2003). O

Streptococcus pneumoniae expressa diversas estruturas que podem mediar ativação das células dendríticas por meio de receptores Toll (TLR) como o peptidoglicano e o ácido lipoteicoico através do TLR-2 (Colino et al., 2002). A sinalização de células dendríticas também ocorre em pneumococos não opsonizados, sendo de forma rápida, entretanto, pneumococos encapsulados podem inibir parcialmente a ativação dessas células (Colino et al., 2003). Apesar da importância crucial das células dendríticas na resposta a infecções, pouco se sabe em relação à capacidade de bactérias em induzir apoptose dessas células. Células dendríticas parecem exibir mecanismos que contrabalanceiam estímulos apoptóticos eficientes para macrófagos. Essa habilidade em resistir à indução de apoptose em resposta a bactérias pode ter papel importante na apresentação antigênica durante a fase inicial da resposta imune (Guzman et al., 1996; Leverkus et al., 2000; Lundqvist et al., 2002). Colino e colaboradores, em 2003, demonstraram em estudo de cultura de células da medula óssea a indução de apoptose de células dendríticas em resposta ao *Streptococcus pneumoniae* intacto. A indução de apoptose nesse estudo ocorreu por dois mecanismos, sendo o primeiro, caspase independente e mediado pela expressão de pneumolisina e o segundo, caspase dependente, sem expressão de pneumolisina e mais tardio em relação ao primeiro mecanismo de resposta. O mecanismo pelo qual o pneumococo induz apoptose das células dendríticas difere do observado nos macrófagos, sendo nesses a apoptose associada à morte intracelular do pneumococo e com certa resistência à pneumolisina (Dockrell et al., 2001).

3.9.5 O papel das citocinas

O *Streptococcus pneumoniae* induz liberação precoce de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ) e a citocina anti-inflamatória IL-10 (Khan et al. 2002). Essas citocinas, além de estarem implicadas na regulação da resposta imune inata frente a bactérias extracelulares, também agem em resposta aos polissacarídeos e proteínas do pneumococo.

O TNF- α é fundamental para a resposta inflamatória aguda frente às infecções bacterianas e é responsável por muitas das complicações sistêmicas das infecções graves (Abbas et al., 2003; Forte, 2007). Sua principal fonte celular são os fagócitos mononucleares ativados, mas também as células natural killer (NK), os mastócitos e as células T antígeno-estimuladas podem secretar esta proteína. A principal ação biológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para os locais de infecção e ativar essas células para destruírem os agentes invasores. A ação biológica do TNF- α é desempenhada por meio de diversas outras ações sobre as células endoteliais e sobre os leucócitos, como a expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio, a estimulação de secreção de quimiocinas indutoras de quimiotaxia, recrutamento dos leucócitos e necrose tecidual. Várias são as ações sistêmicas do TNF- α , como a indução de febre, caquexia, depressão miocárdica, hipotensão, trombose vascular, hipoglicemia, síntese de proteínas séricas como a proteína amiloide A e o fibrinogênio. O TNF- α , liberado nas primeiras 48 horas da infecção pneumocócica como parte da

resposta imune inata, também tem papel indutor da resposta imune adaptativa.

A IL-1 atua como um mediador da resposta inflamatória do hospedeiro às infecções e a outros estímulos inflamatórios em ação sinérgica ao TNF- α .

A IL-6 estimula resposta antipolissacáride e antiproteína específica do pneumococo, além de estimular liberação de complemento via macrófagos locais (Colino et al., 2002; Kopf et al., 1998).

A combinação das proteínas plasmáticas induzidas pelo TNF- α e pelas IL-1 e IL-6, constitui a resposta de fase aguda aos estímulos inflamatórios.

A IL-2 é um fator de crescimento para linfócitos T estimulados por antígenos e regula a expansão clonal das células T depois de o antígeno ser reconhecido (Abbas et al., 2003; Forte, 2007).

A IL-12 é o principal mediador da resposta imune inata inicial aos microrganismos intracelulares e é o indutor fundamental da imunidade adquirida. Tem como fontes os fagócitos mononucleares ativados e as células dendríticas. A IL-12 estimula a produção de IFN- γ pelas células NK e pelos linfócitos T, além de estimular a diferenciação dos linfócitos T CD4 auxiliares em células TH1 produtoras de IFN- γ . Também consegue intensificar as funções citotóxicas das células NK e dos linfócitos T CD8 citotóxicos ativados.

O IFN- γ é a principal citocina ativadora dos macrófagos, sendo fundamental na imunidade inata e na imunidade específica mediada pela célula, uma vez que proporciona os meios pelos quais os linfócitos T e as

células NK ativam os macrófagos para matar os microrganismos fagocitados. Além disso, o IFN- γ estimula a expressão das moléculas de classe I e de classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC).

A IL-10 está amplamente relacionada com a inibição da imunidade, em parte por sua capacidade em inibir a atividade das células dendríticas (Corinti et al., 2001; De Smedt et al., 1997; Igietseme et al., 2000). Entretanto, foi demonstrado que a IL-10 expressa pela presença do pneumococo, retardou a apoptose de células dendríticas e, assim, prolongou o tempo de sinalização de resposta humoral frente a esse agente (Colino et al., 2003).

A IL-4 é o principal estímulo para a produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento das células Th2 a partir das células T CD4. Promove em relação ao pneumococo sinalização para a ação da IgG1 (Abbas et al., 2003).

A DPI no pulmão pode se apresentar clinicamente como um cenário dramático em razão do intenso processo inflamatório local. O equilíbrio entre a imunidade inata e adquirida é fundamental para resolver a infecção preservando a histoarquitetura pulmonar e a homeostase.

4 – Métodos

4.1 Casuística

Foram analisados 40 casos retrospectivos de necropsias de pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP que faleceram em decorrência de doença pneumocócica invasiva (DPI) a partir de dados do registro deste hospital no período de 1997 a 2005. Inicialmente, foram recuperadas 906 hemoculturas com *Streptococcus pneumoniae* no período citado, com 292 óbitos durante a internação que motivou a coleta da cultura. Desses 292 casos de óbitos com hemoculturas com *Streptococcus pneumoniae*, apenas 85 casos possibilitaram estudo por necropsia e apenas em 40 casos a necropsia fora realizada no Departamento de Patologia da FMUSP. O diagnóstico de DPI se baseou nos dados clínicos dos pacientes, aliados aos dados do Laboratório de Microbiologia do ICHC-FMUSP com hemocultura e/ou lavado bronco-alveolar positivos para *Streptococcus pneumoniae* e na recuperação dos cortes histológicos de pulmão.

Foram utilizados como controle 26 casos de necropsia de falecidos por causa desconhecida provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos do Departamento de Patologia da FMUSP. Estes casos tiveram distribuição etária superponível aos casos de DPI, sem doença pulmonar crônica ou aguda e sem alterações histológicas significativas do pulmão.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos casos que apresentaram manifestações clínicas de DPI com isolamento do agente etiológico e lesão pulmonar compatível com pneumonia pneumocócica.

Foram descartados os casos de crianças (menores de 12 anos) e os pulmões com outras doenças concomitantes, outros agentes infecciosos concomitantes e infecção pelo HIV.

Foram, então, excluídos 18 casos, totalizando 22 casos para o estudo.

A presente investigação foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa sob o número de protocolo 782\05 (Anexo 4).

4.3 Processamento das amostras

Os fragmentos de pulmão de cada caso foram fixados em formol a 10%, processados de acordo com a rotina do Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da FMUSP, a partir dos quais foram processados e confeccionados blocos de parafina.

A seguir, foram realizados cortes histológicos com 4 μ m de espessura que foram submetidos às colorações de Hematoxilina-Eosina, Ziehl-Neelsen, Grocott e Brown-Breen.

Os preparados histológicos foram submetidos à análise inicial com a finalidade diagnóstica do processo patológico envolvente os pulmões e se o material seria adequado para os estudos propostos.

4.4 Métodos imuno-histoquímicos

Para a imunomarcagem dos fenótipos específicos das células envolvidas na resposta inflamatória e da expressão de citocinas, foi empregado o método imuno-histoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC) (Hsu et al., 1981), com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para tanto, as etapas que compõem o método são descritas a seguir:

1 – Os cortes histológicos de 4 μm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhido em lâminas previamente salinizadas com solução de “3-aminopropyltiethoxy-silane” (Sigma, código A-3648).

2 – Os cortes foram submetidos à desparafinização em banho de xilol por 30 minutos em estufa a 56° C e em um segundo banho de xilol por 10 minutos à temperatura ambiente.

3 – Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%,70%) por cinco minutos cada.

4 – Lavados em água corrente, água destilada e em tampão “phosphate buffer saline” (PBS) pH 7,4 por cinco minutos cada.

5 – Foi realizado o bloqueio de pigmentos de formol, submetendo-se os cortes à imersão em solução de hidróxido de amônio 25% diluído em álcool 95% por 30 minutos à temperatura ambiente.

6 – Em seguida, os cortes foram lavados novamente em água corrente, água destilada e PBS por cinco minutos cada.

7 – Foi realizado o bloqueio de peroxidase endógena, colocando-se os cortes em água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes a 3%, em três incubações de 15 minutos cada em câmara escura.

8 – Os cortes foram então lavados em água corrente, água destilada e PBS por cinco minutos cada.

9 – A recuperação antigênica, quando necessária, foi realizada por meio de calor úmido, colocando-se os cortes imersos em tampão ácido acético diaminotetraetileno (Tris/EDTA) pH 9,0, já aquecido à temperatura de 95° C em banho-maria por 20 minutos ou em solução contendo tripsina 0,02% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. T7409) em PBS pH 7,4 durante 20 minutos à temperatura ambiente.

10 – Os cortes esfriaram por 20 minutos e posteriormente foram lavados em água corrente, água destilada e “phosphate buffered saline” (PBS) por cinco minutos cada.

11 – Para o bloqueio das proteínas inespecíficas, os cortes foram incubados em solução de leite desnatado (Molico – Nestlé) 10% por 30 minutos à temperatura ambiente.

12 – Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário específico ao antígeno pesquisado, diluído em solução de soro-albumina-bovina (BSA) a 1% por 12 horas a 4° C.

13 – Os cortes foram lavados em PBS por duas vezes de 5 minutos cada.

14 – Incubados com anticorpo secundário universal biotilado (anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra) do “Kit” LSAB peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos a 37° C.

15 – Os cortes foram novamente lavados em PBS por duas vezes de cinco minutos cada.

16 – Incubados com o reagente Estreptavidina peroxidase do “Kit” LSAB peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos a 37° C.

17 – Os cortes foram então lavados em PBS por duas vezes de cinco minutos cada.

18 – A revelação da reação imuno-histoquímica foi realizada com o emprego de 45 µg do cromógeno 3'3 Diamino-benzidina (DAB) (Sigma

Chemical CO, St. Louis, MO, USA, código D-5637), diluído em 100 mL de PBS, filtrado e acrescido 1200 µl de H₂O₂ 10 volumes a 3%.

19 — Os cortes foram colocados na solução cromógena (DAB) por dois ou três minutos e posteriormente foram lavados em água corrente por cinco minutos.

20 — Em seguida, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer's (Dako North America, Carpinteria, CA, USA, código S3309) por cerca de um minuto.

21 — Novamente lavados em água corrente por cinco minutos e desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 95%, 100%).

22 — Finalmente, os cortes foram diafinizados em xilol e montados em resina "permount" (Fisher Scientific, código SP-15-100).

Alguns anticorpos (CD1a, TCD4+, TCD8+) necessitaram do emprego de um sistema de amplificação de sinal denominado CSA II ("Biotin-free Tyramide Signal Amplification System", Dako North America, Carpinteria, CA, USA, código K 1497), que consiste na deposição de um componente fenólico ligado à fluoresceína, seguido por uma reação secundária com um anticorpo anti-fluoresceína conjugado com peroxidase e o anticorpo (Ig de coelho anti-caspase-3) utilizou o polímero Novolink- Novocastra (Ref.: 7159 — lote:715915). A revelação da positividade da reação ocorreu também com o emprego do cromógeno DAB.

A Tabela 1 mostra os anticorpos primários empregados, códigos, tratamento utilizado para exposição antigênica, diluições de uso e amplificação do sinal dos anticorpos.

4.5 Método imuno-histoquímico para citocinas

O método imuno-histoquímico para visualização das células expressando citocinas apresentou alguns diferenciais, como a incubação dos cortes em solução de PBS-saponina (tampão PSB pH 7,4 contendo saponina 0,1% — Sigma Chemical Co. St. Louis, MO/USA, código S 7900) por 10 minutos à temperatura ambiente antes do bloqueio de proteínas inespecíficas com leite Mólico. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários específicos para cada citocina, por 12 horas a 4° C, seguindo o protocolo já descrito anteriormente, contudo, antes e após a incubação com o anticorpo secundário, os cortes foram novamente colocados em tampão PBS-saponina por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida colocados em tampão PBS pH 7,4. Os procedimentos foram efetuados com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Tabela 1 – Relação de anticorpos empregados em imuno-histoquímica.

Anticorpo	Marca/código	Exposição Antigênica	Diluição	Kit utilizado
Ig de coelho anti-caspase-3 clivada	Biocare/CP229C	Calor úmido	1:200	Novolink
Ig de coelho anti-C3	DAKO/SC A0062	Calor úmido	1:200	LSAB
Ig de camundongo anti-CD1a humano	Serotec/MCA1657	-----	puro	CSA
Ig de camundongo anti-CD4 humano	Dako/M834	-----	1:1000	CSA
Ig de camundongo anti-CD8 humano	Dako/M7103	-----	1:30	CSA
Ig de camundongo anti-CD14 humano	Novocastra/NCL-CD14-223	Calor úmido	1:50	LSAB
Ig de camundongo anti-CD20 humano	Dako/M0755	Calor úmido	1:40	LSAB
Ig de camundongo anti-CD34 Humano	Novocastra/NCL-END	Tripsina	1:50	LSAB
Ig de camundongo anti-CD54 (ICAM-1)	Novocastra/Epitomics	Calor úmido	1:50	LSAB
Ig de camundongo anti-CD57 humano	Neomarkers/MS-136-P	Calor úmido	1:50	LSAB
Ig de camundongo anti-CD68 humano	Dako/M0814	Calor úmido	1:30	LSAB
Ig de cabra anti-IL1- β humana	R&D Systems/AF201-NA	Calor úmido	1:30	LSAB
Ig de camundongo anti-IL2r humana	Novocastra/NCL-CD25-305	Calor úmido	1:20	LSAB
Ig de cabra anti-IL4 humana	R&D Systems/AF204-NA	Calor úmido	1:40	LSAB
Ig de cabra anti-IL6 humana	R&D Systems/AF206-NA	Calor úmido	1:20	LSAB
Ig de cabra anti-IL-8 humana	R&D Systems/AF208-NA	Calor úmido	1:100	LSAB
Ig de camundongo anti-IL-10 humana	R&D Systems/MAB217	Calor úmido	1:10	LSAB
Ig de camundongo anti- IFN- γ humano	R&D Systems/MAB285	Calor úmido	1:30	LSAB
Ig de coelho anti-proteína S-100	Dako/Z311	-----	1:1000	LSAB
Ig de camundongo anti-SP-A	Novocastra/NCL-SP-A	Calor úmido	1:200	LSAB
Ig de coelho anti-TGF- β humano	Santa Cruz/SC-82	Calor úmido	1:100	LSAB
Ig de cabra anti-TNF- α humano	R&D Systems/AF210-NA	Calor úmido	1:40	LSAB
Ig de cabra anti-Toll-2	Santa Cruz/SC 8689	Calor úmido	1:50	LSAB

4.6 Técnica de imunomarcção para determinação de Caspase-3

Para determinação dos pneumócitos apoptóticos *in situ* foi utilizado o anticorpo anti-caspase-3 (diluição 1:200), utilizando-se como recuperação antigênica o calor úmido (banho-maria), seguindo as etapas imunohistoquímicas já descritas.

4.7 Estudos semiquantitativo e quantitativo

Os cortes corados pela hematoxilina-eosina foram avaliados em três níveis: luz alveolar e seu revestimento epitelial, septo alveolar e brônquios. A análise semiquantitativa foi feita nos três compartimentos segundo os critérios de intensidade: 0 – ausência, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso.

Em cada nível foram analisados os seguintes eventos:

Septo alveolar: espessamento septal, congestão capilar, edema, fibrina, fibrose, infiltrado (linfócitos, macrófagos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos). **Luz alveolar e revestimento epitelial:** pneumócitos I (necrose, pneumococo), pneumócito II (necrose, regeneração, pneumococo), hemorragia, membrana hialina, presença de células gigantes multinucleadas, infiltrado inflamatório (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, plasmócitos).

Brônquios: hiperplasia, metaplasia escamosa, necrose de epitélio, erosão, úlcera, infiltrado (linfócitos, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos).

A análise semiquantitativa foi feita nos fragmentos de pulmão independente da concomitância de pneumonia, todavia, foram evitadas as áreas livres do processo pneumônico nos cortes histológicos.

Os linfócitos intraepiteliais dos brônquios foram contados em áreas onde não houvesse presença de BALT para que a contagem não fosse influenciada pelas células do tecido linfoide associado à mucosa.

A análise quantitativa das células inflamatórias imunomarcadas foi avaliada pela contagem utilizando-se um retículo graduado com área de 1 cm² dividido em 10 porções de 1 mm² adaptado a ocular do microscópio óptico. As leituras foram feitas no aumento de 40 vezes. O retículo foi posicionado em todo tecido pulmonar, foram contadas todas as células imunomarcadas nas regiões do septo e alvéolo que coincidiam na área do retículo. Foram considerados 10 campos de forma randomizada por tecido pulmonar.

Foi feita a somatória do número de células imunomarcadas, a divisão pelo número de campos (divisão por 10) e o resultado foi dividido por 0,0625 (área do graticulo), totalizando o número de células/mm² (Figura 3).

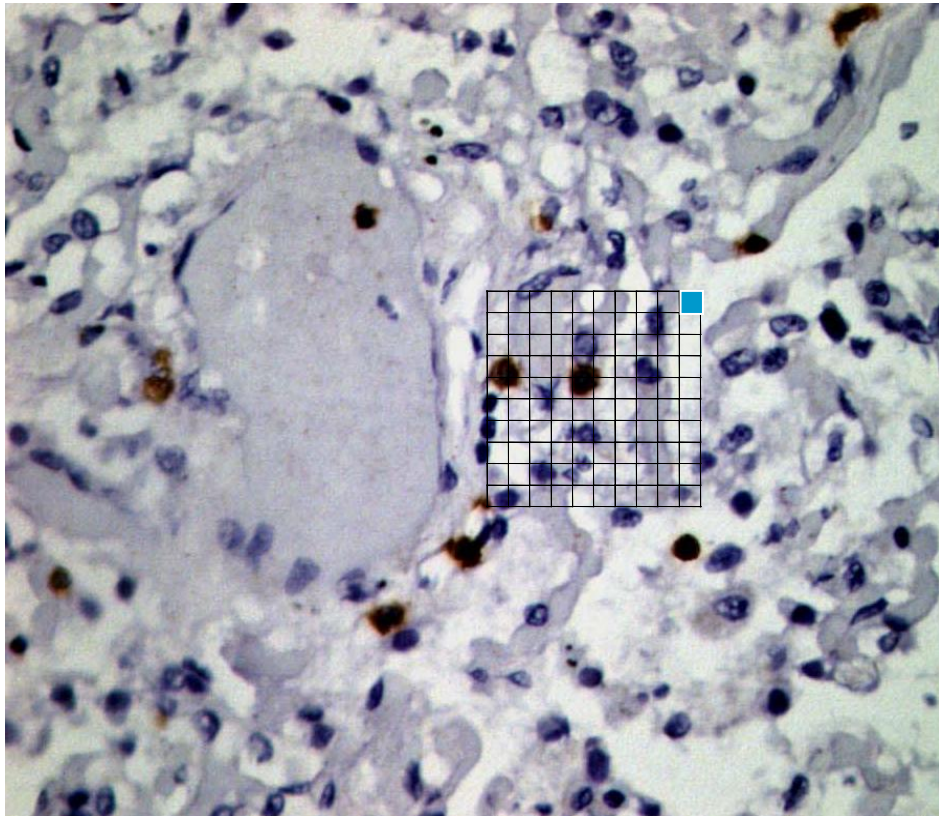
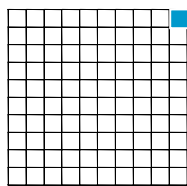
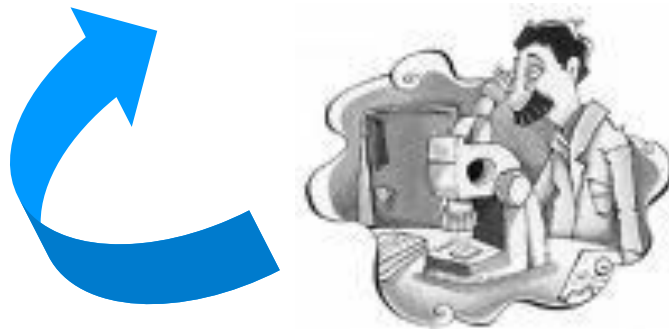


Figura 3: Demonstração do método quantitativo da imunomarcção das células TCD8. Aumento de 40 vezes



0,25 mm²

0,25 mm²

Área do graticulo = 0,0625 mm²

4.8 Análise estatística

A comparação de valores semiquantitativos ou quantitativos de cada grupo analisado foi feita usando testes não paramétricos, sendo usado o teste de Mann Whitney para comparação entre doença e controles ou o teste de ANOVA não paramétrico. Diferenças entre os grupos individuais foram consideradas significantes quando a probabilidade de igualdade era menor que 0,0001 ($p < 0,0001$) e quando a probabilidade de não haver relação era menor que 0,05. Todos os procedimentos estatísticos foram feitos utilizando o pacote estatístico Graph Pad Prism version 5.0 for Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA).

5 – RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos e laboratoriais

A idade média dos doentes foi de 46 anos, variando entre 12 anos e 74 anos, sendo 55% mulheres e 45% homens (Tabela 2). Os dados demográficos podem ser verificados no Anexo 1.

Tabela 2 – DPI : Distribuição por sexo e idade de 22 casos de necropsia de doença pneumocócica invasiva do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2003.

Paciente	Sexo	Idade
HC- 97- 559	M	13
HC- 97- 826	F	23
HC- 97- 837	F	28
HC- 97- 856	M	49
HC- 98-731	F	13
HC- 98- 974	F	62
HC- 98-1343	M	62
HC- 99-570	M	53
HC- 01- 381	M	62
HC- 01- 512	F	12
HC- 01- 615	M	58
HC- 01- 1046	F	60
HC- 01- 1264	M	28
HC- 01- 1432	M	70
HC- 02- 335	F	56
HC- 02- 561	F	74
HC- 02- 583	F	55
HC- 03- 153	F	36
HC- 03- 482	M	73
HC- 03- 732	M	40
HC- 03- 937	F	52
HC- 03- 1048	F	40

Encontramos como fatores de risco para infecção pneumocócica nos casos de DPI, etilismo em 9%, tabagismo em 12,5% e nível socioeconômico baixo em 100% (Tabela 3).

Observamos a ocorrência dos seguintes fatores de mortalidade na DPI: idade maior de 65 anos em 9%, bacteremia em 100%, foco extra pulmonar em 100%.

As condições clínicas relacionadas ao pior prognóstico na DPI foram: uso de corticoide 50%, neoplasia 27,2%, cirrose hepática 22,7%, insuficiência renal crônica 9%, diabetes mellitus 4,5% e transplante hepático 4,5% (Tabela 3).

Tabela 3 – Perfil epidemiológico: fatores de risco e de mortalidade na doença pneumocócica invasiva.

Fator	Porcentagem
Baixo nível socioeconômico	100%
Sexo masculino	45%
Uso de corticóide	50%
Neoplasia	27,5%
Cirrose hepática	22,7%
Tabagismo	12,5%
Idade > 65 anos	9%
Etilismo	9%
Diabetes Mellitus	4,5%
Transplante	4,5%
Bacteremia	100%
Foco extrapulmonar	100%

Todos os pacientes apresentaram na evolução o quadro clínico de sepse com febre, taquicardia, dispneia, dor torácica, hipotensão, má

perfusão de extremidades. O quadro de *dellirium* só ocorreu nos dois pacientes idosos com mais de 65 anos. Todos os pacientes apresentaram sepse grave e choque séptico culminando com choque séptico refratário e óbito no período médio de 8,8 dias (1 a 27 dias).

A apresentação radiológica foi descrita como infiltrado pulmonar localizado e unilateral em 90% dos casos e como infiltrado bilateral nos demais. Derrame pleural esteve descrito em metade dos pacientes e não houve referência de cavitações em nenhum caso. Todos os casos receberam, à admissão hospitalar, antibióticoterapia com cobertura para *Streptococcus pneumoniae* e foram 100% sensíveis à penicilina.

Os controles apresentaram idade média de 40 anos, variando de 22 a 60 anos, sendo 54% homens e 46% mulheres (Anexo 1).

5.2 Alterações histopatológicas do pulmão na DPI

As alterações histológicas e sua graduação de intensidade por cada caso podem ser vistas no Anexo 2.

5.2.1. Epitélio e luz alveolar

Na DPI verificou-se necrose de pneumócitos I e regeneração de pneumócitos II em 100% dos casos, sem evidências de hiperplasia ou alterações celulares sugestivas de efeito citopático viral associado (Figura 4 D e Anexo 2).

A hemorragia alveolar na DPI esteve presente em 100% dos casos e o edema alveolar em 100% dos casos.

Fibrina ocorreu em 72,7% dos casos e membranas hialinas em 10 casos (45,5%).

O infiltrado inflamatório alveolar com predomínio de neutrófilos e macrófagos foi presente em 100% dos casos (Figuras 4A e 4B). Não houve casos com infiltrado alveolar eosinofílico. Linfócitos foram encontrados em 100% dos casos.

Debris celulares foram identificados nas luzes alveolares em 86,4% dos casos e não foram observadas células gigantes.

Nos casos controles não foi observada alteração de pneumócitos, hemorragia, edema, fibrina, membranas hialinas, infiltrado inflamatório, debris celulares ou células gigantes.

5.2.2 Septos alveolares

O septo alveolar apresentou espessamento em 100% dos casos, associado à moderada ou intensa congestão dos capilares, edema em 77,3% dos casos e infiltrado inflamatório formado por macrófagos, neutrófilos e raros linfócitos e plasmócitos, e ausência de eosinófilos. Observou-se ainda discreto grau de fibrose septal em 54,5% dos casos e trombose vascular em 9%.

Nos pacientes controles não houve alterações septais significativas.

5.2.3 Alterações morfológicas brônquicas

Observamos apenas raros focos de necrose e de erosão do epitélio brônquico com ausência de hiperplasia epitelial, de metaplasia ou úlceras.

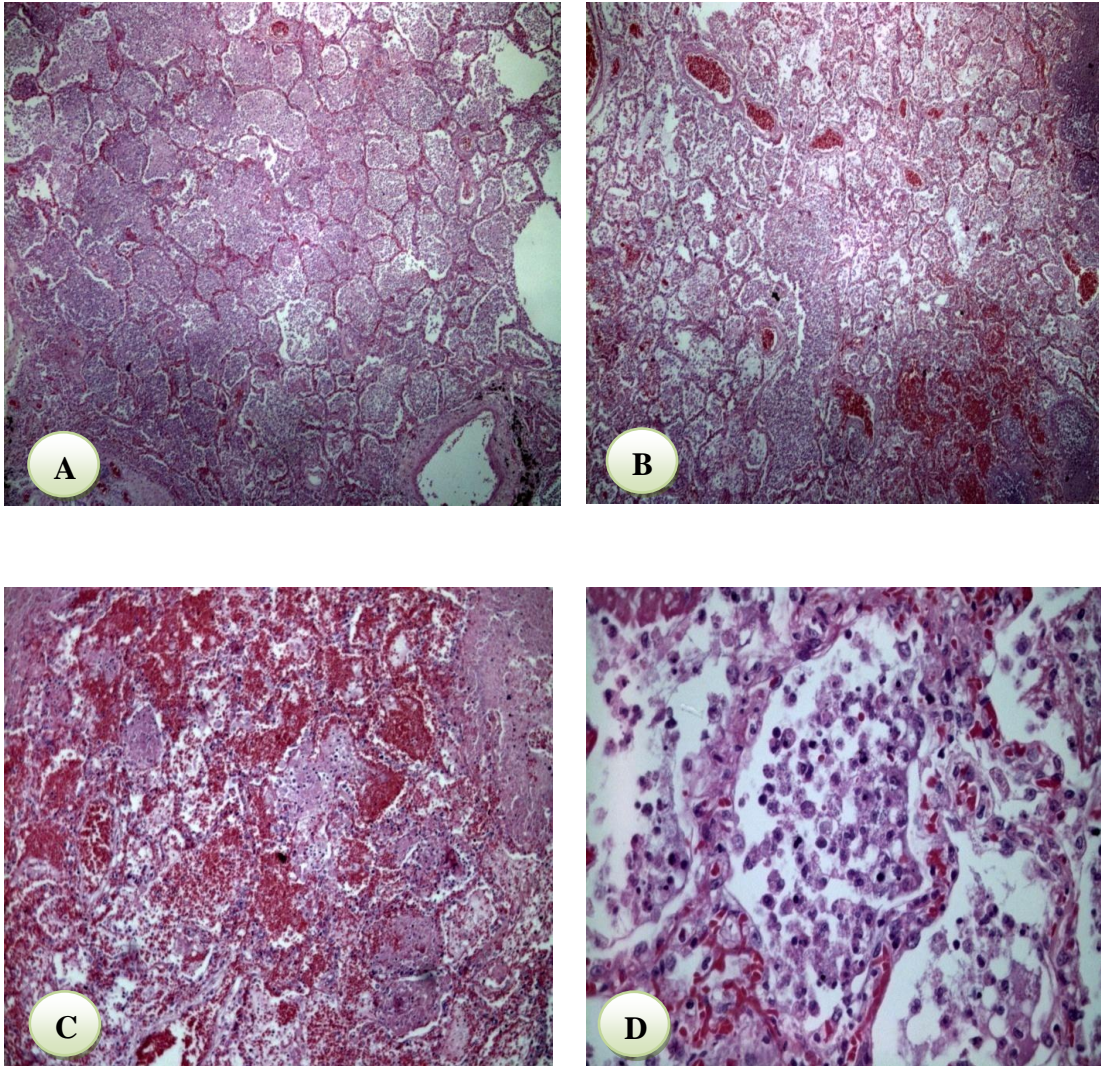


Figura 4: DPI – Pneumonia lobar: A – Visão panorâmica (HE- X 40); B – Pneumonia lobar e hemorragia intra-alveolar (HE- X 40); C – Pneumonia lobar em fase de hepatização cinzenta (HE- X 100); D – Alvéolo pulmonar preenchido por neutrófilos, macrófagos e debris celulares, espessamento septal associado à edema, congestão capilar e discreto infiltrado inflamatório (HE- X 400)

5.3 Avaliação imune no pulmão na DPI

Os cortes histológicos submetidos à avaliação quantitativa da imunomarcagem para caracterização dos fenótipos, de citocinas, do

complemento, da caspase e da substância surfactante demonstraram positividade caracterizada pela coloração acastanhada de padrão granular e suas medianas estão compiladas na Tabela 4 e nos Gráficos 1 e 2. No Anexo 3 estão os dados quantitativos por cada caso.

Tabela 4 – Doença pneumocócica invasiva: análise quantitativa dos fenótipos celulares do pulmão, C3, ICAM-1, SP-A, caspase e Toll-2 na DPI e controles.

Marcador de superfície	Área pulmonar	Controle não infectados Mediana-IC x 10 ³	DPI Mediana-IC x 10 ³	Significância (p < 0.05)
NK	Alvéolo	17,6(15,8- 18,0)	1,6(0,8-2,1)	C>DPI
	Septo	92,8(89,3-102,3)	0(0,2-1,7)	C> DPI
CD1a	Alvéolo	50,4(50,1-74,2)	11,2(9,0-16,1)	C> DPI
	Septo	70,4(60,2-98,2)	30,4(28,2-39,8)	C> DPI
CD68	Alvéolo	56,8(46,4-69,4)	144(136,6-242,7)	C< DPI
	Septo	121,6(105,7-134,4)	68,8(68,2-155,5)	NS
S-100	Alvéolo	0,0(0,2-2,5)	1,6(1,6-2,5)	C< DPI
	Septo	9,6(7,7-13,2)	10,4(9,0-11,2)	NS
TCD4	Alvéolo	21,6(18,8-25,7)	12(10,3-19,7)	C> DPI
	Septo	40,8(33,9-44,2)	28(27,2-49,6)	NS
TCD8	Alvéolo	14,4(13,3-15,7)	11,2(9,3-18,6)	NS
	Septo	46,4(42,5-46,8)	8,8(7,4-27,3)	C> DPI
CD20	Alvéolo	6,4(5,4-7,9)	1,6(1,6-3,1)	C> DPI
	Septo	23,2(21,1-24,7)	0,8(0,5-1,9)	C> DPI
C3	Alvéolo	18,4(15,7-28,8)	36(34,2-67,1)	C< DPI
	Septo	6,4(5,1-9,8)	8,8(8,9-22)	NS
ICAM-1	Alvéolo	3,2(1,4-10,7)	35,2(27,9-53)	C< DPI
	Septo	1,6(1,2-2,4)	25,6(20,9-47)	C< DPI
CD14	Alvéolo	1,6(0,9-2)	45,6(34,7-58,4)	C< DPI
	Septo	1,6(0,6-1,6)	36(29,6-64,1)	C< DPI
Caspase-3	Alvéolo	11,2(8,9-15)	5,6(4,2-8)	C> DPI
	Septo	6,4(6,8-14,3)	4,8(2,6-7,4)	C> DPI
Toll-2	Alvéolo	4,8(3,7-8,6)	23,2(21,4-37,3)	C< DPI
	Septo	0(0,7-3,2)	9,6(8-15,7)	C< DPI
SP-A	Alvéolo	16,8(15,2-28)	159,2(135,3-194,6)	C< DPI
	Septo	6,4(5,6-12,4)	48,8(45,6-56,8)	C< DPI
CD34	Alvéolo	0	18,4(17,4-31,7)	C<DPI
	Septo	45,6(35,3-69,7)	75,2(79,6-157,8)	C<DPI

Os dados foram expressos como o número de células que expressam citocinas \pm TAA (tamanho da amostra analisada) por 0,0625 milímetro² campo microscópico de área selecionada.

Comparação entre os grupos foi testada usando o teste Mann-Whitney.

IC: Intervalo de Confiança

NS: Não Significante

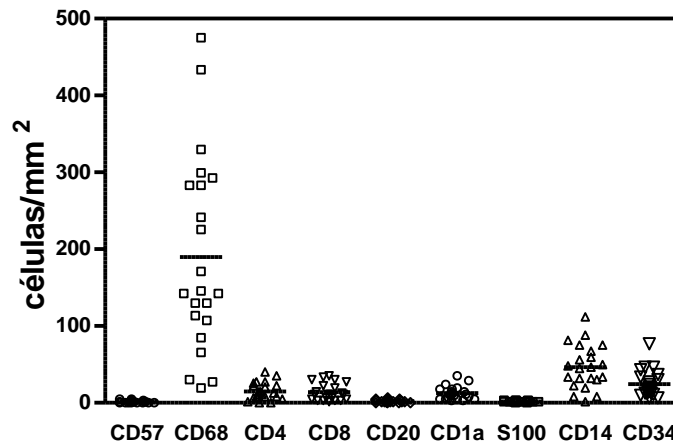


Gráfico 1 – Distribuição celular em luz alveolar de pacientes com DPI demonstrando o predomínio de células do fenótipo CD68+ e CD14+.

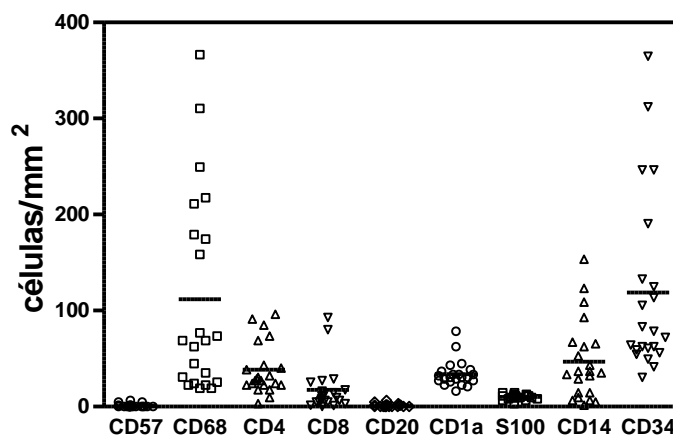


Gráfico 2 – Distribuição celular em septos alveolares de pacientes com DPI demonstrando o predomínio de células do fenótipo CD68+, CD14+ e TCD4+.

5.3.1. Avaliação de linfócitos TCD4, TCD8 e TCD20 na DPI e nos controles

Na avaliação do perfil de linfócitos TCD4 e TCD8 foi observada imunomarcção positiva, tanto na luz alveolar como nos septos. A análise

dos casos de DPI em relação aos controles demonstrou maior quantificação de linfócitos TCD4 nos pulmões controle do que nos de DPI, com significância estatística ($p < 0,0001$), (Gráficos 3 e 4 e Anexo 3).

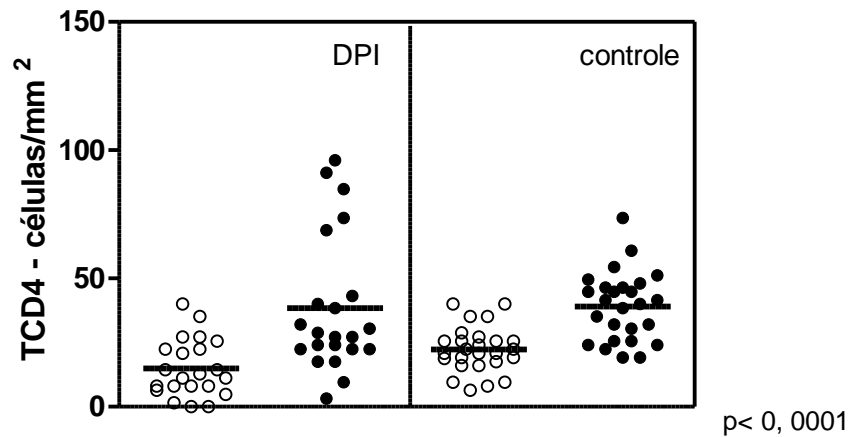


Gráfico 3 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para linfócitos TCD4 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

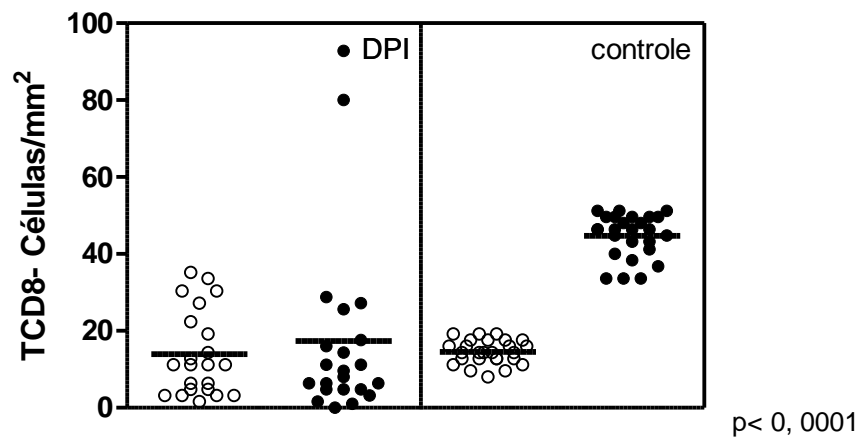


Gráfico 4 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para linfócitos TCD8 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

O anticorpo anti-CD20 apresentou imunomarcção, tanto nos alvéolos como nos septos alveolares. A análise quantitativa desses linfócitos mostrou maior expressão de células positivas nos pulmões de casos controles em relação aos de DPI, com correlação estatisticamente significativa (Tabela 4, Gráfico 5, Figura 5).

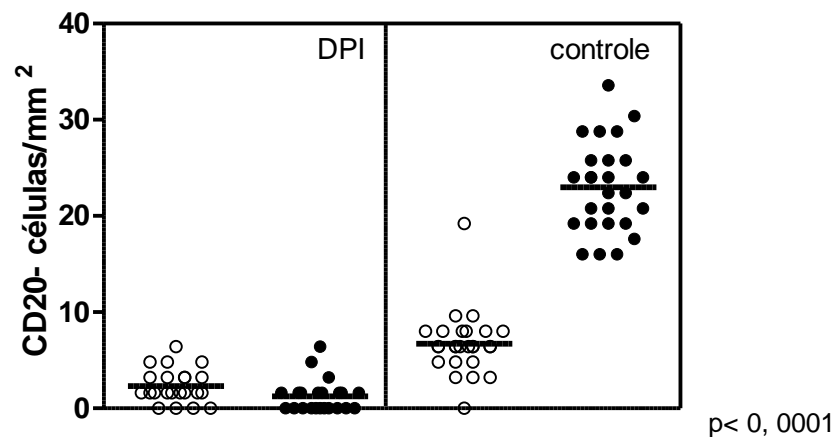


Gráfico 5 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para linfócitos CD20 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

5.3.2 Avaliação dos macrófagos

Os anticorpos CD68 e o CD14 apresentaram positividade para macrófagos no epitélio e luz alveolar, assim como nos septos alveolares. Foi observada expressiva imunomarcção celular na luz alveolar na DPI quando comparada com os controles ($p < 0,0001$) (Tabela 4, Gráficos 6 e 7, Figura 5).

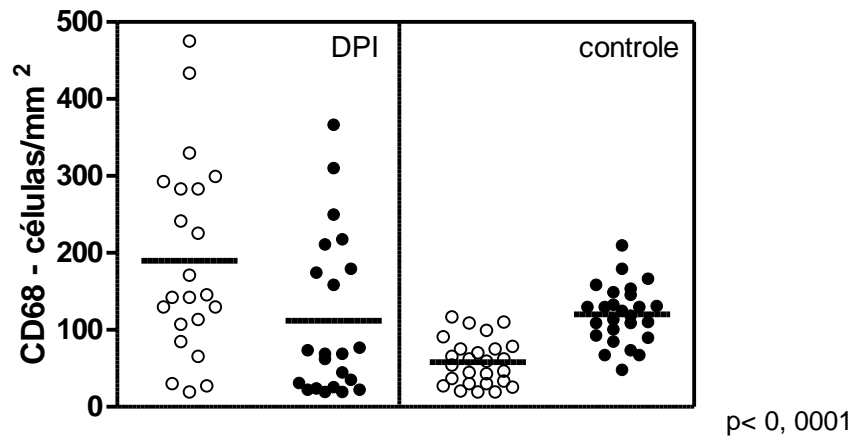


Gráfico 6 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para macrófagos (CD68) na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

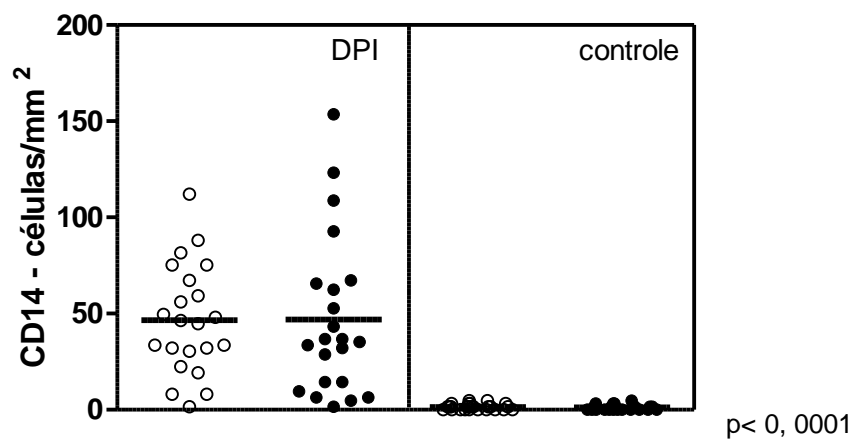


Gráfico 7 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para macrófagos (CD14) na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

5.3.3 Avaliação de células Natural Killer (NK)

As células NK demonstraram positividade, tanto na luz alveolar como nos septos. Houve rara imunomarcagem de células NK nos pulmões com DPI com maior imunomarcagem nos casos controles, tanto na luz alveolar

como nos septos alveolares, apresentando significância estatística ($p < 0,0001$) (Tabela 5, Gráfico 8, Figura 5).

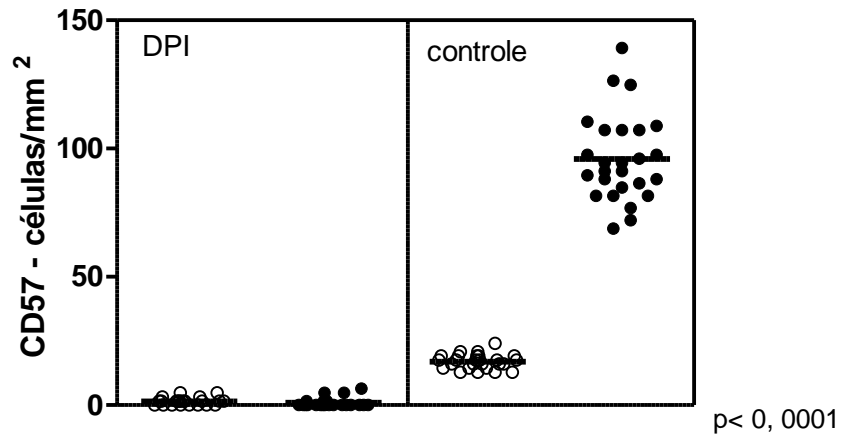


Gráfico 8 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para CD57 na luz alveolar e septos na DPI (o - luz alveolar) (• - septos).

5.3.4 Avaliação das células dendríticas

Imunomarcagem positiva para os anticorpos CD1a e S100 foram vistas tanto no espaço alveolar como nos septos alveolares com maior positividade nos septos, ressaltando-se a maior imunomarcagem em números absolutos nos casos controle, com significância estatística no CD1a quando comparados os casos de DPI e os pulmões controles (Tabela 5, Gráficos 9 e 10, Figuras 5 e 6).

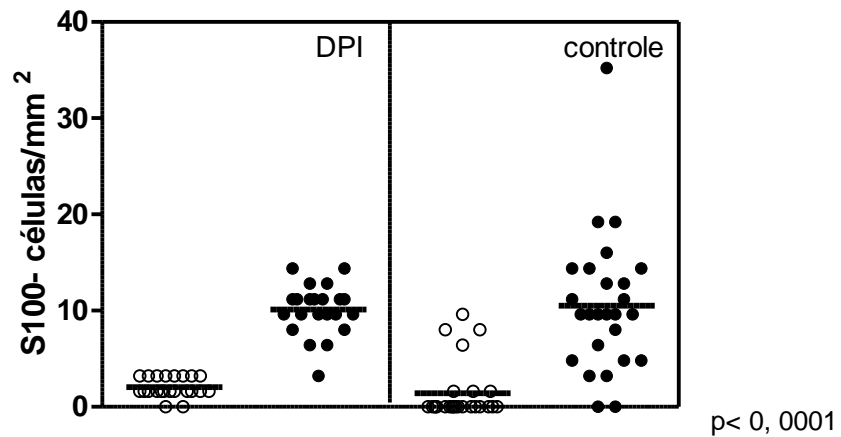


Gráfico 9 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para S100 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o- luz alveolar) (• - septos).

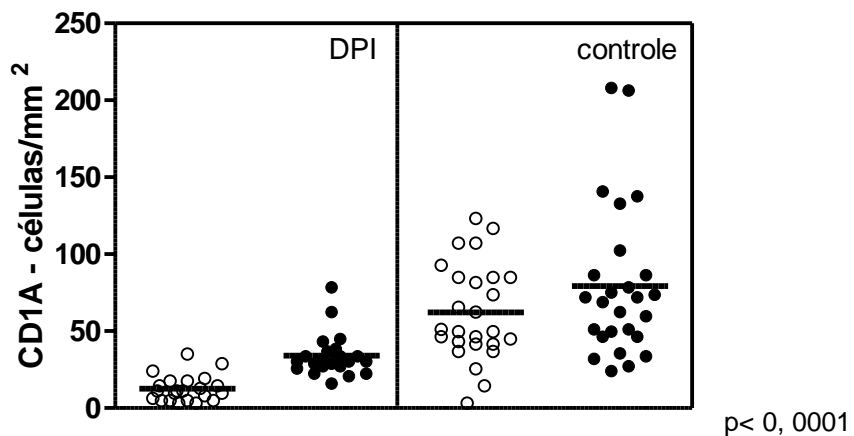


Gráfico 10 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para CD1a na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

5.3.5 Avaliação de complemento, ICAM-1, Toll-2 e SP-A

Imunomarcagem positiva para os anticorpos C3 foi observada no espaço alveolar com maior expressão que os controles (Gráfico 11).

Houve maior expressão em alvéolos e septos de ICAM-1, Toll-2 e SP-A (Figura 6 e Gráficos 12, 13 e 14).

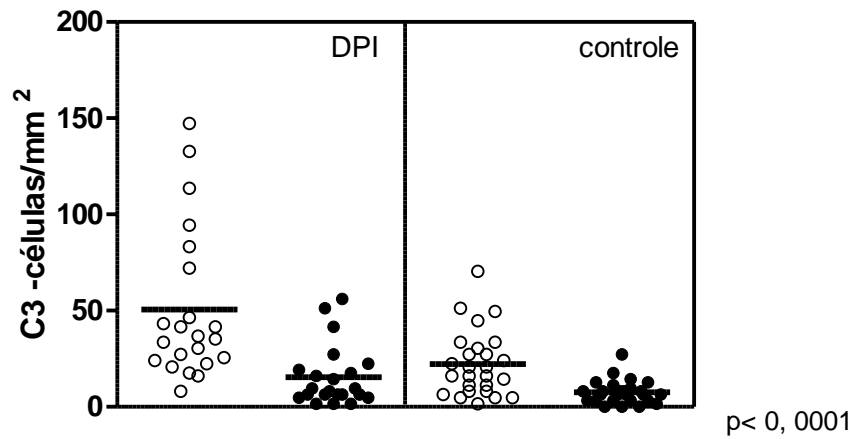


Gráfico 11 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para C3 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

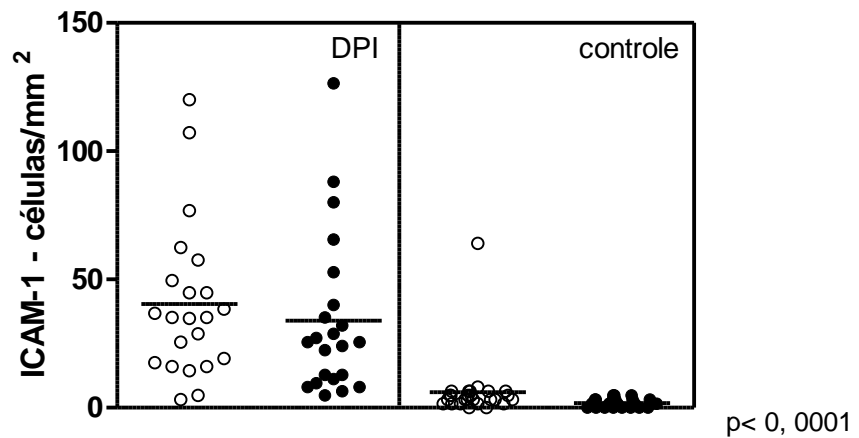


Gráfico 12 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para ICAM-1 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

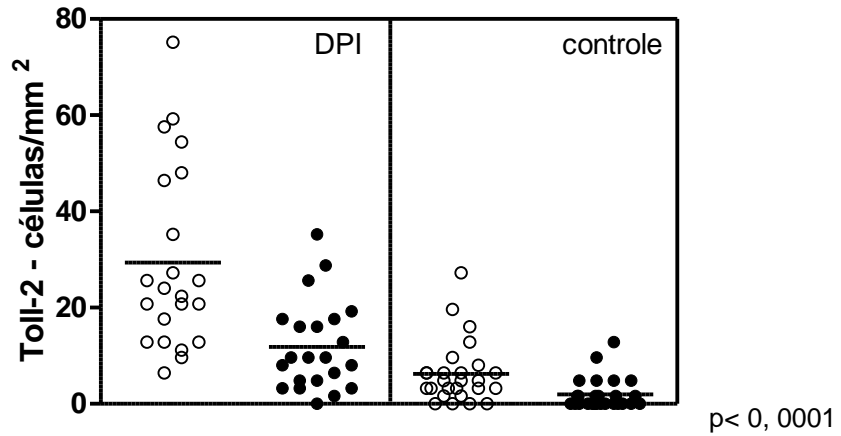


Gráfico 13 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para Toll-2 na luz alveolar e septos na doença pneumocócica invasiva e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

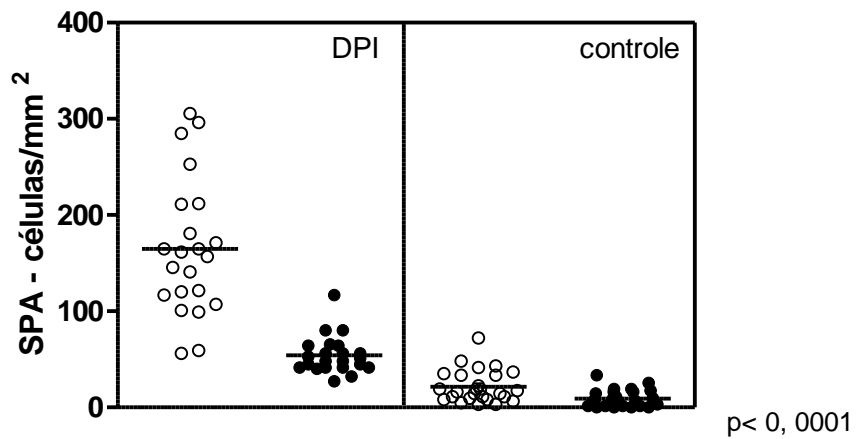


Gráfico 14 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para SP-A na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

5.3.6 Avaliação da Caspase-3

Houve menor expressão de Caspase-3 nos alvéolos e septos nos casos de DPI que nos controles (Figura 6 e Gráfico15). A positividade da reação foi evidenciada também em raras células epiteliais do revestimento alveolar.

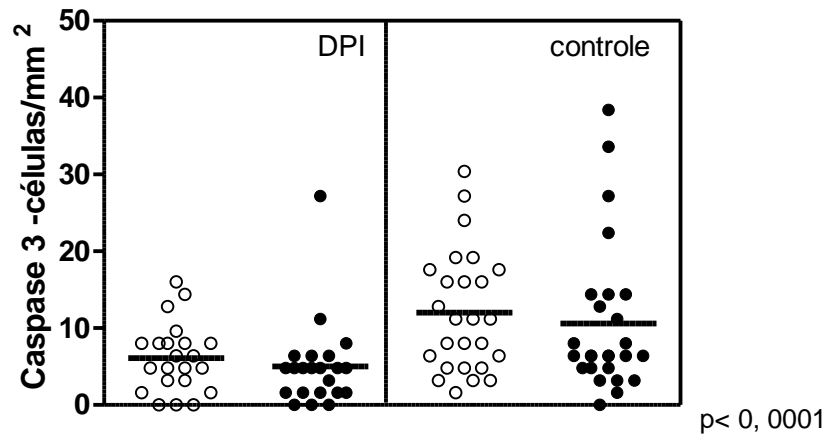


Gráfico 15 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para Caspase-3 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

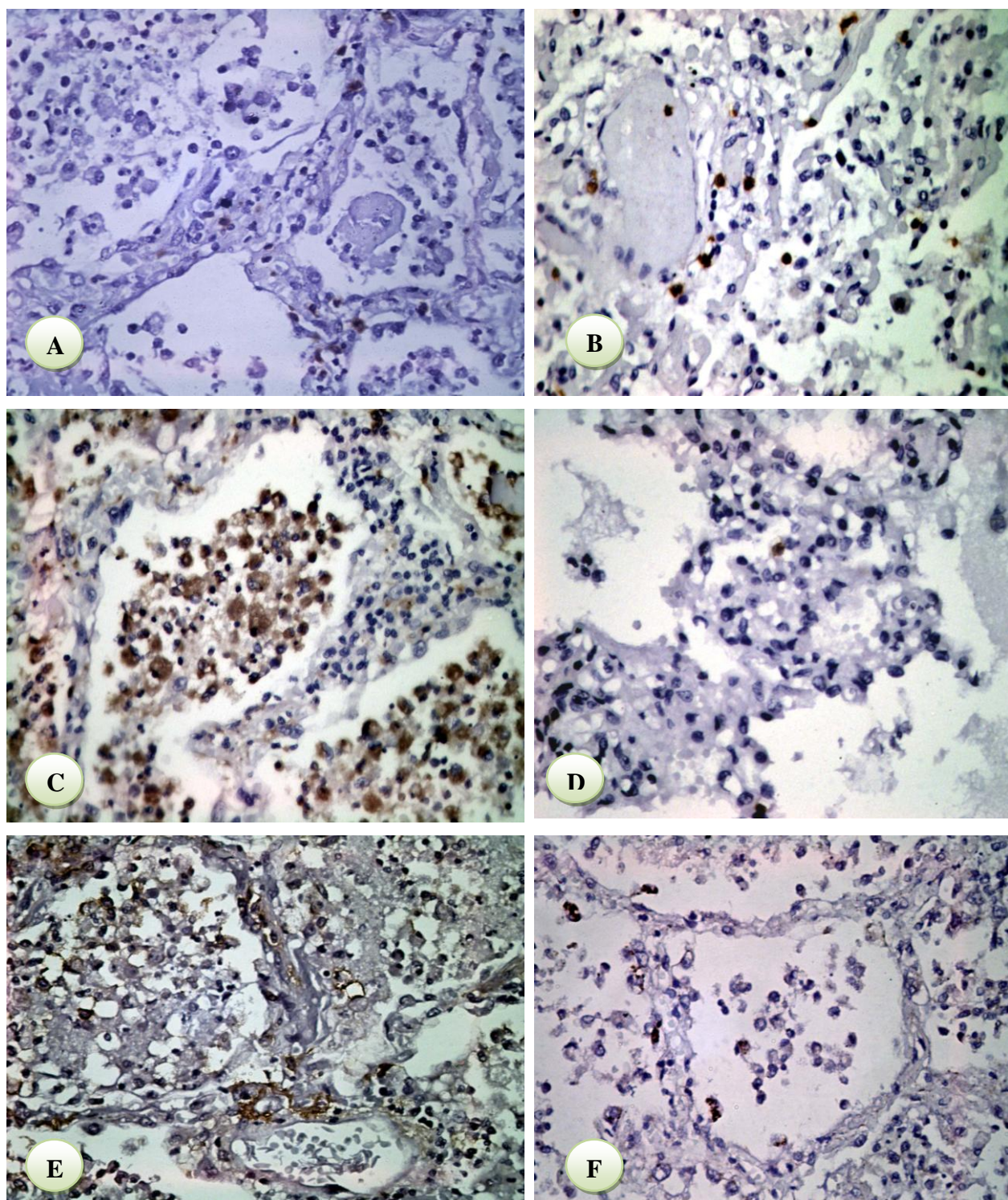


Figura 5: Pulmão – DPI – Imunomarcacão de linfócitos TCD4 (A) e TCD8 (B), CD68 (C), CD57 (D), CD14 (E), CD1a (F) (SABC, X 400)

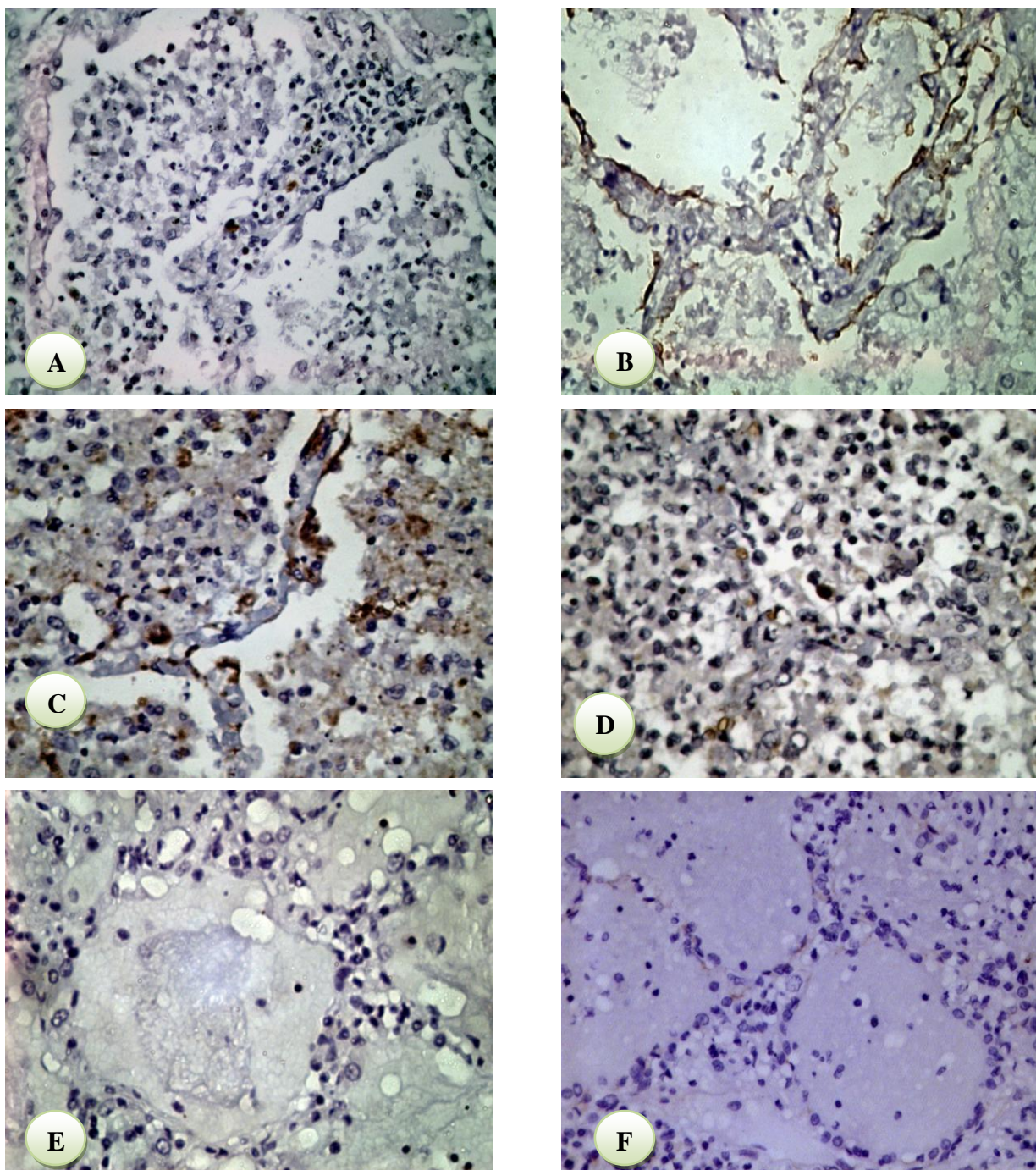


Figura 6: Pulmão – DPI – Imunomarcção de S100 (A) e ICAM-1 (B), SP-A (C), Toll-2 (D), Caspase (E) e CD34 (F) (SABC, X 400)

5.4 Avaliação de citocinas

As citocinas exibiram expressão de padrão variável de acordo com cada tipo. Na análise quantitativa foi observada maior expressão de TNF- α , IL-10, IL-2R e IL1- β (Figura 7, Tabela 5 e Gráficos 16 a 26). Ocorreu baixa expressão de IL-6, IL-8, IFN- γ , TGF- β e IL-4 (Figura 7, Tabela 5 e Gráficos 16 a 26).

Tabela 5 – Doença pneumocócica invasiva: análise quantitativa no pulmão *in situ* da produção de citocinas celulares em áreas selecionadas envolvidas na DPI e controles (C).

Marcador de superfície	Área pulmonar	Controle não infectados-C Mediana-IC x 10 ³	DPI Mediana-IC x 10 ³	Significância (p < 0.05)
IL-1- β	Alvéolo	15,2(11,7-19,1)	12,8(10,3-17,5)	NS
	Septo	9,6(6,5-12)	60(45,6-72,4)	C<DPI
IL-2R	Alvéolo	0(0,5-1,5)	1,6(1,1-6,3)	C< DPI
	Septo	0(0,1-0,9)	1,6(1,1-2,8)	C< DPI
IL-4	Alvéolo	53,6(40,7-66,6)	5,6(4,21-8)	C> DPI
	Septo	75,2(59,5-84,9)	4,8(4,1-9,1)	C> DPI
IL-6	Alvéolo	0 (0-0,4)	0 (0,4-3,3)	NS
	Septo	20,8(19,7-22,7)	9,6(7,8-14,4)	C> DPI
IL-8	Alvéolo	18,4(15,2-25,9)	1,6(1,1-6,5)	C> DPI
	Septo	3,2(3,2-5,8)	0 (0,4-1,4)	C> DPI
IL-10	Alvéolo	3,2(2,2-4,1)	20,8(18,2-27,3)	C< DPI
	Septo	1,6(0,8-1,9)	43,2(37,9-53)	C< DPI
IFN- γ	Alvéolo	43,2(37,2-66,3)	10,4(9,7-20,3)	C> DPI
	Septo	48(40,4-66,7)	2,4(2-5,4)	C> DPI
TNF- α	Alvéolo	9,6(6,5-12)	80(70,5-108)	C< DPI
	Septo	0(0,5-1,5)	63,2(53,4-79,8)	C< DPI
TGF- β	Alvéolo	10,4(7,6-11,8)	0 (0,12- 0,9)	C> DPI
	Septo	53,6(40,7-65,6)	43,2(40-52,5)	C> DPI

Os dados foram expressos como o número de células que expressam citocinas \pm SEM (tamanho da amostra analisada) por 0,0625 milímetro² campo microscópico de área selecionada.
 Comparação entre os grupos foi testada usando o teste Mann-Whitney.
 IC: Intervalo de Confiança
 NS: Não Significante

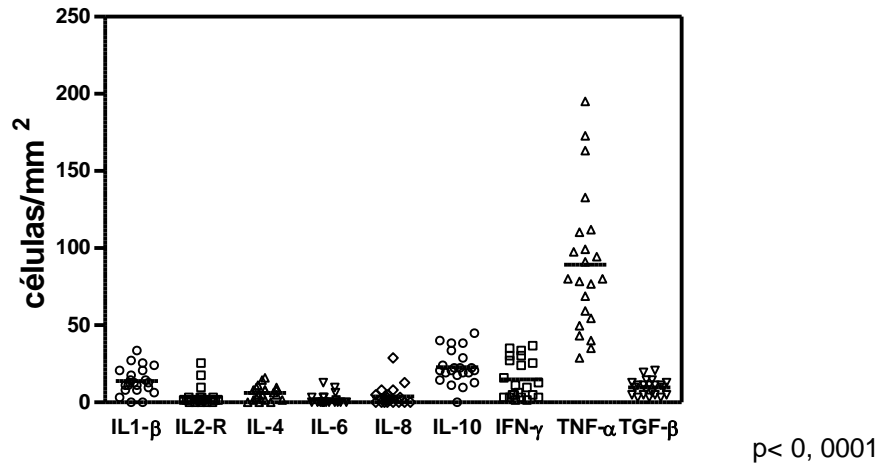


Gráfico 16 – Imunoexpressão de citocinas em luz alveolar de pacientes com DPI.

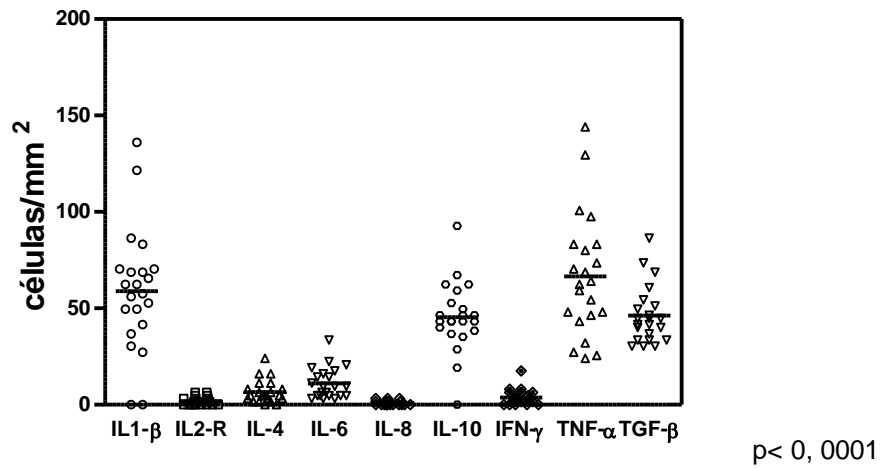


Gráfico 17 – Imunoexpressão de citocinas septos alveolares de pacientes com DPI.

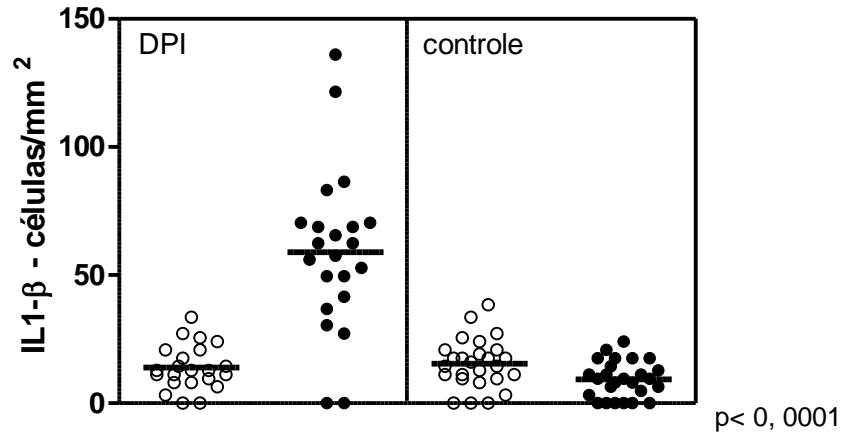


Gráfico 18 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para IL1-β na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

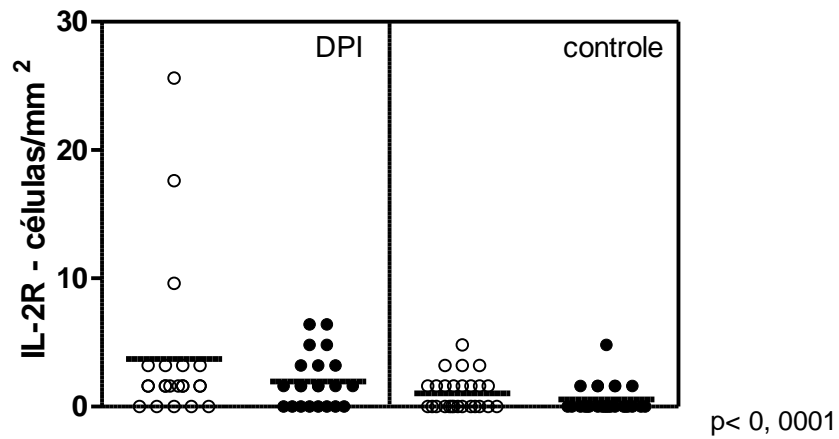


Gráfico 19 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para IL-2R na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

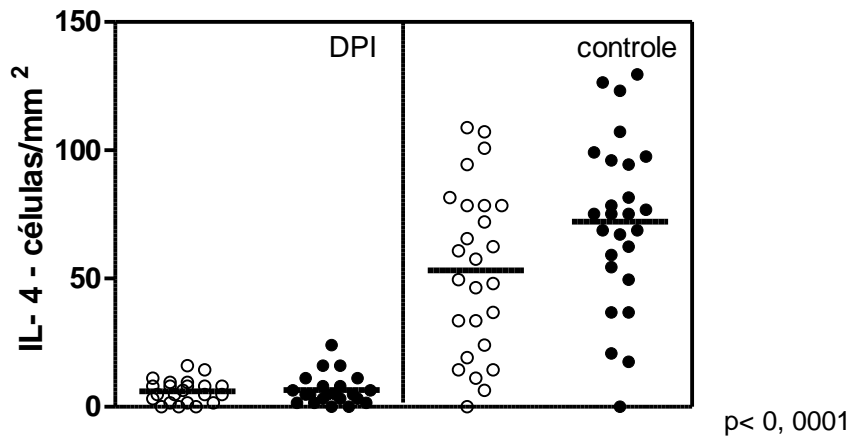


Gráfico 20 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para IL-4 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

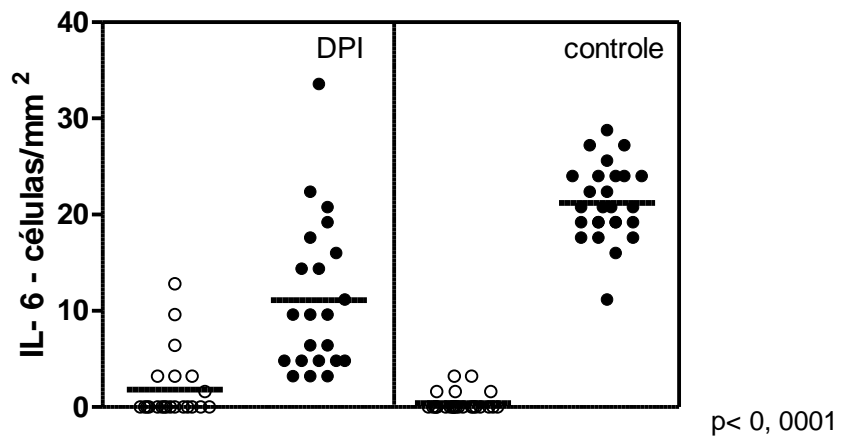


Gráfico 21 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para IL-6 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

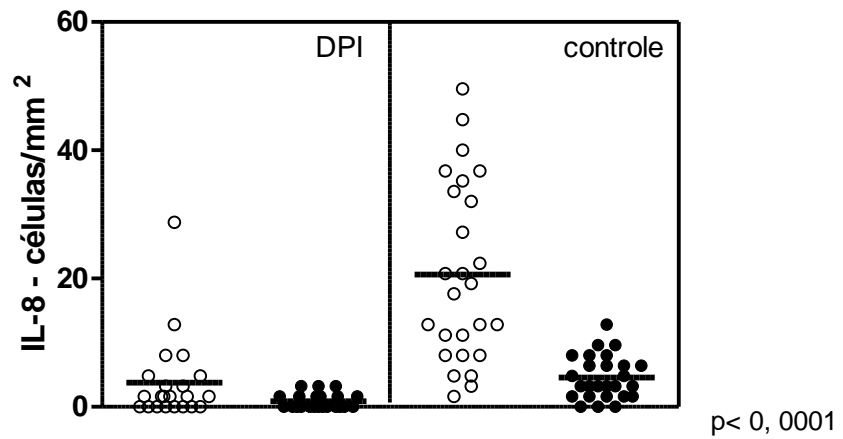


Gráfico 22 - Pulmão - avaliação quantitativa da imunomarcagem para IL-8 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

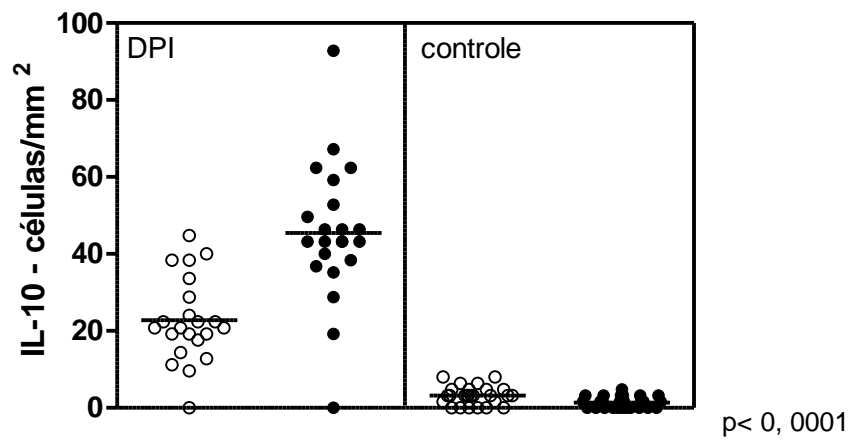


Gráfico 23 - Pulmão - avaliação quantitativa da imunomarcagem para IL-10 na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

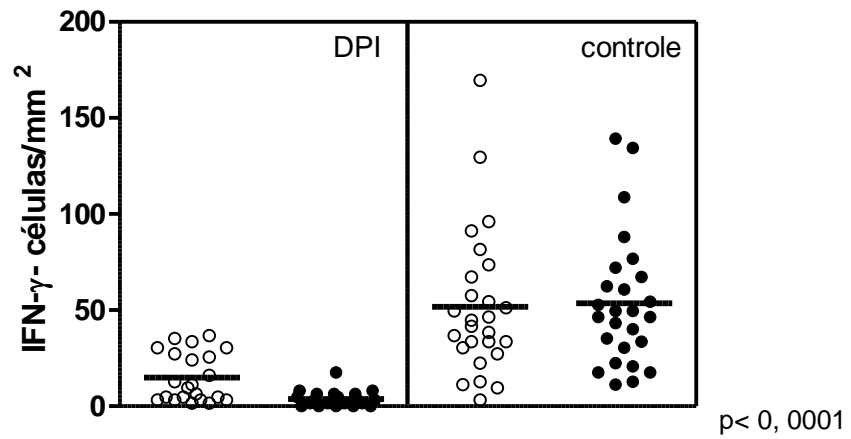


Gráfico 24 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para IFN- γ na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

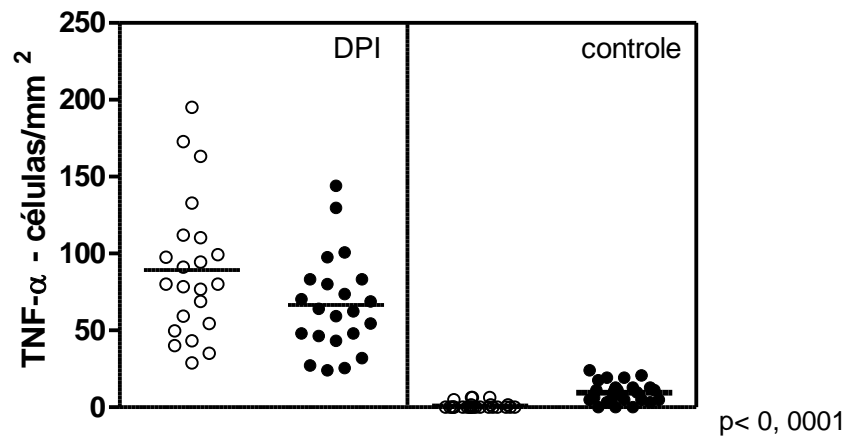


Gráfico 25 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcagem para TNF- α na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (• - septos).

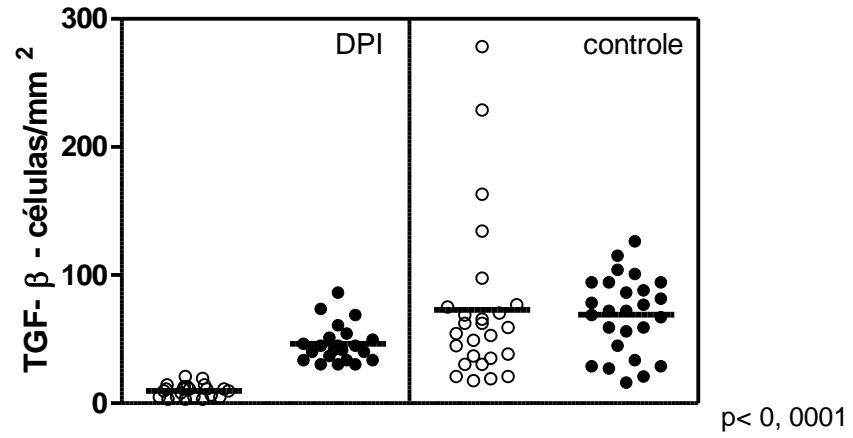


Gráfico 26 – Pulmão – avaliação quantitativa da imunomarcção para TGF-β na luz alveolar e septos na DPI e nos controles (o - luz alveolar) (● - septos).

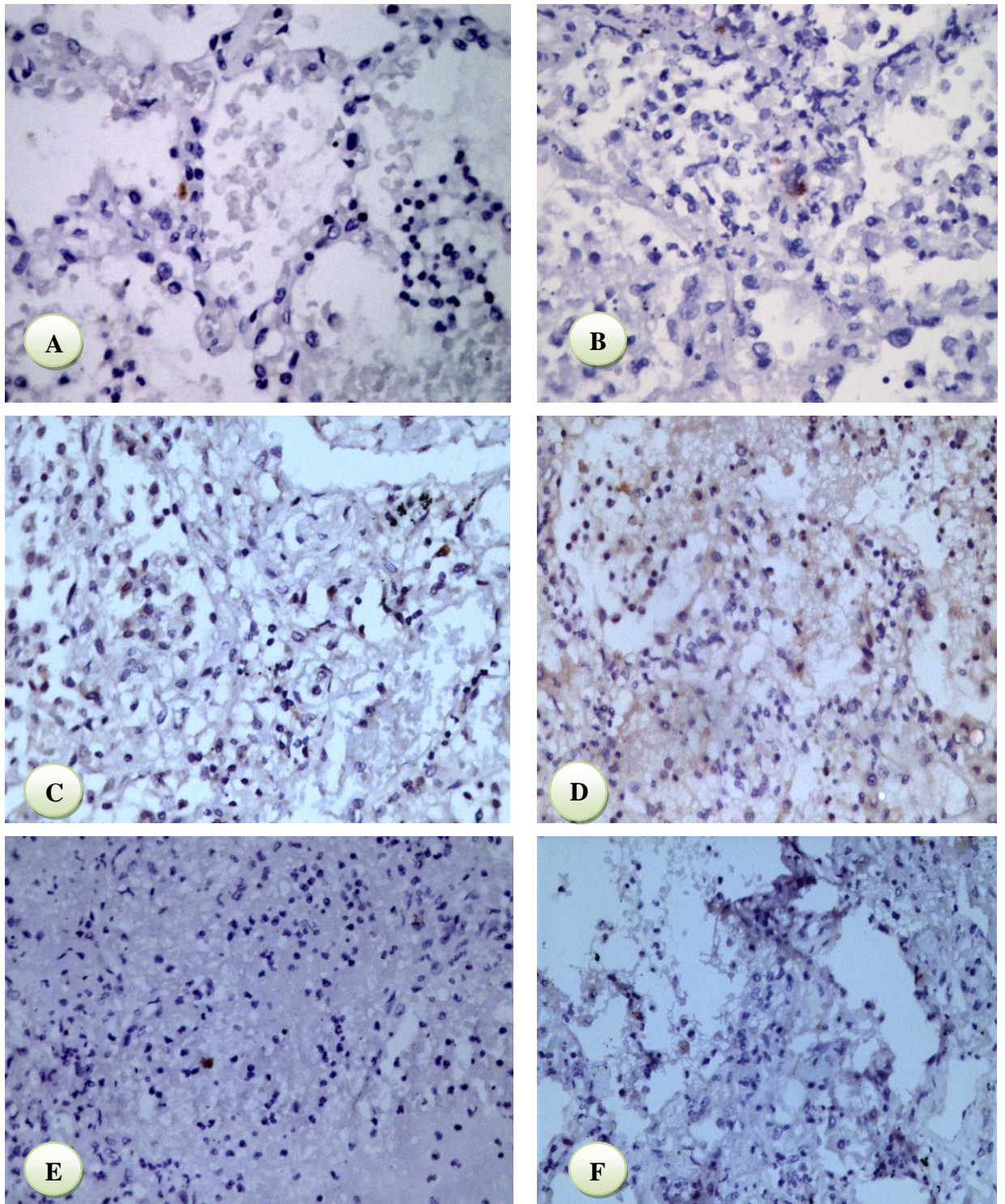


Figura 7: Pulmão – DPI – Imunomarcagem de IL-6 (A) e IL-8 (B), IL-10 (C), TNF- α (D), IFN- γ (E) e IL1- β (F) (SABC, X 400)

6 – Discussão

6.1 Considerações clínico-laboratoriais

Os componentes bacterianos e seus produtos que servem de gatilho para a inflamação são, geralmente, considerados fatores de virulência. Esta afirmativa assume que os patógenos, inclusive o pneumococo, estão equipados com ferramentas moleculares que têm por objetivo agredir o hospedeiro. Entretanto, a relação parasita-hospedeiro pode ser entendida de uma forma menos cartesiana. Seria mais o constante esforço de sobrevivência na fronteira de dois reinos vivos, procariontes e eucariontes, que dividem a experiência de co-evolução há bilhões de anos. O objetivo dos micróbios é passar despercebido pelo hospedeiro enquanto vive e se alimenta nele. Analogicamente, o objetivo do sistema imune do hospedeiro é bloquear invasores que possam ameaçar a homeostase. A doença resulta da quebra inadvertida desse delicado equilíbrio.

O pneumococo, componente habitual da microflora do trato respiratório superior humano e agente infeccioso oportunista, tem sido objeto de estudo minucioso há mais de um século (Welch, 1892). Em que pese os avanços na terapia antibiótica do século XX que trouxeram ao menos uma pausa temporária na mortalidade, as interações dos pneumococos com o organismo humano ainda permanecem não reveladas na sua totalidade. Avanços na compreensão dos detalhes da sepse estão revelando a enorme complexidade dos parasita e hospedeiro (Cohen, 2002).

A doença pneumocócica atinge todas as idades com predileção pelo sexo masculino (Klein, 1981; Robinson et al., 2001). A idade média dos doentes estudados foi de 46 anos, variando entre 12 e 74 anos e com a proporção de 45% para homens e 55% para mulheres, discordando da literatura estudada no que diz respeito à predileção pelo sexo. A literatura relaciona extremos de idade (menor de 2 anos e maior que 65 anos) com maior susceptibilidade à bacteremia e mortalidade (WHO, 1998; Alanee et al., 2007; Gilbert et al., 1994; Kalin et al., 2000; Macfarlane et al., 1982; Fine et al., 1996). Uma vez que nossa casuística excluiu os menores de 12 anos, encontramos apenas 2 (9%) casos em maiores de 65 anos. Idealmente, uma amostra maior poderia revelar maior relação da idade avançada com bacteremia e morte.

Em relação também ao perfil epidemiológico e em concordância com a literatura estudada, todos os casos apresentaram pelo menos uma situação como fator de risco para infecção pneumocócica, sendo preponderantes o etilismo 9%, tabagismo 12,5% e nível socioeconômico baixo 100%.

Em relação aos fatores de mortalidade, além da idade comentada, a bacteremia ocorreu em 100% dos óbitos e foi critério de inclusão da casuística. A considerar que todos os casos apresentaram quadro clínico de sepse grave e choque séptico com infecção de corrente sanguínea pelo pneumococo secundário à pneumonia, todos os casos tiveram foco extrapulmonar corroborando a literatura no favorecimento de mortalidade (Van Dam et al., 1990).

Não conseguimos recuperar nos registros do Hospital das Clínicas da FMUSP os sorotipos pneumocócicos dos casos, então, não pudemos estabelecer relação de mortalidade com algum sorotipo em especial. Da mesma forma, não encontramos documentado em prontuário relato de imunização prévia ao pneumococo em nenhum dos casos, bem como não houve registro de titulação de antígeno e anticorpo capsulares polissacárides pneumocócicos, também impossibilitando estudar o nexos como fator de mortalidade para a doença pneumocócica invasiva.

Em relação às doenças de base, 18 casos (81,8%) tinham pelo menos uma condição clínica relacionada ao pior prognóstico na doença pneumocócica invasiva, como o uso de corticoide 50%, neoplasia 27,2%, cirrose hepática 22,7%, insuficiência renal crônica 9%, diabetes mellitus 4,5% e transplante hepático 4,5%. Apesar da coinfeção com HIV ser fator de maior mortalidade para DPI (Breiman et al., 2000), a nossa casuística excluiu os pacientes com HIV como forma de evitar influência da imunossupressão consequente à infecção pelo HIV sobre achados histológicos da DPI no pulmão.

Todos os pacientes apresentaram choque séptico, enfatizando a característica do pneumococo em produzir toxina alfa, toxina pirogênica e seus superantígenos. Apesar de a literatura ressaltar como comum o empiema por complicação de pneumonia pneumocócica principalmente com bacteremia, nenhum dos pacientes apresentou tal complicação. Em acordo com a literatura, todos os casos apresentaram febre, tremores ou calafrios, taquicardia, tosse com expectoração purulenta, dor torácica e dispneia. Os

dois pacientes com idade superior a 65 anos apresentaram confusão mental flutuante e evoluíram para *dellirium* hipoativo durante a internação. A propedêutica pulmonar dos casos fora descrita em prontuário como alterada, sendo descritos apenas roncocal e estertores. Demais achados propedêuticos pulmonares característicos da infecção pneumocócica no pulmão (som maciço, broncofoia etc.) não estão registrados ou documentados em prontuário. Entretanto, os sinais e sintomas mais evidentes e que são obtidos mais facilmente na anamnese e exame físico mais elementar já apontavam o diagnóstico de infecção pulmonar. Ainda mais, a radiografia de tórax de todos os casos era alterada, descrita com infiltrado pulmonar localizado e unilateral em 90% dos casos e com infiltrado bilateral nos demais. Derrame pleural esteve descrito em metade dos pacientes e não houve referência de cavitações em nenhum caso. Tais achados radiográficos são concordantes com as referências consultadas em literatura e, aliados à apresentação clínica, indicaram o diagnóstico de infecção pulmonar bacteriana grave com sepse ou choque séptico. Todos os casos receberam, à admissão hospitalar, antibióticoterapia com cobertura para *Streptococcus pneumoniae* além de cobertura para outros agentes comuns em infecções pulmonares graves da comunidade. Dessa forma, nenhum dos casos sofreu interferência de maior gravidade na evolução da doença por falta de antibiótico específico para o pneumococo, mesmo antes do resultado das culturas.

Todos os casos tinham isolamento de *Streptococcus pneumoniae* sensíveis à penicilina, apesar de os estudos epidemiológicos, no Brasil,

apontarem resistência à penicilina de 10 a 28%. Estudos relacionam a resistência à penicilina com menor capacidade de invasão (Levin et al., 1998). Entretanto, não podemos afirmar que, pelo fato dos pneumococos dos casos serem sensíveis à penicilina, tenha ocorrido maior facilidade para a invasão.

6.2 Achados histopatológicos na DPI em comparação com a literatura

A progressão da pneumonia publicada por Laennec (1932) e Loosli (1940), na era pré-antibiótica, possui quatro estágios: espessamento/congestão, hepatização vermelha, hepatização cinzenta e resolução. Os casos analisados apresentaram pneumonia lobar, todos na fase de hepatização cinzenta com intenso exsudato neutrofílico, abundante presença de macrófagos, hemorragia alveolar, congestão capilar e debris celulares. É consenso que a pneumonia pneumocócica é muito comum (Brandileone et al., 2006; Goldman et al., 2009) e pode causar um quadro clínico dramático devido à intensa inflamação pulmonar. A defesa inata e a defesa mediada por anticorpos podem controlar a infecção em alguns casos e a pneumonia lobar grave se resolveria caso a arquitetura pulmonar original fosse preservada ou tivesse condições de retornar ao estado funcional normal (*restitutio ad integrum*). Não se observou, na presente casuística de casos de DPI, a fase de resolução, quando haveria lise da fibrina e redução progressiva do exsudato inflamatório, permitindo a entrada de ar nos alvéolos (Geraldo, 2006; Robbins, 2007). A intensa destruição da arquitetura

pulmonar observada nos casos de DPI suscita a ideia da inabilidade da resposta inflamatória desses pacientes em controlar a multiplicação bacteriana sem que ocorra produção excessiva de detritos inflamatórios pela lise bacteriana intensa. Isto é fundamental para a recuperação e representa um ponto de inflexão entre a vida e a morte no curso da doença. De acordo com o verificado pelo exame histológico dos pulmões ficou patente a inabilidade do hospedeiro para lidar com o grave processo inflamatório que acometeu os pacientes, pois os alvéolos estiveram ocupados por grande quantidade de células inflamatórias, líquido de edema, fibrina, membranas hialinas. A essa situação aliou-se o intenso comprometimento inflamatório septal com necrose do revestimento de pneumócitos. O conjunto de alterações alveolares e septais certamente impediu as trocas respiratórias e pode ser responsabilizado pela gravidade do processo.

6.3 Como se dá a progressão do pneumococo e a reação do tecido pulmonar na DPI?

O pneumococo é presumidamente, aerossolizado da nasofaringe para o alvéolo, ultrapassando o epitélio ciliar, uma vez que não tem a capacidade de aderir neste (Tuomanem et al., 1986). Possivelmente, em 12,5% de nossa casuística, a invasão foi facilitada por lesão do epitélio respiratório pelo tabagismo. Não houve referência em prontuário a respeito de infecção viral prévia à infecção pneumocócica que pudesse favorecer a invasão. Não foram detectados outros agentes infecciosos no tecido pulmonar dos casos

investigados. Uma vez localizado na via aérea, o pneumococo libera pneumolisina e peróxido de hidrogênio que exacerbam a lesão de mucosa e inibem o batimento ciliar (Feldman et al., 1990). O epitélio alveolar constitui excelente sítio de adesão ao pneumococo (Tuomanem, 1995). Estudo patológico das lesões pneumônicas muito recentes mostrou a bactéria flutuando livremente em fluido seroso na superfície de pneumócitos tipo 2 (Rake et al., 1936). A presença do pneumococo no alvéolo não leva necessariamente à inflamação a menos que haja multiplicação (Talbot et al., 1996). Nosso estudo não observou pneumococo livre no pulmão em nenhum dos casos, provavelmente pelo tempo de exposição da bactéria à resposta inflamatória aguda (média de 8,8 dias) e ao tratamento instituído. A cinética dos eventos patológicos durante a progressão da infecção pneumocócica no pulmão, descrita na literatura, sustenta nossa observação. A multiplicação bacteriana ocorre livre nas fases de espessamento ou congestão e na fase de hepatização vermelha, culminando 36 horas após a aspiração do pneumococo para o alvéolo (Hamburger et al., 1940; Mold et al. 2002). Pode se seguir, então, a bacteremia como resultado da adesão pneumocócica e da invasão das células alveolares (Osler, 1897). O edema se inicia a partir do endotélio induzido por sinalização resultante da ativação da via alternativa da cascata do complemento (Wood et al., 1946). Citocinas pró-inflamatórias começam a aparecer no lavado bronco-alveolar nas primeiras horas da fase de espessamento, ao nível máximo na fase de hepatização vermelha (18-24 h)(Fillion et al., 2001). Nesta fase, a atividade citolítica da pneumolisina é exuberante e o endotélio ativado expressa o fator tecidual,

gatilho para a atividade pró-coagulante (Gould et al., 2002). Durante a fase de hepatização cinzenta, após 48 horas da aspiração do pneumococo, leucócitos polimorfonucleares são recrutados e começam a controlar a multiplicação pneumocócica (Hamburger et al., 1940). A ativação do complemento pela pneumolisina auxilia neste clareamento bacteriano (Hirst et al., 2002). O resultado da infecção depende, pelo menos em parte, da capacidade do hospedeiro em suportar a inflamação associada com a morte do pneumococo. Nossos achados são, portanto, concordantes com a literatura estudada que afirma que nesta fase de evolução de pneumonia não haveria bactérias presentes em tecido pulmonar (Geraldo, 2006; Robbins, 2007). Além disso, todos os pacientes receberam antibióticoterapia específica para o pneumococo durante a evolução, o que favoreceu a redução do inóculo bacteriano.

6.4 Resposta imune

A resposta imune do hospedeiro é órgão-específico e nem sempre o que é aferido no sangue reflete o que está ocorrendo nos locais de lesão (Raz, 2007). Para a melhor caracterização do processo patológico optamos pela averiguação das alterações celulares fenotípicas, de citocinas e de outros fatores envolvidos na resposta imune no sítio da lesão pulmonar na DPI.

6.4.1 Macrófagos (CD68 e CD14) e pneumococo na DPI

Nos pulmões de DPI encontramos uma maior expressão de macrófagos (CD68 e CD14) alveolares em comparação com pulmões controles ($p < 0.0001$). Não houve diferença estatisticamente significativa, da expressão de macrófagos nos septos alveolares em comparação com os controles. Isto pode ser explicado pelo processo estar ocorrendo, na sua maior magnitude, dentro dos alvéolos, por se tratar de pneumonia lobar e não de pneumonia intersticial. Os macrófagos alveolares derivam de monócitos circulantes ou são provenientes dos próprios pulmões (macrófagos residentes), originados provavelmente dos remanescentes mielopoiéticos existentes no território alveolar (Geraldo, 2006). Cada alvéolo possui macrófagos residentes, que representam a primeira linha de defesa do compartimento alveolar, o que torna os pulmões um órgão especial e diferente de outros tecidos onde os neutrófilos são as primeiras células presentes nos focos inflamatórios (Robbins, 2007). Os macrófagos alveolares residentes contribuem para a defesa do hospedeiro na fase inicial da resposta imune inata contra bactérias nos pulmões, por meio da fagocitose dos agentes infecciosos (Franke-Ullmann et al., 1996; Underhill et al., 2002). Nos pulmões da DPI, provavelmente, os macrófagos residentes exercem esta função por já estarem de prontidão no interior dos alvéolos. Em consequência da secreção de fatores quimiotáticos dos pneumócitos tipo II, macrófagos adicionais são atraídos para este microambiente (Robbins, 2007). Entretanto, em que pese a maior quantidade de macrófagos

alveolares encontrados na DPI, a ativação desses macrófagos é a vigamestre na patogênese da pneumonia. Estudo murino sobre o papel dos macrófagos alveolares na pneumonia pneumocócica encontrou que, mesmo depletados, os macrófagos ativados conseguiram o clareamento bacteriano (Knapp et al., 2003). Outros estudos associaram depleção quantitativa de macrófagos e qualitativa (não ativados) com diminuição do clareamento bacteriano (Broug-Holub et al., 1997; Leemans et al., 2001; Cheung et al., 2000). Essa ativação poderia ser considerada se houvesse expressão significativa de IL-8 e TGF- β (Robbins, 2007; Abbas et al., 2003), por exemplo, e que não ocorreu nos casos de DPI investigados. Assim sendo, apesar de aumentados no sítio da lesão, os macrófagos não foram capazes de clarear dos alvéolos os debris celulares, fibrina, hemácias que abarrotam os alvéolos e comprometem os fenômenos respiratórios. Os macrófagos expressando CD14 também estiveram aumentados nos septos alveolares denotando a migração dessas células para os alvéolos.

6.4.2 Células Natural Killer (NK) na DPI

Nos pulmões com DPI, observamos em todos os casos diminuição da expressão de células NK teciduais tanto intra-alveolar como septal ($p < 0,001$) em relação aos pacientes controles.

AS NK são células com capacidade natural ou espontânea de matar patógenos microbianos e seu repertório imunológico confere a capacidade a essas células em tornar imediata e eficaz a resposta imune inata contra

patógenos (Bancroft, 1993). O achado de diminuição das NK nos pulmões nos casos de DPI traduz o papel fundamental de comprometimento de um braço extraordinário da imunidade inata em sua habilidade de resolução do processo desencadeado frente à agressão representada pelo pneumococo. As células NK são descritas como importantes para a sinalização do perfil Th1 e sua deficiência é correlacionada a episódios septicêmicos recorrentes (Biron et al., 1989; Bancroft, 1993; Jawahar et al., 1996). Elas possuem dois principais mecanismos para o controle de infecções: matar alvos após a ativação por via citotóxica e produzir citocinas, em especial, o IFN- γ , citocina crucial para direcionamento para uma resposta adaptativa de perfil Th1 (Trip et al., 1993, 1994). Na DPI tornou-se explícito o comprometimento de um dos pilares da resposta imune inata, Assim sendo, poder-se-ia pensar que a indução de sua ativação poderia representar uma linha alternativa para tratamento da DPI, a ser investigada.

6.4.3 Células de Langerhans CD1a na DPI

Encontramos nos casos de DPI significativa baixa expressão de células de Langerhans, tanto nos alvéolos como nos septos ($p < 0,0001$).

Estas células são células dendríticas imaturas, encontradas em muitos órgãos e tecidos, inclusive no pulmão, cuja principal função é aprisionar e transportar antígenos proteicos para os linfonodos drenantes (Abbas, 2003; Robbins, 2007). Durante sua migração para os linfonodos amadurecem em células dendríticas, podendo apresentar antígenos de

forma eficiente às células T virgens (Geraldo, 2006). Sua baixa expressão também sinaliza para o comprometimento da resposta imune inata na DPI, pois representa o elo de ligação entre os dois tipos de imunidade.

6.4.4 Células dendríticas S-100 na DPI

Encontramos significativa maior expressão de células dendríticas nos alvéolos ($p < 0,001$), mas sem diferença estatisticamente significativa nos septos. Essas células compõem instrumento da transição da resposta imune inata para a resposta adaptativa e fazem parte do grupo das células acessórias, não linfoides das quais depende o início e o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Abbas et al., 2003). Nossos achados divergem da literatura consultada que correlaciona a infecção pneumocócica com indução de apoptose das células dendríticas (Colino et al., 2003). No microambiente tecidual pulmonar da DPI encontrou-se baixa expressão de caspase-3 indicando que no sítio da lesão não foram verificados fenômenos expressivos de apoptose.

6.4.5 Apoptose, citocinas pró-inflamatórias, Toll e SP-A na DPI

A avaliação da resposta imune *in situ* nos pulmões de DPI pode caracterizar um ambiente de intensa resposta inflamatória aguda e morte celular por necrose e não por apoptose. Julgamos importante a menor expressão local pulmonar de caspase-3 na DPI, pois esse achado confirma

qua a morte celular tecidual nas áreas de pneumonia se faz preferencialmente por necrose. Também ocorreu diminuição da expressão de TGF- β , uma citocina fortemente relacionada à apoptose. Tomados em conjunto, esses resultados podem indicar uma estratégia defensiva do pneumococo inibindo a morte celular programada. Nossos achados resultantes da avaliação quantitativa *in situ* da expressão de caspase-3 diferem, portanto, daqueles de Ali F et al., 2003 e Zychlinsky A et al., 1997, que consideram que o pneumococo induziria apoptose dos macrófagos. Deve ser considerado também o fato observado em estudo murino de Dockrell e colaboradores em 2003, que relacionou a apoptose de macrófagos frente à infecção pneumocócica, porém com baixo inóculo bacteriano. O modelo murino com baixo inóculo bacteriano foi caracterizado pelo clareamento do pneumococo sem recrutamento de polimorfonucleares, ausência de bacteremia e sobrevivência dos animais. Isso nos sugere que na infecção pulmonar invasiva com grande inóculo bacteriano, isolamento do pneumococo em corrente sanguínea, como nos casos estudados, ocorra inibição da apoptose. Mais ainda, a literatura descreve a apoptose ou morte celular programada como programa evolutivamente conservado, regulamentado genética e bioquimicamente para desempenhar papel fundamental durante o desenvolvimento e homeostase dos tecidos de organismos multicelulares (Steller, 1995). Em contraste com a necrose, a apoptose permite ao organismo eliminar células lesadas de uma maneira imunologicamente silenciosa e assim preservar a função do órgão (Savill, 1996; Dallaire et al., 2001). Acreditamos, então, que na DPI, o dano

pulmonar pela morte por necrose celular foi tamanho que impediu a função primária e vital dos pulmões: a respiração. Destruiu-se o agente causal e com ele o órgão e o indivíduo.

Serão necessárias futuras investigações para caracterizar em definitivo o papel da apoptose na DPI a fim de que se possa considerar o uso de terapêuticas alternativas antiapoptóticas

A maior expressão nos casos de DPI de CD68, CD14, IL-1, TNF- α e ICAM-1 corroboram a literatura quando da caracterização de uma resposta inflamatória aguda frente ao pneumococo (Rijneveld et al., 2001; Bergeron et al., 1998; Rijneveld et al., 2002; Talashima et al., 1997; Lauw et al., 2002).

Na DPI houve aumento de SP-A que assim contribui para a quimiotaxia de neutrófilos para a região, justificando a grande quantidade de neutrófilos observada pela avaliação histopatológica.

Pudemos constatar que, frente à infecção pneumocócica invasiva, os receptores padrão de reconhecimento microbiano Toll 2 estiveram aumentados em relação aos controles. Tal fato favoreceria a ativação de macrófagos, NK, células dendríticas e complemento com produção de citocinas-chave para o desenvolvimento de resposta inflamatória aguda eficiente, além de sinalização para uma resposta Th1 competente. Realmente, houve aumento de macrófagos, de células dendríticas S100+, exsudação de polimorfonucleares neutrófilos, ativação do complemento e expressão aumentada de moléculas de adesão do endotélio (CD34, ICAM-1). A maior expressão nos casos de DPI de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF α) e de ICAM-1, corrobora estudos de caracterização da resposta

inflamatória aguda frente ao pneumococo (Rijneveld et al., 2001; Bergeron et al., 1998; Tuomanen, 1986).

Entretanto, em que pese esses achados, a diminuição significativa das células NK e de células de Langherans, torna explícito o comprometimento da imunidade inata na DPI.

Desconhecemos, de acordo com a literatura consultada, análise de IL-6 e IL-8 no tecido pulmonar frente à DPI. Existem relatos de favorecimento da expressão dessas citocinas frente à exposição ao pneumococo (Rijneveld et al., 2001; Lauw et al., 2002; Madsen et al., 2000). Nossa pesquisa demonstrou baixa expressão de IL-6 e IL-8 na DPI. Isso comprometeria o mecanismo de quimiotaxia, fato que pode ser interpretado como mais uma evidência do comprometimento da imunidade inata na DPI. A identificação de baixos níveis de IL-6 e IL-8 em pacientes de DPI poderia eventualmente ser usada como fator de mau prognóstico.

Como o tempo médio de evolução para óbito foi de 8,8 dias na nossa casuística, seria esperado uma resposta imune adaptativa já instalada. Entretanto, isto não ocorreu na DPI, pois as células TCD4 e TCD8 estiveram depletadas significativamente. Isto, aliado à diminuição das células NK, poderia justificar a baixa expressão de IFN γ detectada na DPI. Talvez esse fato dependa também do aparecimento de linfócitos ativados somente mais tarde no curso da inflamação (Hand et al., 1974). As baixas expressões de TCD4, TCD8, CD20 e IL4 nos casos de DPI denotam que a sinalização para a resposta imune adaptativa humoral está comprometida.

A verificação de baixa expressão de TCD8 na DPI certamente remete ao comprometimento da atividade citotóxica frente ao pneumococo.

Além disso, a baixa expressão de IL-4 estaria relacionada à diminuição dos linfócitos B observados na lesão pulmonar. A ocorrência de aumento de expressão de IL-10 também poderia contribuir para o efeito regulatório da inflamação e diminuição da expressão de IFN- γ .

O microambiente dos casos de DPI evidenciou significativa expressão de C3 quando comparado com o grupo controle, denotando que o pneumococo ativou a resposta imune inata pelas vias do complemento (clássica e alternativa) na tentativa de promover opsonização, fagocitose e morte do pneumococo. O microambiente encontrado reforça a ideia de que, após a invasão do pneumococo, a liberação das citocinas pró-inflamatórias favoreceu o aumento da permeabilidade vascular, a lesão endotelial, a vasodilatação, a excessiva exsudação de fluido e proteínas plasmáticas, o acúmulo de neutrófilos que, na resultante, causaram muito mais dano tecidual do que controle do pneumococo.

Todos os eventos em conjunto sinalizam para impedimento de uma resposta adaptativa efetora eficaz contra o pneumococo.

Os achados encontrados nessa investigação convergem para a caracterização de que as lesões teciduais graves na DPI seriam decorrentes do comprometimento inicial da imunidade inata, em especial das células NK e das células apresentadoras de antígeno, o que leva ao prejuízo da imunidade adaptativa protetora, concomitante à redução da apoptose que funcionaria como possível estratégia defensiva do pneumococo.

Os mecanismos imunopatogênicos envolvidos na DPI podem ser visualizados na Figura 8.

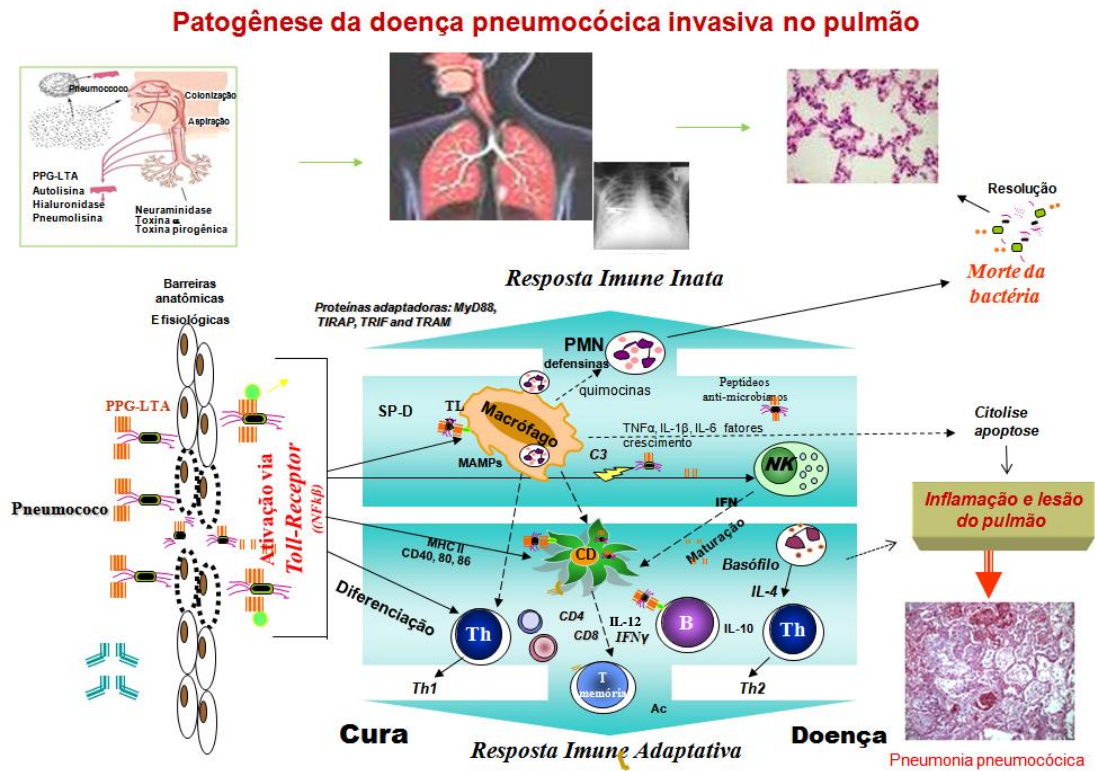


Figura 8: Patogênese da doença pneumocócica invasiva no pulmão

7 – Conclusão

Conclusão geral

As lesões teciduais graves na Doença pneumocócica invasiva (DPI) seriam decorrentes do comprometimento parcial da imunidade inata, em especial das células NK e das células de Langherhans, levando ao prejuízo da imunidade adaptativa que se associou à redução da apoptose habitual do hospedeiro, um mecanismo peculiar do *Streptococcus pneumoniae* como estratégia de evasão.

Conclusões específicas

1. A DPI nos pulmões caracterizou-se por um ambiente de intensa resposta inflamatória aguda e morte celular por necrose que impediram a função vital da respiração, sem evidências de resolução do processo.

2. A evolução para óbito dos pacientes com DPI não depende apenas da pronta instituição terapêutica e da sensibilidade do pneumococo à penicilina.

3. Na DPI, a baixa ocorrência de apoptose relacionada à baixa expressão de TGF- β poderia ser resultante de sua inibição pelo alto inóculo pneumocócico, traduzido pela bacteremia encontrada.

4. Na DPI, a baixa expressão de NK e de células de Langerhans indicam comprometimento inicial da imunidade inata que favorece o desequilíbrio da resposta inflamatória local, fundamental para o desfecho favorável da infecção.

5. A magnitude do processo inflamatório agudo na DPI ocorreu com a expressão aumentada de TNF- α , IL1- β , ICAM-1 e CD34 responsáveis pelos fenômenos vasculares e exsudativos da doença.

6. A baixa expressão de IL-6 e IL-8 na DPI, sinalizando comprometimento da imunidade inata e da quimiotaxia de neutrófilos, poderiam ter aplicabilidade clínica como marcadores de mau prognóstico.

7. Na DPI, o aumento da expressão de SP-A no pulmão representa mecanismo compensatório face ao comprometimento da quimiotaxia mediada por citocinas.

8. A maior expressão de Toll-2 na DPI em comparação com os controles sinaliza para o reconhecimento do pneumococo como invasor, apesar do comprometimento da imunidade inata.

9. Na DPI existe comprometimento da imunidade adaptativa demonstrada pela baixa expressão de IFN- γ , de TCD4 e de TCD8, possivelmente pelo detrimento da imunidade inata.

10. Ocorreram na DPI mecanismos compensatórios à intensa resposta inflamatória no pulmão por meio da expressão aumentada de IL-10 e baixa expressão de IL-4.

8 – Anexos

Anexo 1 – Dados demográficos dos 22 casos de DPI e dos controles

Paciente	Sexo	Idade	HAS	DM	DPOC	ICC	ICO	IRC	NEO	ETILISMO	CORTICOIDE	CIRROSE	ESPLENECT	FALCIFORME	TRANSPLANTE	HIV	DATA INTERNAÇÃO	DATA ÓBITO	TEMPO
HC-01-1046	F	60	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N			
HC-01-1264	M	28	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	27/12/01	29/12/01	2
HC-01-1432	M	70	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N	05/05/01	06/05/01	1
HC-01-381	M	62	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	16/04/01	23/04/01	7
HC-01-512	F	12	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	21/05/01	22/05/01	1
HC-01-615	M	58	N	N	N	N	N	S	S	N	S	N	N	N	N	N	20/06/01	22/06/01	1
HC-02-335	F	56	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N			
HC-02-561	F	74	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	22/05/02	03/06/02	12
HC-02-583	F	55	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	02/06/02	11/06/02	9
HC-03-732	M	40	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC-03-1048	F	40	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N			
HC-03-153	F	36	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	19/02/03	20/02/03	1
HC-03-482	M	73	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC-03-937	F	52	N	N	N	N	N	N	S	N	S	S	N	N	S	N	15/10/03	11/11/03	27
HC-97-559	M	13	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N			
HC-97-826	F	23	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N	28/06/97	19/07/97	19
HC-97-837	F	28	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N			
HC-97-856	M	49	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N			
HC-98-1343	M	62	S	N	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	03/11/98	20/11/98	17
HC-98-731	F	13	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N			
HC-98-974	F	62	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N			
HC-99-570	M	53	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N			

	20	N	22	20	N	20	N	20	N	20	N	20	N	20	N	20	N	11
9	Média	46	3	Média	3	Média	0	Média	6	Média	11	Média	0	Média	1	Média		8,8
11	D.P.	20	17	D.P.	17	D.P.	20	D.P.	14	D.P.	9	D.P.	20	D.P.	19	D.P.		9,0
	Mediana	52,5		Mediana		Mediana		Mediana		Mediana		Mediana		Mediana		Mediana		7
	Mínimo	12		Mínimo		Mínimo		Mínimo		Mínimo		Mínimo		Mínimo		Mínimo		1
45,0%	Máximo	74	15,0%	Máximo	15,0%	Máximo	0,0%	Máximo	30,0%	Máximo	55,0%	Máximo	0,0%	Máximo	5,0%	Máximo		27
55,0%	I.C.95% min	8,233410542	85,0%	I.C.95% min	85,0%	I.C.95% min	100,0%	I.C.95% min	70,0%	I.C.95% min	45,0%	I.C.95% min	100,0%	I.C.95% min	95,0%	I.C.95% min		3,5
	I.C.95% máx	54,55159236		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx		14,1

M	S	S	S	S	S	S	S
F	N	N	N	N	N	N	N

continua

Anexo 1 – Dados demográficos dos 22 casos de DPI e dos controles (continuação)

	Sexo	Idade	HAS	DM	DPOC	ICC	ICO	IRC	NEO	ETILISMO	CORTICOIDE	CIRROSE	ESPLENECT	FALCIFORME	TRANSPLANTE	HIV	DATA INTERNAÇÃO	DATA ÓBITO	TEMPO
HC- 258-03	M	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 718-03	F	58	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC-2218-03	F	47	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 1738-02	F	46	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 1830-03	M	45	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 4490-03	M	40	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 3888-03	M	22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 024-03	F	27	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 4795-03	M	28	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 2290-03	F	48	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 1155-03	F	38	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 2207-03	M	56	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 1875-03	M	54	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 1689-03	F	22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 2652-03	M	52	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 2576-02	F	60	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 1877-03	M	28	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 953-03	M	23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 2926-03	M	43	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 2811-03	F	44	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 3087-02	M	46	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 167-03	F	44	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 3611-03	F	27	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 2463-02	F	38	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 2432-03	M	31	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
HC- 5335-02	M	50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			

	24	N	26	24	N	24	N	24	N	24	N	24	N	24	N
0	Média	40,07692308	0	Média	0	Média	0	Média	0	Média	0	Média	0	Média	0
0	D.P.	11,9127598	0	D.P.	0	D.P.	0	D.P.	0	D.P.	0	D.P.	0	D.P.	0
	Mediana	43,5		Mediana		Mediana		Mediana		Mediana		Mediana		Mediana	
	Mínimo	22		Mínimo		Mínimo		Mínimo		Mínimo		Mínimo		Mínimo	
0,0%	Máximo	60	0,0%	Máximo	0,0%	Máximo	0,0%	Máximo	0,0%	Máximo	0,0%	Máximo	0,0%	Máximo	0,0%
0,0%	I.C.95%	4,579033304	0,0%	I.C.95%	0,0%	I.C.95%	0,0%	I.C.95%	0,0%	I.C.95%	0,0%	I.C.95%	0,0%	I.C.95%	0,0%
	I.C.95% min	35,49788977		I.C.95% min		I.C.95% min		I.C.95% min		I.C.95% min		I.C.95% min		I.C.95% min	
	I.C.95% máx	44,65595638		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx		I.C.95% máx	

Anexo 2 – Dados histológicos dos 22 casos de DPI e dos controles

ALVÉOLOS	Pneum I	Pneum II	Hemorragia	edema	fibrina	M Hialina	neutrófilos	eosinófilos	macrófagos	cel. gigantes	linfocito	debris cel	necrose
01-1046	1	1	0	3	1	1	3	0	3	0	1	3	3
97-559	1	1	3	2	0	0	2	0	1	0	1	0	2
98-974	1	1	1	3	1	0	1	0	3	0	1	2	3
01-615	1	1	2	3	1	0	1	0	1	0	1	1	2
01-1264	1	1	2	2	1	1	2	0	1	0	1	1	3
01-512	1	1	1	3	1	1	3	0	1	0	1	2	1
97-856	1	1	2	2	1	1	2	0	1	0	1	1	2
97-836	1	1	1	3	2	0	2	0	2	0	1	2	2
97-826	1	1	2	2	1	1	1	0	1	0	1	2	2
03-482	1	1	2	2	0	0	3	0	1	0	1	1	2
03-937	1	1	2	1	1	0	1	0	1	0	1	1	3
98-731	1	1	1	3	1	1	2	0	1	0	1	2	3
99-570	1	1	2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	3
03-732	1	1	2	1	0	0	1	0	1	0	1	1	2
03-153	1	1	2	2	1	1	2	0	1	0	1	2	2
01-381	1	1	3	1	0	0	3	0	1	0	1	2	3
98-1343	1	1	2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	3
02-583	1	1	3	1	1	1	2	0	1	0	1	2	2
02-335	1	1	2	1	2	0	2	0	2	0	2	2	3
03-1048	1	1	1	1	2	0	1	0	2	0	2	1	2
02-561	1	1	1	2	1	1	3	0	1	0	2	3	3
01-432	1	1	2	1	2	1	1	0	2	0	2	1	3

Nº	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

ausente	0	1	0	6	12	0	22	0	22	0	3	0
leve	1	6	9	12	10	9	0	16	0	18	8	1
moderado	2	12	7	4	0	8	0	4	0	4	9	10
intenso	3	3	6	0	0	5	0	2	0	0	2	11

4,5%	0,0%	27,3%	54,5%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	13,6%	0,0%
27,3%	40,9%	54,5%	45,5%	40,9%	0,0%	72,7%	0,0%	81,8%	36,4%	4,5%		
54,5%	31,8%	18,2%	0,0%	36,4%	0,0%	18,2%	0,0%	18,2%	40,9%	45,5%		
13,6%	27,3%	0,0%	0,0%	22,7%	0,0%	9,1%	0,0%	0,0%	9,1%	50,0%		

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

continua

Anexo 2 – Dados histológicos dos 22 casos de DPI e dos controles (continuação)

SEPTO	Espessamento	congestão	edema	fibrose	linfócitos	macrófagos	plasmócitos	neutrófilo	eosinófilos	Trombose	necrose
01-1046	1	3	1	0	1	1	0	1	0	0	3
97-559	1	3	1	0	1	1	0	1	0	0	3
98-974	1	3	1	1	1	1	0	1	0	0	3
01-615	1	3	1	0	1	0	0	1	0	0	2
01-1264	1	3	1	1	1	1	0	1	0	0	3
01-512	1	2	2	0	1	1	0	1	0	0	3
97-856	1	2	2	1	1	1	0	1	0	0	3
97-836	1	2	2	1	1	1	0	1	0	2	2
97-826	1	3	1	1	1	1	0	1	0	0	2
03-482	1	3	1	0	1	1	0	1	0	0	3
03-937	1	3	1	0	1	1	0	1	0	0	3
98-731	1	1	3	0	1	0	0	1	0	0	2
99-570	1	3	0	0	1	1	0	1	0	0	2
03-732	1	3	1	0	1	1	0	1	0	0	2
03-153	1	3	1	1	1	1	0	1	0	0	3
01-381	1	3	1	1	1	1	0	1	0	0	3
98-1343	1	3	1	1	1	2	0	1	0	0	3
02-583	1	3	1	1	1	1	0	1	0	0	2
02-335	1	2	1	2	2	2	0	1	0	0	3
03-1048	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0	2
02-561	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0	2
01-432	1	2	1	1	1	1	0	1	0	1	2

22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	Nº
0	0	1	9	0	2	22	0	22	20	0	0	ausente
22	1	17	12	21	18	0	22	0	1	0	1	leve
0	7	3	1	1	2	0	0	0	1	10	2	moderado
0	14	1	0	0	0	0	0	0	0	12	3	intenso
0,0%	0,0%	4,5%	40,9%	0,0%	9,1%	100,0%	0,0%	100,0%	90,9%	0,0%		
100,0%	4,5%	77,3%	54,5%	95,5%	81,8%	0,0%	100,0%	0,0%	4,5%	0,0%		
0,0%	31,8%	13,6%	4,5%	4,5%	9,1%	0,0%	0,0%	0,0%	4,5%	45,5%		
0,0%	63,6%	4,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	54,5%		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

continua

Anexo 2 – Dados histológicos dos 22 casos de DPI e dos controles (continuação)

SEPTO	Espessamento	congestão	edema	fibrose	linfócitos	macrófagos	plasmócitos	neutrófilo	eosinófilos	Trombose
HC- 258-03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 718-03	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
HC-2218-03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 1738-02	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
HC- 1830-03	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
HC- 4490-03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 3888-03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 024-03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 4795-03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2290-03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 1155-03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2207-03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 1875-03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 1689-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 2652-03	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2576-02	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 1877-03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 953-03	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
HC- 2926-03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2811-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 3087-02	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
HC- 167-03	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
HC- 3611-03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2463-02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2432-03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 5335-02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

continua

Anexo 2 – Dados histológicos dos 22 casos de DPI e dos controles (continuação)

ALVÉOLOS	Pneum I	Pneum II	Hemorragia	edema	fibrina	M Hialina	neutrófilos	eosinófilos	macrófagos	cel. gigantes	linfocito	debris cel	necrose
HC- 258-03	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 718-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
HC-2218-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 1738-02	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 1830-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 4490-03	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 3888-03	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 024-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 4795-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2290-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 1155-03	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
HC- 2207-03	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 1875-03	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 1689-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2652-03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
HC- 2576-02	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
HC- 1877-03	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 953-03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2926-03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2811-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 3087-02	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
HC- 167-03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 3611-03	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 2463-02	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 2432-03	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC- 5335-02	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

continua

Anexo 2 – Dados histológicos dos 22 casos de DPI e dos controles (continuação)

BRONQUIO	metaplasia	hiperplasia	necrose	erosão	úlceras	linfócitos	Plasmócitos	macrófagos	eosinófilos	neutrófilos
HC- 258-03	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
HC- 718-03	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
HC-2218-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 1738-02	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
HC- 1830-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 4490-03	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
HC- 3888-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 024-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 4795-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 2290-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 1155-03	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
HC- 2207-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 1875-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 1689-03	0	0	0	0	0	1	0		0	0
HC- 2652-03	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
HC- 2576-02	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 1877-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 953-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 2926-03	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
HC- 2811-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 3087-02	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 167-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 3611-03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 2463-02	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
HC- 2432-03	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
HC- 5335-02	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Anexo 3 – Fenótipos celulares, citocinas, C3, ICAM-1, SP-A, CASPASE-3, Toll-2

Paciente	CASPASE 3		CD1A		CD4		CD8		CD20		CD57		CD68		INFGAMA	
	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo
HC-01-1046	8	4,8	6,4	33,6	27,2	84,8	11,2	1,6	4,8	0	1,6	0	65,6	73,6	4,8	6,4
HC-01-1264	14,4	4,8	24	27,2	40	91,2	35,2	92,8	0	6,4	0	1,6	329,6	30,9	6,4	1,6
HC-01-1432	3,2	1,6	19,2	62,4	22,4	40	30,4	27,2	4,8	0	1,6	0	299,2	62,4	30,4	0
HC-01-381	0	4,8	14,4	78,4	35,2	96	12,8	9,6	1,6	1,6	3,2	0	292,8	76,8	3,2	1,6
HC-01-512	0	27,2	3,2	16	22,4	28,8	27,2	4,8	0	0	1,6	0	171,2	366,4	3,2	0
HC-01-615	12,8	8	35,2	30,4	27,2	73,6	22,4	14,4	1,6	0	0	0	19,2	174,4	16	4,8
HC-02-335	8	4,8	3,2	22,4	12,8	22,4	11,2	4,8	3,2	0	0	0	27,2	217,6	11,2	6,4
HC-02-561	16	6,4	11,2	28,8	25,6	68,8	14,4	17,6	3,2	0	1,6	0	241,6	25,6	4,8	8
HC-02-583	4,8	4,8	4,8	32	11,2	17,6	11,2	16	0	1,6	0	0	283,2	22,4	4,8	0
HC-03-732	4,8	6,4	4,8	30,4	14,4	30,4	30,4	25,6	3,2	4,8	0	0	475,2	24	33,6	0
HC-03-1048	4,8	6,4	12,8	28,8	20,8	24	33,6	80	3,2	1,6	1,6	6,4	433,6	19,2	9,6	3,2
HC-03-153	8	1,6	28,8	33,6	8	24	4,8	11,2	4,8	1,6	1,6	0	145,6	68,8	35,2	6,4
HC-03-482	9,6	1,6	17,6	38,4	6,4	27,2	4,8	3,2	1,6	0	1,6	4,8	84,8	310,4	3,2	4,8
HC-03-937	8	0	9,6	22,4	14,4	22,4	11,2	28,8	1,6	3,2	0	1,6	107,2	249,6	25,6	3,2
HC-97-559	3,2	3,2	4,8	30,4	11,2	38,4	1,6	8	1,6	1,6	1,6	0	129,6	179,2	3,2	1,6
HC-97-826	6,4	0	11,2	20,8	1,6	3,2	6,4	6,4	1,6	1,6	1,6	0	225,6	211,2	1,6	1,6
HC-97-837	4,8	11,2	8	25,8	8	32	3,2	1	1,6	0	0	0	30,4	158,4	12,8	1,6
HC-97-856	0	4,8	4,8	27,2	0	22,4	6,4	6,4	1,6	1,6	4,8	4,8	283,2	44,8	1,6	3,2
HC-98-1343	8	1,6	9,6	44,8	8	43,2	19,2	11,2	3,2	0	3,2	4,8	142,4	22,4	36,8	8
HC-98-731	6,4	4,8	14,4	36,8	0	27,2	3,2	0	0	0	1,6	0	142,4	19,2	27,2	17,6
HC-98-974	1,6	0	11,2	43,2	4,8	9,6	3,2	4,8	1,6	1,6	1,6	0	113,6	35,2	24	0
HC-99-570	1,6	1,6	17,6	33,6	8	17,6	3,2	6,4	6,4	0	4,8	0	129,6	68,8	30,4	1,6

22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
6,11	5,02	12,58	33,97	14,98	38,40	13,96	17,35	2,33	1,24	1,45	0,95	189,67	111,88	14,98	3,71	
4,46	5,70	8,47	13,85	11,18	26,74	11,09	23,90	1,76	1,71	1,47	1,89	126,96	104,42	12,72	4,08	
5,60	4,80	11,20	30,40	12,00	28,00	11,20	8,80	1,60	0,80	1,60	0,00	144,00	68,80	10,40	2,40	
0,00	0,00	3,20	16,00	0,00	3,20	1,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,20	19,20	1,60	0,00	
16,00	27,20	35,20	78,40	40,00	96,00	35,20	92,80	6,40	6,40	4,80	6,40	475,20	366,40	36,80	17,60	
1,86	2,38	3,54	5,79	4,67	11,17	4,63	9,99	0,74	0,71	0,62	0,79	53,05	43,63	5,31	1,71	
4,24	2,64	9,04	28,18	10,31	27,23	9,33	7,37	1,59	0,52	0,84	0,16	136,62	68,25	9,67	2,00	
7,97	7,40	16,12	39,76	19,65	49,57	18,60	27,34	3,06	1,95	2,07	1,74	242,73	155,51	20,30	5,42	

continua

Anexo 3 – Fenótipos celulares, citocinas, C3, ICAM-1, SP-A, CASPASE-3, Toll-2 (continuação)

	CASPASE 3		CD1A		CD4		CD8		CD20		CD57		CD68		INFGAMA	
	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo
HC-258-03	4,8	6,4	41,6	75,2	35,2	38,4	14,4	49,6	4,8	20,8	24	97,6	110,4	129,6	33,6	17,6
HC-718-03	12,8	6,4	62,4	73,6	22,4	41,6	17,6	48	4,8	16	19,2	110,4	25,6	48	3,2	20,8
HC-2218-03	8	6,4	92,8	132,8	22,4	44,8	19,2	51,2	6,4	16	12,8	91,2	33,6	67,2	11,2	22,4
HC-1738-02	3,2	3,2	51,2	33,6	25,6	46,4	16	46,4	6,4	20,8	16	97,6	99,2	108,8	129,6	46,4
HC-1830-03	19,2	4,8	107,2	72	16	54,4	8	36,8	3,2	16	12,8	94,4	116,8	108,8	81,6	49,6
HC-4490-03	6,4	3,2	123,2	102,4	19,2	60,8	14,4	33,6	6,4	24	17,6	84,8	91,2	84,8	169,6	40
HC-3888-03	3,2	4,8	73,6	140,8	25,6	46,4	12,8	40	8	25,8	19,2	76,8	65,6	110,4	73,6	17,6
HC-024-03	27,2	0	107,2	137,6	27,2	44,8	12,8	48	8	24	16	81,6	108,8	209,6	33,6	35,2
HC-4795-03	1,6	8	44,8	86,4	25,6	48	11,2	49,6	8	19,2	19,2	86,4	54,4	158,4	36,8	76,8
HC-2290-03	4,8	14,4	81,6	208	20,8	30,4	17,6	44,8	9,6	22,4	14,4	91,2	44,8	70,4	129,6	96
HC-1155-03	8	6,4	36,8	206,4	19,2	49,6	14,4	51,2	6,4	19,2	12,8	88	62,4	148,8	33,6	12,8
HC-2207-03	11,2	14,4	41,6	49,6	17,6	35,2	16	46,4	8	17,6	17,6	72	59,2	153,6	46,4	60,8
HC-1875-03	4,8	3,2	46,4	78,4	8	25,6	17,6	49,6	8	28,8	20,8	81,6	36,8	67,2	38,4	30,4
HC-1689-03	17,6	4,8	84,8	51,2	9,6	19,2	16	43,2	3,2	20,8	16	89,6	30,4	73,6	22,4	67,2
HC-2652-03	3,2	1,6	49,6	24	24	32	9,6	46,4	6,4	33,6	17,6	88	19,2	92,8	12,8	62,4
HC-2576-02	8	12,8	116,8	51,2	16	24	9,6	51,2	0	28,8	19,2	139,2	46,4	129,6	91,2	72
HC-1877-03	24	11,2	84,8	68,8	18,8	40	19,2	38,4	19,2	25,8	16	126,4	75,2	179,2	54,4	43,2
HC-953-03	16	6,4	65,6	59,6	28,8	44,8	12,8	49,6	6,4	30,4	17,6	96	78,4	145,6	9,6	11,2
HC-2926-03	11,2	38,4	84,8	46,4	25,6	73,6	17,6	46,4	3,2	28,8	12,8	107,2	62,4	166,4	49,6	139,2
HC-2811-03	19,2	22,4	46,4	27,2	35,2	22,4	19,2	43,2	6,4	24	20,8	108,8	44,8	131,2	67,2	54,4
HC-3087-02	16	27,2	14,4	62,4	40	24	14,4	41,2	8	25,8	17,6	124,8	27,2	124,8	27,2	108,8
HC-167-03	11,2	33,6	36,8	32	40	32	12,8	44,8	9,6	19,2	14,4	107,2	20,8	118,4	44,8	33,6
HC-3611-03	17,6	6,4	3,2	35,6	20,8	51,2	11,2	46,4	6,4	24	17,6	94,4	19,2	89,6	57,6	88
HC-2463-02	6,4	8	25,6	72	9,6	19,2	14,4	33,6	4,8	19,2	19,2	68,8	30,4	100,8	30,4	134,4
HC-2432-03	30,4	6,4	43,2	46,4	6,4	25,6	16	33,6	6,4	24	16	81,6	43,2	113,6	51,2	46,4
HC-5335-02	16	14,4	49,6	86,4	20,8	41,6	12,8	49,6	6,4	22,4	14,4	107,2	75,2	132,8	41,6	49,6
	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
	12,00	10,58	62,15	79,23	22,32	39,08	14,52	44,72	6,71	22,98	16,98	95,88	57,97	120,12	51,82	53,60
	7,84	9,72	31,36	49,38	8,93	13,46	3,10	5,63	3,33	4,67	2,83	16,87	29,90	37,38	37,90	34,11
	11,20	6,40	50,40	70,40	21,60	40,80	14,40	46,40	6,40	23,20	17,60	92,80	56,80	121,60	43,20	48,00
	1,60	0,00	3,20	24,00	6,40	19,20	8,00	33,60	0,00	16,00	12,80	68,80	19,20	48,00	3,20	11,20
	30,40	38,40	123,20	208,00	40,00	73,60	19,20	51,20	19,20	33,60	24,00	116,80	209,60	169,60	169,60	139,20
	3,01	3,74	12,05	18,98	3,43	5,18	1,19	2,17	1,28	1,80	1,09	6,49	11,49	14,37	14,57	13,11
	8,99	6,85	50,10	60,25	18,89	33,90	13,33	42,56	5,43	21,18	15,90	89,39	46,48	105,75	37,25	40,49
	15,01	14,32	74,21	98,21	25,75	44,25	15,71	46,89	7,99	24,77	18,07	102,36	69,46	134,49	66,38	66,71

continua

Anexo 3 – Fenótipos celulares, citocinas, C3, ICAM-1, SP-A, CASPASE-3, Toll-2 (continuação)

Paciente	IL1BETA		IL2R		IL4		IL6		IL8		IL10		TNFALFA		TGFBETA	
	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo
HC-01-1046	8	49,6	17,6	4,8	16	24	0	19,2	3,2	0	19,2	46,4	132,8	100,8	4,8	86,4
HC-01-1264	24	36,8	1,6	3,2	6,4	6,4	3,2	20,8	0	1,6	0	0	195,2	83,2	4,8	73,6
HC-01-1432	25,6	136	1,6	1,6	8	6,4	0	14,4	0	0	44,8	43,2	43,2	83,2	11,2	68,8
HC-01-381	11,2	86,4	9,6	0	11,2	16	0	11,2	0	0	40	49,6	91,2	97,6	3,2	40
HC-01-512	6,4	27,2	3,2	3,2	4,8	4,8	0	6,4	0	0	24	19,2	78,4	70,4	9,6	40
HC-01-615	27,2	62,4	0	1,6	0	4,8	0	9,6	1,6	3,2	22,4	92,8	94,4	59,2	11,2	49,6
HC-02-335	0	0	1,6	3,2	8	0	9,6	16	4,8	1,6	38,4	59,2	40	25,6	19,4	51,2
HC-02-561	0	0	1,6	1,6	8	11,2	12,8	14,4	1,6	0	19,2	62,4	35,2	46,4	20,8	44,8
HC-02-583	17,6	68,8	0	0	0	4,8	6,4	33,6	0	1,6	20,8	38,4	80	27,2	11,2	60,8
HC-03-732	33,6	83,2	25,6	6,4	8	4,8	3,2	22,4	8	0	19,2	36,8	110,4	62,4	12,8	54,4
HC-03-1048	11,2	70,4	3,2	1,6	4,8	8	0	6,4	3,2	0	33,6	43,2	59,2	32	14,4	44,8
HC-03-153	20,8	121,6	3,2	0	9,6	1,6	0	9,6	12,8	1,6	22,4	52,8	80	43,2	6,4	33,6
HC-03-482	12,8	56	1,6	1,6	0	11,2	0	4,8	1,6	0	28,8	46,4	172,8	80	14,4	41,6
HC-03-937	20,8	70,4	1,6	0	4,8	16	0	4,8	8	0	20,8	40	97,6	48	12,8	36,8
HC-97-559	3,2	30,4	0	6,4	1,6	4,8	0	3,2	0	0	38,4	62,4	49,6	144	3,2	30,4
HC-97-826	11,2	65,6	1,6	0	3,2	3,2	0	4,8	4,8	3,2	9,6	28,8	54,4	73,6	4,8	33,6
HC-97-837	14,4	68,8	1,6	1,6	4,8	8	0	3,2	28,8	0	11,2	67,2	99,2	129,6	3,2	44,8
HC-97-856	12,8	52,8	1,6	0	1,6	3,2	0	9,6	1,6	0	17,6	43,2	28,8	24	4,8	30,4
HC-98-1343	12,8	62,4	3,2	4,8	9,6	1,6	3,2	17,6	1,6	3,2	22,4	46,4	163,2	64	8	41,6
HC-98-731	8	41,6	0	0	1,6	1,6	1,6	4,8	1,6	0	20,8	43,2	68,8	68,8	11,2	33,6
HC-98-974	9,6	49,6	1,6	0	8	3,2	0	3,2	1,6	1,6	12,8	35,2	76,8	48	11,2	46,4
HC-99-570	14,4	57,6	0	1,6	14,4	0	0	4,8	0	1,6	14,4	43,2	112	54,4	9,6	30,4

22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
13,89	58,98	3,71	1,96	6,11	6,62	1,82	11,13	3,78	0,87	22,76	45,45	89,24	66,62	9,68	46,25		
8,69	32,01	6,25	2,09	4,49	5,93	3,50	7,92	6,50	1,18	10,91	18,09	44,94	31,63	5,02	14,85		
12,80	60,00	1,60	1,60	5,60	4,80	0,00	9,60	1,60	0,00	20,80	43,20	80,00	63,20	10,40	43,20		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,20	0,00	0,00	0,00	0,00	28,80	24,00	3,20	30,40		
33,60	136,00	25,60	6,40	16,00	24,00	12,80	33,60	28,80	3,20	44,80	92,80	195,20	144,00	20,80	86,40		
3,63	13,38	2,61	0,87	1,88	2,48	1,46	3,31	2,72	0,49	4,56	7,56	18,78	13,22	2,10	6,21		
10,26	45,61	1,10	1,09	4,23	4,14	0,35	7,82	1,06	0,38	18,21	37,90	70,46	53,40	7,59	40,05		
17,52	72,36	6,32	2,84	7,98	9,10	3,28	14,44	6,50	1,37	27,32	53,01	108,01	79,84	11,78	52,46		

continua

Anexo 3 – Fenótipos celulares, citocinas, C3, ICAM-1, SP-A, CASPASE-3, Toll-2 (continuação)

	IL1BETA		IL2R		IL4		IL6		IL8		IL10		TNFALFA		TGFbeta	
	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo
HC- 258-03	20,8	11,2	3,2	1,6	81,6	97,6	0	19,2	8	1,6	3,2	0	0	9,6	35,2	72
HC- 718-03	3,2	0	1,6	0	78,4	76,8	0	24	3,2	1,6	4,8	0	0	11,2	30,4	115,2
HC-2218-03	9,6	12,8	1,6	0	60,8	99,2	0	17,6	1,6	1,6	0	1,6	0	11,2	20,8	33,6
HC- 1738-02	17,6	14,4	1,6	0	100,8	107,2	1,6	28,8	4,8	0	3,2	0	0	12,8	38,4	94,4
HC- 1830-03	20,8	11,2	0	0	65,6	54,4	0	25,6	19,2	9,6	4,8	0	0	11,2	54,4	100,8
HC- 4490-03	11,2	17,6	1,6	0	72	94,4	1,6	24	12,8	6,4	6,4	0	4,8	20,8	65,6	59,2
HC- 3888-03	0	0	1,6	0	78,4	96	0	20,8	12,8	8	3,2	0	6,4	4,8	228,8	126,4
HC- 024-03	11,2	24	0	1,6	62,4	68,8	0	22,4	11,2	6,4	8	1,6	1,6	9,6	134,4	94,4
HC- 4795-03	14,4	20,8	1,6	1,6	107,2	129,6	3,2	20,8	49,6	8	3,2	4,8	6,4	12,8	97,6	28,8
HC- 2290-03	8	9,6	0	0	94,4	126,4	0	19,2	8	0	3,2	1,6	1,6	8	75,2	104
HC- 1155-03	0	0	0	0	57,6	67,2	0	27,2	4,8	3,2	3,2	0	0	4,8	62,4	67,2
HC- 2207-03	14,4	17,6	0	0	108,8	123,2	0	24	20,8	6,4	4,8	0	6,4	278,4	78,4	78,4
HC- 1875-03	9,6	17,6	0	0	78,4	49,6	0	20,8	33,6	8	1,6	3,2	0	4,8	20,8	94,4
HC- 1689-03	16	17,6	3,2	0	6,4	20,8	0	19,2	8	3,2	3,2	0	19,2	0	62,4	59,2
HC- 2652-03	38,4	6,4	0	1,6	0	0	0	24	22,4	1,6	1,6	3,2	0	4,8	17,6	27,2
HC- 2576-02	27,2	9,6	0	0	48	59,2	3,2	22,4	27,2	4,8	3,2	1,6	0	3,2	59,2	88
HC- 1877-03	17,6	11,2	0	0	46,4	75,2	1,6	17,6	36,8	3,2	8	1,6	0	4,8	68,8	28,8
HC- 953-03	25,6	4,8	0	4,8	33,6	78,4	0	19,2	44,8	9,6	6,4	1,6	0	12,8	163,2	81,6
HC- 2926-03	17,6	9,6	0	1,6	36,8	81,6	0	19,2	36,8	6,4	3,2	3,2	0	3,2	52,8	76,8
HC- 2811-03	19,2	8	3,2	0	24	75,2	0	24	35,2	4,8	0	3,2	0	11,2	70,4	68,8
HC- 3087-02	24	8	0	0	19,2	68,8	0	17,6	32	3,2	0	0	19,2	0	19,2	16
HC- 167-03	33,6	6,4	0	0	49,6	62,4	0	16	40	12,8	3,2	1,6	0	0	36,8	86,4
HC- 3611-03	12,8	3,2	0	0	14,4	17,6	0	19,2	20,8	3,2	0	3,2	1,6	19,2	44,8	20,8
HC- 2463-02	11,2	0	1,6	1,6	11,2	36,8	0	20,8	17,6	1,6	0	1,6	0	17,6	49,2	72
HC- 2432-03	0	0	4,8	0	33,6	36,8	0	27,2	11,2	0	0	3,2	0	0	30,4	56
HC- 5335-02	17,6	0	1,6	0	14,4	75,2	0	11,2	12,8	3,2	4,8	0	6,4	24	76,8	44,8

26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
15,45	9,29	1,05	0,55	53,23	72,25	0,43	21,23	20,62	4,55	3,20	1,42	1,11	9,54	72,85	69,05	
9,62	7,13	1,35	1,10	32,42	32,95	0,97	3,91	13,99	3,38	2,39	1,45	2,21	6,66	63,43	30,27	
15,20	9,60	0,00	0,00	53,60	75,20	0,00	20,80	18,40	3,20	3,20	1,60	0,00	9,60	56,80	72,00	
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,20	1,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,60	16,00	
38,40	24,00	4,80	4,80	108,80	129,60	3,20	28,80	49,60	12,80	8,00	4,80	6,40	24,00	278,40	126,40	
3,70	2,74	0,52	0,42	12,46	12,67	0,37	1,50	5,38	1,30	0,92	0,56	0,85	2,56	24,38	11,63	
11,75	6,55	0,53	0,13	40,77	59,58	0,06	19,73	15,24	3,26	2,28	0,86	0,26	6,98	48,47	57,41	
19,14	12,03	1,57	0,98	65,69	84,91	0,80	22,73	25,99	5,85	4,12	1,97	1,96	12,10	97,23	80,68	

continua

Anexo 3 – Fenótipos celulares, citocinas, C3, ICAM-1, SP-A, CASPASE-3, Toll-2 (continuação)

Paciente	C3		CD14		CD34		ICAM-1		S100		SpA		TOLL-2	
	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo
HC- 01- 1046	46,4	9,6	44,8	36,8	43,2	64	35,2	52,8	1,6	6,4	252,8	80	75,2	17,6
HC- 01- 1264	17,6	6,4	75,2	35,2	76,8	132,8	120	40	3,2	6,4	145,6	56	59,2	16
HC- 01- 1432	27,2	1,6	75,2	43,2	46,4	246,4	44,8	35,2	1,6	9,6	59,2	65,6	25,6	8
HC- 01- 381	35,2	14,4	8	14,4	36,8	364,8	36,8	28,8	3,2	9,6	107,2	41,6	12,8	3,2
HC- 01- 512	20,8	4,8	33,6	108,8	33,6	83,2	34,8	80	0	3,2	164,8	80	27,2	28,8
HC- 01- 615	16	1,6	30,4	14,4	12,8	62,4	25,6	65,6	0	9,6	120	64	35,2	25,6
HC- 02- 335	83,2	27,2	46,4	33,6	27,2	78,4	28,8	25,6	1,6	9,6	211,2	49,6	20,8	6,4
HC- 02- 561	24	6,4	81,6	92,8	9,6	72	62,4	22,4	3,2	14,4	116,8	44,8	46,4	16
HC- 02- 583	41,6	6,4	67,2	67,2	12,8	56	107,2	88	3,2	11,2	100,8	27,2	24	9,6
HC- 03- 732	30,4	6,4	88	62,4	24	190,4	57,6	32	3,2	9,6	211,2	48	54,4	9,6
HC- 03- 1048	72	6,4	1,6	1,6	46,4	312	16	9,6	3,2	11,2	305,6	48	25,6	8
HC- 03- 153	36,8	1,6	48	52,8	30,4	246,4	44,8	27,2	1,6	8	180,8	56	17,6	3,2
HC- 03- 482	113,6	19,2	33,6	28,8	14,4	60,8	49,6	24	1,6	9,6	140,8	41,6	12,8	35,2
HC- 03- 937	132,8	56	32	65,6	19,2	113,6	38,4	25,6	3,2	11,2	156,8	51,2	22,4	4,8
HC- 97- 559	41,6	17,6	56	123,2	14,4	124,8	14,4	12,8	1,6	14,4	164,8	64	48	17,6
HC- 97- 826	25,6	4,8	32	6,4	16	62,4	76,8	126,4	1,6	11,2	161,6	52,8	12,8	1,6
HC- 97- 837	33,6	22,4	49,6	153,6	6,4	30,4	3,2	8	1,6	11,2	121,6	40	20,8	12,8
HC- 97- 856	22,4	9,6	22,4	6,4	20,8	105,6	19,2	6,4	1,6	8	171,2	41,6	20,8	4,8
HC- 98-1343	147,2	51,2	59,2	32	12,8	41,6	35,2	8	1,6	12,8	284,8	56	57,6	19,2
HC- 98-731	8	8	8	4,8	17,6	54,4	17,6	12,8	1,6	11,2	56	44,8	6,4	3,2
HC- 98- 974	94,4	41,6	112	36,8	11,2	59,2	4,8	4,8	1,6	11,2	296	41,6	9,6	9,6
HC- 99-570	43,2	16	19,2	9,6	6,4	49,6	16	11,2	3,2	12,8	99,2	32	11,2	0

22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
50,62	15,42	46,55	46,84	24,51	118,69	40,42	33,96	2,04	10,11	164,95	51,20	29,38	11,85	
39,35	15,66	28,37	41,33	17,11	93,60	30,06	31,16	1,01	2,63	70,94	13,47	19,06	9,31	
36,00	8,80	45,60	36,00	18,40	75,20	35,20	25,60	1,60	10,40	159,20	48,80	23,20	9,60	
8,00	1,60	1,60	1,60	6,40	30,40	3,20	4,80	0,00	3,20	56,00	27,20	6,40	0,00	
147,20	56,00	112,00	153,60	76,80	364,80	120,00	126,40	3,20	14,40	305,60	80,00	75,20	35,20	
16,44	6,54	11,86	17,27	7,15	39,11	12,56	13,02	0,42	1,10	29,64	5,63	7,96	3,89	
34,17	8,88	34,69	29,57	17,36	79,58	27,86	20,94	1,61	9,01	135,30	45,57	21,42	7,96	
67,06	21,96	58,40	64,11	31,66	157,80	52,98	46,99	2,46	11,21	194,59	56,83	37,35	15,75	

continua

Anexo 3 – Fenótipos celulares, citocinas, C3, ICAM-1, SP-A, CASPASE-3, Toll-2 (continuação)

	C3		CD14		CD34		ICAM-1		S100		SpA		TOLL-2	
	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo	Alvéolo	Septo
HC- 258-03	8	12,8	4,8	1,6	0	120	64	4,8	9,6	9,6	11,2	8	27,2	4,8
HC- 718-03	11,2	11,2	1,6	0	0	107,2	4,8	3,2	0	6,4	3,2	1,6	19,6	9,6
HC-2218-03	11,2	3,2	3,2	1,6	0	97,6	6,4	1,6	0	9,6	14,4	14,4	3,2	0
HC- 1738-02	14,4	8	1,6	3,2	0	52,8	3,2	0	0	4,8	41,6	25,6	0	0
HC- 1830-03	8	8	1,6	0	0	115,2	8	3,2	0	0	17,6	33,6	6,4	1,6
HC- 4490-03	22,4	0	1,6	1,6	0	108,8	1,6	1,6	0	9,6	36,8	17,6	3,2	1,6
HC- 3888-03	4,8	3,2	0	0	0	94,4	1,6	3,2	0	9,6	19,2	9,6	6,4	1,6
HC- 024-03	33,6	6,4	3,2	1,6	0	33,6	3,2	0	0	3,2	19,2	1,6	0	0
HC- 4795-03	27,2	0	3,2	3,2	0	134,4	3,2	1,6	0	8	16	9,6	12,8	1,6
HC- 2290-03	30,4	17,6	1,6	1,6	0	126,4	3,2	1,6	8	9,6	43,2	19,2	1,6	4,8
HC- 1155-03	4,8	6,4	0	0	0	17,6	3,2	0	0	4,8	9,6	19,2	9,6	4,8
HC- 2207-03	70,4	27,2	1,6	1,6	0	54,4	4,8	1,6	0	16	7,2	0	6,4	0
HC- 1875-03	6,4	1,6	3,2	0	0	12,8	4,8	3,2	0	0	11,2	0	0	0
HC- 1689-03	51,2	8	0	1,6	0	6,4	6,4	0	0	11,2	35,2	1,6	4,8	0
HC- 2652-03	16	12,8	0	0	0	9,6	4,8	3,2	0	14,4	6,4	0	3,2	0
HC- 2576-02	24	9,6	0	1,6	0	49,6	6,4	4,8	8	19,2	4,8	6,4	1,6	0
HC- 1877-03	49,6	14,4	1,6	0	0	17,6	6,4	4,8	0	4,8	48	11,2	3,2	0
HC- 953-03	20,8	6,4	0	0	0	51,2	6,4	3,2	0	3,2	33,6	14,4	3,2	0
HC- 2926-03	4,8	6,4	0	1,6	0	4,8	4,8	0	1,6	19,2	22,4	3,2	4,8	0
HC- 2811-03	16	0	1,6	1,6	0	4,8	1,6	1,6	0	11,2	33,6	16	3,2	0
HC- 3087-02	1,6	3,2	0	3,2	0	46,4	3,2	1,6	1,6	9,6	8	3,2	8	0
HC- 167-03	44,8	8	0	0	0	9,6	1,6	1,6	6,4	35,2	3,2	6,4	6,4	1,6
HC- 3611-03	33,6	8	0	0	0	44,8	0	0	0	14,4	11,2	4,8	4,8	4,8
HC- 2463-02	20,8	3,2	1,6	0	0	30,4	0	0	0	12,8	19,2	0	0	12,8
HC- 2432-03	27,2	3,2	1,6	4,8	0	4,8	3,2	1,6	0	12,8	14,4	6,4	16	0
HC- 5335-02	16	6,4	4,8	0	0	11,2	1,6	0	1,6	14,4	8	1,6	6,4	1,6
	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
	22,28	7,51	1,48	1,17	0,00	52,55	6,09	1,85	1,42	10,52	21,66	9,05	6,23	1,97
	16,99	6,05	1,50	1,32	0,00	44,68	12,00	1,61	2,94	7,21	16,74	8,77	6,42	3,24
	18,40	6,40	1,60	1,60	0,00	45,60	3,20	1,60	0,00	9,60	16,80	6,40	4,80	0,00
	1,60	0,00	0,00	0,00	0,00	4,80	0,00	0,00	0,00	0,00	3,20	0,00	0,00	0,00
	70,40	27,20	4,80	4,80	0,00	134,40	64,00	4,80	9,60	35,20	72,00	33,60	27,20	12,80
	6,53	2,33	0,57	0,51	#NUM!	17,18	4,61	0,62	1,13	2,77	6,43	3,37	2,47	1,25
	15,75	5,18	0,90	0,66	#NUM!	35,38	1,48	1,23	0,28	7,75	15,23	5,67	3,76	0,72
	28,81	9,83	2,05	1,68	#NUM!	69,73	10,70	2,47	2,55	13,30	28,10	12,42	8,70	3,22

Anexo 4 – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU**, *ad referendum*, o Protocolo de Pesquisa nº **782/05**, intitulado "Avaliação da Resposta Imune Inata *in situ* em pulmão na pneumococemia", apresentado pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte**

Pesquisador(a) Executante: **Dr. Irineu Francisco Delfino Silva Massaia**

CAPPesq, 04 de Outubro de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

9 – Referências

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 4th ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2003.
- Aderen A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Ann Rev Immunol*. 1999;17:593-623.
- Alanee SRJ, McGee L, Jackson D, Chiou CC, Feldman C, Morris AJ, et al. For the International Pneumococcal Study Group. Association of Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with disease severity and outcome in adults: an International Study. *Clin Infect Dis*. 2007;45:46-51.
- Alcantara RB, Preheim LC, Gentry-Nielsen MJ. Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*. 2001;69:3569-75.
- Ali F, Lee M E, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Read RC, et al. *Streptococcus pneumoniae* – Associated Human Macrophage Apoptosis after Bacterial Internalization via Complement and Fcγ receptors Correlates with Intracellular Bacterial Load. *JID*. 2003;188:1119-31.
- Alper CA, Abramson N, Johnston RBJ, Jandl JH, Rosen FS. Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement-mediated functions and of the third component of complement (C3). *N Engl J Med*. 1970;282:349-54.
- Amber IJ, Gilbert EM, Schiffman G, Jacobson JA. Increased risk of pneumococcal infections in cardiac transplant recipients. *Transplantation*. 1990;49:122-5.
- Angel CS, Ruzek M, and Hostetter MK. Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1994;170:600-8.
- Arlievsky N, Li KI, Munoz JL. Septic arthritis with osteomyelitis due to *Streptococcus pneumoniae* in human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Infect Dis*. 1998;27:898-9.

- Aronin SI, Mukherjee SK, West JC, Cooney EL. Review of pneumococcal endocarditis in adults in the penicillin era. *Clin Infect Dis.* 1998;26:165-71.
- Austrian R, Gold J. Pneumococcal bacteremia with a special reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med.* 1964;60:759-76.
- Austrian R, Howie VM, Ploussard JH. The bacteriology of pneumococcal otitis media. *Johns Hopkins Med. J.* 1977;141:104-11.
- Austrian R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev Infect Dis.* 1981;3:S1-17.
- Austrian R. Pneumococcal pneumonia: diagnostic, epidemiologic, therapeutic and prophylactic considerations. *Chest.* 1986;90:738-43.
- Austrian R. Pneumococcus: the first hundred years. *Rev Infect Dis.* 1981;3:183-9.
- Austrian R. *Some observations on the pneumococcus and the current status of pneumococcal disease and its prevention.* In: The pneumococcus and the pneumococcal vaccine. Quie PG, Kass EH, editores. Chicago: University of Chicago Press; 1992 b. p. 191-207.
- Ballon-Landa GR, Gherardi G, Beall B, Krosner S, Nizet V. Necrotizing facillitis due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: case reported and review of the literature. *J Infect.* 2001;42:272-7.
- Bancroft GJ. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr Opin Immunol.* 1993;5:503-10.
- Berezin EN, Cardenuto MD, Ferreira LL, Otsuka M, Guerra ML, Brandileone MC. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and invasive pneumococcal disease in São Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(7):643-5.

- Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers A, Simard M, Olivier M, Bergeron M. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun*. 1998;66:912-22.
- Berry A, Yother J, Briles D, Hansman D, Paton J. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1989;57:2037-42.
- Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in a adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med*. 1989;320:1731-5.
- Block SL. Causative pathogens, antibiotic resistance and therapeutic considerations in acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:449-56.
- Bohr V, Paulson OB, Rasmussen N. Pneumococcal meningitis: late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol*. 1984;41:1045-9.
- Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, Andrade AL, Di Fabio JL. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *J Med Microbiol*. 2006;55:567-74.
- Brandileone MC, DiFabi JL, Vieira VS, Zanell RC, Casagrande ST, Pignatari AC, Tomasz A. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. *Microb Drug Resist*. 1998;4(3):209-17.
- Breiman RF, Keller DW, Phelan MA, Sniadack DH, Stephens DS, Rimland D, et al. Evaluation of effectiveness of the 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine for HIV-infected patients. *Arch Intern Med*. 2000;160:2633-8.
- Breton JR, Pi G, Lacruz L, Calvo I, Rodriguez I, Sanches A, et al. Pneumococcal pyomyositis. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20:85-7.

- Broug-Holub E, Toews GB, Van Iwaarden JF, Strieter RM, Kunter RM, Kunkel SL, Paine III R, et al. Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect Immun*. 1997;65:1139.
- Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, et al. The classic pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:16969-74.
- Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:16969-74.
- Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype-and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis*. 2003;187:1424-42.
- Burman LA, Norrby R, Trollfors B. Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis*. 1985;7:133-42.
- Butler JC, Lennox JL, McDougal LK, Stueliffe JA, Tait-Kamradt A, Tenover FC. Macrolide-resistant pneumococcal endocarditis and epidural abscess that develop during erythromycin therapy. *Clin Infect Dis*. 2003;36:e19-e25.
- Cardozo DM, Nascimento-Carvalho CM, Andrade AL, Silvany-Neto AM, Daltro CH, Brandão MA, et al. Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among adolescents. *J Med Microbiol*. 2008;57:185-9.

- Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of pneumococcal pneumonia among unvaccinated residents of a nursing home. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2001;50:707-10.
- Centers for Disease control and Prevention. Penumonia and influenza death rates - United States 1979-1994. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1995;44:535-7.
- Cheng Q, Finkel D, Hostetter MK. Novel purification scheme and function foa a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry.* 2000;30:5450-7.
- Cheung DO, Halsey K, Speert DP. Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2000;68:4585.
- Clark H, Nades P, Peter S, Jess E, Samuel H, Kenneth B, et al. Surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis *in vivo*. *J Immunol.* 2002;169:2892-9
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420:885-91.
- Colino J, Snapper CM. Opposing signals from pathogen-associated molecular patterns and IL-10 are critical for optimal dendritic cellinduction of in vivohumoral immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2003;171:3508-19.
- Colino J, Snapper CM. Two distinct mechanisms for induction of dendritc cell apoptosis in response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2003;171:2354-65.
- Colino J, Shen Y, Snapper CM. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J Exp Med.* 2002;195:1-13.

- Colman G, Cooke EM, Cookson BD, Cooper PG, Efstration A, George RC. Pneumococci causing disease in Britain 1982-1990. *J Med Microbiol.* 1998;47:17-27.
- Corinti S, Albanesi C, La Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol.* 2001;166:4312-8.
- Cortese MM, Wolff M, Almeida-Hill J, Reid R, Ketcham J, Santosham M. High incidence rates of invasive pneumococcal disease in the White Mountain Apache population. *Arch Intern Med.* 1992;152:2277-82.
- Crouch E, Kevan H, Itzhak O. Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol Rev.* 2000;173:52-65.
- Cunha AC, Freddi MJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. Guia de Apresentação de Dissertações, Teses e Monografias. Serviço de Biblioteca e Documentação. 2^a ed. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.
- Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Sikuler-Cohen M, Guy L, J Janco P, Yagupsky P, et al. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. *J Infect Dis.* 2002;185:927-36.
- Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Greenberg D, Abramson O, et al. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J Infect Dis.* 1996;174:1271-8.
- Dagan R, Sikuler-Cohen M, Zamir O, Janco J, Givon-Lavi N, Fraser D. Effect of a conjugate pneumococcal vaccine on the occurrence of respiratory infections and antibiotic use in day-care center attendees. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20:951-8.

- 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. 2001;184:292-300.
- De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol.* 1997;27:1229-35.
- Dee TH, Schiffman G, Sottile MI, Rytel M.W. Immunologic studies in pneumococcal disease. *J Lab Clin Med.* 1977;89:1198-207.
- Del Beccaro MA, Mendelman PM, Inglis AF, Richardson MA, Duncan NO, Clausen CR, et al. Bacteriology of acute otitis media: a new perspective. *J Pediatr.* 1992;120:81-4.
- DeMaria A Jr, Browne K, Berk SL, Sherwood EJ, McCabe WR. An outbreak of type 1 pneumococcal pneumonia in a men's shelter. *Jama.* 1980;244:1446-9.
- Dockrell D, Lee HM, Lynch DH, Read RC. Immune-mediated phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae* are associated with direct and bystander macrophage apoptosis. *J Infect Dis.* 2001;184:713-22.
- Dockrell D, Marriot HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG et al. Alveolar Macrophage Apoptosis Contributes to Pneumococcal Clearance in a resolving model of pulmonary infection. *The J of Immun.* 2003;171:5380-8.
- Dowell SF, Whitney CG, Wright C, Rose E Jr, Schuchat A. Seasonal patterns of invasive pneumococcal disease. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:573-579.
- Dugi DD III, Musher DM, Clarridge III JE, Kimbrough R. Intraabdominal infection due to *Streptococcus pneumoniae*. *Medicine.* 2001;80:236-44.
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, et al. Acute bacterial meningitis in adults: a review of 493 episodes. *N Engl J Med.* 1993;328:21-8.

- Dworkin MS, Ward JW, Hanson DL, Jones JL, Kaplan JE. Pneumococcal disease among human immunodeficiency virus-infected persons: incidence, risk factors, and impact of vaccination. *Clin Infect Dis*. 2001;32:794-800.
- Dziarski R, Tapping RI, Tobias OS. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J Biol Chem*. 1998;273:8680-90.
- Echannaoui H, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis*. 2002;186:798-806.
- Ejstrup P, Kristensen B, Hansen JB, Madsen KM, Schonheyder HC, Sorensen HT. Risk and patterns of bacteraemia after splenectomy: a population based studie. *Scand. J Infect Dis*. 2000;32:501-25.
- Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson HB, Melander E, Molstad S, Soderstrom M, et al. Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. *Clin Infect Dis*. 1997;25:1113-7.
- Eskola J, Black S, Shinefield H. Pneumococcal conjugate vaccines, p. 589-624. In: Plotkin SA, Orenstein MD, (ed.). *Vaccines*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2003.
- Fang GD, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Yu VL, Kapoor W, et al. New and emetging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine*. 1990;69:307-16.
- Feikin DR, Schuchat A, M Kolczak, Barrett NL, Harrison LH, Lefkowitz L, et al. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995-1997. *Am J Public Health*. 2000;90:223-9.
- Feldman C, Mitchell T, Andrew PW, Boulnois GJ, Read RC, Todd HC, et al. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Pathog*. 1990;9:275-84.

- Feldman C, Anderson R, Cockeran R, Mitchell T, Cole P, Wilson R. The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium in vitro. *Res Med.* 2002;96:580-85.
- Fillion I, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Sato S, Bergeron M. Role of chemokines and formyl peptides in pneumococcal pneumonia-induced monocyte\macrophage recruitment. *J Immunol.* 2001;166:7353-61.
- Fine MJ, Smith MA, Carson CA, et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. *Jama.* 1996;275:134-41.
- Finland M, Barnes MW. Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J Clin Microbiol.* 1977;5:154-66.
- Finland M. *Pneumococcal infections.* In: Evans AS, Feldman HA, editores. Bacterial infections of humans: epidemiology and control. New York: Plenum Press; 1982.
- Fireman B, Black SB, Shinefield HR, Lee J, Lewis E, Ray P. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on otitis media. *Pediatr Infect J.* 2003;22:10-6.
- Fischer W. Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microb Drug Resist.* 1997;3:309-25.
- Forte WCN. *Imunologia: do básico ao aplicado.* 2ª ed. São Paulo: Editora Artmed S.A.; 2007. Cap.13, p: 149-166.
- Franke-Ullmann G, Pfortner C, Walter P, Steinmuller C, Lohmann-Matthes, Kobzik L. Characterzation of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *J Immunol.* 1996;157:3097.
- Garcia-Bustos JF, Chait BT, Tomasz A. Structure of the peptide network of pneumococcal peptideoglycan. *J Biol Chem.* 1987;262:15400-5.

- Gebo KA, Moore RD, Keruly JC, Chaisson RE. Risk factors for pneumococcal disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 1996;173:857-62.
- Geraldo BF. *Bogliolo patologia. Pulmões. Pleura.* 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.13. p. 357-408. 2006.
- Giglio MS, Landaeta M, Pinto ME. Microbiology of recurrent parotitis. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16:386-90.
- Gilbert K, Fine MJ. *Assessing prognosis* and predicting patient outcomes in community-acquired pneumonia. *Semin Respir Infect.* 1994;9:140-52.
- Givner LB, Mason EO Jr, Barson WT, Tan TQ, Wald ER, Schutze GE, et al. Pneumococcal facial cellulitis in children. *Pediatrics.* 2000;106:e61.
- Givon-Lavi N, Fraser D, Dagan R. Vaccination of day-care center attendees reduces carriage of *Streptococcus pneumoniae* among their younger siblings. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:524-32.
- Gleich S, Morad Y, Echague R, Miller JR, Kornblum J, Sampson JS, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 4 outbreak in a home for the aged: report and review of recent outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21:711-7.
- Goldman L, Ausiello D. Cecil medicina. *Pneumonia pneumocócica.* 23nd. Philadelphia: Elsevier. Cap. 311. p. 2500-5. 2009.
- Gould J, Weiser J. The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *J Infect Dis.* 2002;186:361-71.
- Gray B, Dillon HC. Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children. *Pediatr Infect Dis.* 1986;5:201-7.

- Gray BM, Converse III GM, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis.* 1980;142:923-33.
- Gray BM, Dillon HC Jr. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody to types 3,6,14 and 23 in the first two years of life. *J Infect Dis.* 1988;158:948-55.
- Gray GC, Callahan JD, Hawksworth AW, Fisher CA, Gaydos JD. Respiratory disease among US military personnel: countering emerging threats. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:379-85.
- Guzmán CA, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, et al. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 1996;20(1):119-26.
- Haas KM, Minoru H, Douglas AS, Jonathan CP, Mark DZ, Cheryl B, et al. Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity.* 2002;17:713-23.
- Hamburger M, Robertson O. Studies of the pathogenesis of experimental pneumococcus pneumonia in the dog. *J Exp Med.* 1940;72:261-74.
- Hand W, Cantey J. Antibacterial mechanisms of the lower respiratory tract. Immunoglobulin synthesis and secretion. *J Clin Investig.* 1974;53:354-62.
- Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis.* 2000;30:122-40.
- Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis.* 2000;30:100-21.

- Henriques NB, Kalin M, Ortqvist A, Akerlund T, Liljequist BO, Hedlund J, et al. Dynamics of penicillin-susceptible clones in invasive pneumococcal disease. *J Infect Dis.* 2001;184:861-9.
- Hermans PW, Sluijter M, Dejsirilert S, Lemmens N, Elzennar K, Van Veen A, et al. Molecular epidemiology of drug-resistant pneumococci: toward an international approach. *Microb Drug Resist.* 1997;3:243-51.
- Hirst R, Yesilkaya, Clitheroe E, Rutman A, Dufty N, Mitchel T, et al. Sensitivities of human monocytes and epithelial cells to pneumolysin are different. *Infect Immun.* 2002;70:1017-22.
- Holmskov U. Lung surfactant proteins (Sp-A and SP-D) in non-adaptative host defenses to infection. *J Leukoc Biol.* 1999;66,747-52.
- Hortal M, Logren M, De la Hoz F, Agudelo CI, Brandileone MC, Camou T, et al. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in six Latin American countries: 1993-1999 surveillance. *Microb Drug Resist.* 2001;7(4):391-401.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577-80.
- Igietseme J, Ananaba UGA, Bolier J, Bowers S, Moore T, Belay T, et al. Suppression of endogenous IL-10 gene expression in dendritic cells enhances antigen presentation for specific Th1 induction: potential for cellular vaccine development. *J Immunol.* 2000;164:4212-9.
- Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J Exp Med.* 1993;178:479-88.
- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*. *J Exp Med.* 1990;172:631-40.

- Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1997;185:2133-41.
- International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases. Available from: <http://www.slidesonline.com/isppd02/welcome.htm>
- Jawahar S, Moody C, Chan M, Finberg R, Geha R, Chatila T. Natural Killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol.* 1996;103:408-13.
- Jetté LP, Delage G, Ringuette L, Allard R, De Wals P, Lamothe F, et al. The Pneumococcus Study Group. Surveillance of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Infection in the Province of Quebec, Canadá, from 1996 to 1998: Serotype Distribution, Antimicrobial Suscetibility and Clinical Characteristics. *J Clin Microb.* 2001;39(2):733-7.
- Kadioglu A, Andrew PW. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends in Immun.* 2004;25:143-9.
- Kadioglu A, Neill AG, Kate G, Alison K, Tim JMitchell, Peter WA. The host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun.* 2000;68:492-501.
- Kadioglu A, William C, Joseph MC, Colin RAH, Peter WA. CD4 T lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococcus suggests a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect Immun.* (in press).
- Kalin M, Ortqvist A, Almela M, et al. Prespective study of prognostic factors in community-acquired bacteremic pneumococcal disease in 5 countries. *J Infect Dis.* 2000;182:840-7.
- Kaplan SL, Mason EO Jr, Wald ER, Kim KS, Givner LB, Bradley JS, et al. Pneumococcal mastoiditis in children. *Pediatrics.* 2000;106:695-9.

- Kertesz DA, Di Fabio JL, De Cunto Brandileone MC, Castaneda E, Echaniz-Aviles G, Heitmann I, Homma A, et al. Pneumococcal Surveillance Study Group. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization surveillance study. *Clin Infect Dis*. 1998; 26:1355-61.
- Kessler HA, Schade R, Trenholme GM, Jupa JE, Levin S. Acute pneumococcal epiglottitis in immunocompromised adults. *Scand J Infect Dis*. 1980;12:207-10.
- Khan AQ, Yi S, Zheng-Qi W, Thomas AW, Clifford MS. Endogenous pro-and anti-inflammatory cytokines differentially regulate an in vivo humoral response to *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2002;70(2):749-61.
- Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EV. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* 1996;104:321-38.
- Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis*. 1981;3:246-53.
- Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med*. 2003;349:1341-8.
- Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, et al. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:171.
- Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, Kosco-Vilbois MH. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med*. 1998;188:1895.
- Laennec R. *A treatise on the diseases of the chest and on mediate auscultation*. New York: SS Wm Wood; 1932.

- Lauw F, Branger J, Florquin S, Speelman P, Deventer SV, Akira S, et al. IL-8 improves the early antimicrobial host response to pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2002;168:372-8.
- Lawson PR, Reid KBM. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000;173:66-78.
- Le Vine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, Richardson TR, Fisher JH, Burhans M, et al. Distinct effects of surfactant protein a and D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol.* 2000;165:3934-40.
- Le Vine AM, Jeffrey AW, Kevan LH, Erika CC, Thomas RK. Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung *in vivo*. *J Immunol.* 2001;167:5868-73.
- Leemans JC, Juffermans NP, Florquin S, Van Rooijen N, Vervordeldonk MJ, Verbon A, et al. Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. *J Immunol.* 2001;166:4604.
- Leverkus M, Walczak A, McLellan H, Fries W, Terbeck G, Brocker EB, et al. Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-in-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood.* 2000;2628-31.
- Levin ASS, Teixeira LM, Sessegolo JF, Barone AA. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to antimicrobials in São Paulo, Brazil: clinical features and serotypes. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1996;38:187-92.
- Levin ASS. Fatores associados à infecção\colonização por *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(6):593-4. doi: 10.1590/S0037-86821998000600020.
- Lew D, Hausler H, Southwick F, Backer A. Sphenoid sinusitis. *Biomed Pharmacother.* 1984;38:214-6.

- Lipsitch M. Bacterial vaccines and serotype replacement: lessons from *Haemophilus influenzae* and prospects for *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:336-45.
- Lipsitch M. Measuring and interpreting associations between antibiotic use and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1044-54.
- Loda FA, Collier AM, Glezen WP, Strangert K, Clyde WA, Denny FW. Occurrence of *Diplococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of children. *J Pediatr*. 1975;87:1087-93.
- Loosli C. Pathogenesis and pathology of lobar pneumonia. *Lancet*. 1940;i:49-54.
- Lundqvist A, Nagata T, Kiessling R, Pisa P. Mature dendritic cells are protect from Fas/CD95-mediated apoptosis by up-regulation of Bcl-X(L). *Cancer Immunol Immunother*. 2002;51:139-44.
- Macfarlane JT, Finch RG, Ward MJ, Macrea AD. Hospital study of adult community-acquired pneumonia. *Lancet*. 1982;2:255-8.
- MacLennan ICM. Germinal centers. *Annual Rev of Immun*. 1994;12:117-39.
- MacLeod C, Hodges RG, Heidelberger M, Bernhard G. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med*. 1945;82:45-465.
- Madsen M, Lebenthal Y, Cheng Q, Smith B, Hostetter M. A pneumococcal protein that elicits interleukin-8 from pulmonary epithelial cells. *J Infect Dis*. 2000;181:1330-6.
- Malley R, Philipp H, Sarah CM, Michael JC, Marc L, Claudette MT, et al. Recognition of pneumolysin by Too-Like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:1966-1971.
- Mandell L. Antimicrobial resistance and treatment of community-acquired pneumonia. *Clin Chest Med*. 2005;26:57-64.

- Mandell L, Wunderink RG, Anzueto A et al. IDSA\ATS Consensus Guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2007;44(2):527-572.
- Marrack P, Kappler JW. Subversion of the immune system by pathogens. *Cell*. 1994;76:323-32.
- Marrie TJ. *Etiology of community-acquired pneumonia*. In: Marrie TJ, editor. Community-acquired Pneumonia. New York: Plenum Publishers. p. 131-41. 2001.
- Marston BJ, Plouffe JF, File TM Jr, Hackman BA, Salstrom SJ, Lipman HB, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. *Arch Intern Med*. 1997;157:1709-18.
- Martens P, Worm SW, Lundgren B, Konradsen HB, Benfield T. Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. *BMC Infect Dis*. 2004;4:21.
- Martin M, Turco JH, Zegans ME, Facklam RR, Sodha S, Elliott JA, et al. An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med*. 2003;348:1112-21.
- McLeod J, Gordon J. Production of hydrogen peroxide by bacteria. *Biochem J*. 1922;16:499-506.
- Mitchell TJ, Alexander JE, Morgan, PJ, Andrew PW. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *J Appl Bacteriol*. 1997;26:625-715.
- Mold C, Rodic-Polic B, Du Clos T. Protection from Streptococcus pneumonia in infection by C reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc gamma receptors. *J Immunol*. 2002;168:6375-81.

- Moore RA, Wiffen PJ, Lipsky BA. Are the pneumococcal polysaccharide vaccines effective? Meta Analysis of the prospective trials. *BMC Fam Pract.* 2000;1:1.
- Moroney JF, Fiore AE, Harrison LH, et al. Clinical outcomes of bacteremic pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 2001;33:797-805.
- Mulhern MG, Condon PI, O'Keefe M. Endophthalmitis after astigmatic myopic laser *in situ* keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 1997;23:948-50.
- Musher DM. How contagious are common respiratory tract infections? *N Engl J Med.* 2003;348:1256-66.
- Musher DM. Infections cause by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis.* 1992;14:801-9.
- Naktin J, DeSimone J. Lumbar vertebral osteomyelitis with mycotic abdominal aortic aneurysm caused by highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1999;37:4198-200.
- Nicoletti C, Brandileone MC, Guerra ML, Levin AS: Prevalence, serotypes, and risk factors for pneumococcal carriage among HIV-infected adults. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57(3):259-65.
- Nielsen SV, Henrichsen J. Incidence of invasive pneumococcal disease and distribution of capsular types of pneumococci in Denmark, 1989-1994. *Epidemiol Infect.* 1996;117:411-6.
- Nungester W, Jourdonais L. Mucin as an aid in the experimental production of lobar pneumonia. *J Infect Dis.* 1936;59:258-65.
- Nuorti JP, Butler JC, Farley MM, Harrison LH, McGeer A, Kolczak MS, et al. Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med.* 2000;342:681-9.

- Nuorti JP, Butler JC, Gelling L, Kool JL, Reingold AL, Vugia DJ. Epidemiologic relation between HIV and invasive pneumococcal disease in São Francisco County, California. *Ann Intern Med.* 2000;132:182-90.
- Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. *Cultura de amostras de trato respiratório inferior. Procedimentos básicos em microbiologia clínica.* 2^a ed. São Paulo: Sarvier. Cap. 16. p. 141-7. 2004.
- Osler W. On certain features in the prognosis of pneumonia. *Am J Med Sci.* 1897;113:1-10.
- Pastor P, Medley F, Murphy TV. Invasive pneumococcal disease in Dallas County, Texas: results from population-based surveillance in 1995. *Clin Infect Dis.* 1998;26:590-5.
- Paterson GK, Mitchel TJ. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology.* 2006;152:285-93.
- Pericone C, Overweg K, Hermans PMW, Weiser JN. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun.* 2000;68:3990-7.
- Pneumococcal vaccines. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 1999;74(23):177-83.
- Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR.* 1997;46 (RR8):1-24.
- Protin M, Valencia MA. Vaccination in premature infants: na issue many times forgotten. *Rev Chilena Infectol.* 2005;22(4):339-44.
- Proulx JF, Dery S, Jetté LP, Ismael J, Libman M, De Wals P. Pneumonia epidemic caused by a virulent strain of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in Nunavik, Quebec. *Canada Communicable Dis Rep.* 2002;28:129-31.

- Rake G. Pathogenesis of pneumococcus infection in mice following intranasal instillation. *J Exp Med.* 1936;63:17-37.
- Rapola S, Jantti V, Haikala R, Syrjanen R, Carlone GM, Sampson JS, et al. Natural development of antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesion A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. *J Infect Dis.* 2000;182:1146-52.
- Raz E. Organ-specific regulation of innate immunity. *Nat Immun.* 2007;8:3-4.
- Rijneveld A, Lauw F, Schultz M, Florquin S, Te Velde A, Speelman P, et al. The role of interferon-gamma in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* 2002;185:91-7.
- Rijneveld A, Van den Dobbelsteen G, Florquin S, Standiford T, Speelman P, Van Alphen L, et al. Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J Infect Dis.* 2002;185:123-6.
- Rijneveld AS, Florquin S, Branger P, Speelman P, Van Deventer, Van der Poll T. TNF-alpha compensates for the impaired host defense of IL-1 type 1 receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2001;167:5240-6.
- Robbins. *Basic pathology.* 8th ed. Philadelphia: Elsevier. 2007.
- Roberts RB. *Streptococcus pneumoniae.* In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, editors. Principles and practices of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone. p. 1142-52. 1985.
- Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barret NL, Pass M, Lexau C, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *Jama.* 2001;285:1729-35.

- Ross JJ, Saltzman CL, Carling P, Shapiro DS. Pneumococcal septic arthritis: review of 190 cases. *Clin Infect Dis*. 2003;36:319-27.
- Saenz RE, Sanders CV, Aldridge KE, Patel MM. Purulent pericarditis with associated cardiac tamponade caused by a *Streptococcus pneumoniae* strain highly resistant to penicillin, cefotaxime, and ceftriaxone. *Clin Infect Dis*. 1998;26:762-3.
- Savill J. Phagocyte recognition of apoptotic cells. *Biochem Soc Trans*. 1997;24:1065-9.
- Schenkein J a, Nahm MH, Dransfield MT. Pneumococcal vaccination for patients with COPD: current practice and future directions. *Chest*. 2008;133:767-74; prepublished online september 21, 2007; DOI 10.1378/chest.07-0996.
- Schenkein J b, Saeyoung P, Nahm MH. Pneumococcal vaccination in older adults induces antibodies with low opsonic capacity and reduced antibody potency. *Vaccine*. 2008;26(43):5521-6.
- Schito GC, Felmingham D. Suscetibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, azithromycin and telithromycin (PROTEKT 1999-2003). *Int J Antimicrob Agents*. 2005;26,479-85.
- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. *N Engl J Med*. 1997;337:970-6.
- Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, et al. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med*. 1991;325:1343-60.
- Shimada J, Yamanaka N, Hotomi M, Suzumoto M, Sakai A, Ubukata K, Mitsuda T, et al. Household transmission of *Streptococcus pneumoniae* among siblings with acute otitis media. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1851-3.
- Shorr AF. Preventing pneumonia: the role of pneumococcal and influenza vaccines. *Clin Chest Med*. 2005;26:123-34.

- Simell B, Korkelia M, Pursiainen H, Kilpi MT, Kayhty H. Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal surface adhesion a, pneumolysin, and pneumococcal surface protein a in children. *J Infect Dis.* 2001;183:887-96.
- Singer DB. Postsplenectomy sepsis. *Perspect Pediatr Pathol.* 1973;1:285-311.
- Sirotnak AP, Eppes SC, Klein JD. Tuboovarian abscess and peritonitis caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in young girls. *Clin Infect Dis.* 1996;22:993-6.
- Spellerberg B, Cundell D, Sandros J, Pearce B, Idanpaan-Heikkila I, Rosenow C, et al. Pyruvate oxidase as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1996;19:803-13.
- Spratt BG, Greenwood BM. Prevention of pneumococcal disease by vaccination: does serotype replacement matter? *Lancet.* 2000;356:1210-1.
- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995;267:1445-9.
- Subramanian D, Sandoe JA, Keer V, Wilcox MH. Rapid spread of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among high-risk hospital inpatients and the role of molecular typing in outbreak confirmation. *J Hosp Infect.* 2003;54:99-103.
- Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol.* 1997;158:4229-36.
- Takashima K, Tateda K, Matsumoto T, Iizawa Y, Nakao M, Yamagushi K. Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. *Infect Immun.* 1997;65:257-60.
- Talbot U, Paton A, Paton J. Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 1996;64:3772-7.

- Taylor SN, Sandres CV. Unusual manifestation of invasive pneumococcal infection. *Am J Med.* 1999;107:12S-27S.
- Torres JM, Cardenas O, Vasquez A, Berg DS. *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in a community hospital. *Chest.* 1998;113:387-90.
- Torzillo PJ, Hanna JN, Morey F, Gratten M, Dixon J, Erlich J. Invasive pneumococcal disease in central Australia. *Med J Aust.* 1995;162:182-6.
- Trip CS, Gately MK, Hakimi J, Ling P, Unanue ER. Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-gamma. *J Immunol.* 1994;152:1883-7.
- Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:3725-9.
- Trotman J, Hughes B, Mollison L. Invasive pneumococcal disease in central Australia. *Clin Infect Dis.* 1995;20:1553-6.
- Tuomanen E, Austrian R, Masure H. The pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med.* 1995;332:1280-4.
- Tuomanen E. Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1986;54:905-8.
- Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann Rev Immunol.* 2002;20:825.
- Van Dam JEG, Fleer A, Snippe H. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1990;58,1-47.

- Wald ER, Milmo GJ, Bowen A, Ledesma-Medina J, Salamon N, Bluestone CD. Acute maxillary sinusitis in children. *N Engl J Med.* 1981;304:749-54.
- Wald ER. Sinusitis in children. *N Engl J Med.* 1992;326:319-23.
- Wara DW. Host defense against *Streptococcus pneumoniae*: the role of the spleen. *Rev Infect Dis.* 1981;3:299-309.
- Welch WH. The micrococcus lanceolatus, with a special reference to the etiology of acute lobar pneumonia. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1892;3:125-39.
- Whitsett JA. Surfactant proteins in innate host defense of the lung. *Biol Neonate.* 2005;88:175-80.
- WHO. *WHO vaccine research and development steering committee.* Geneva: WHO; 1998.
- Wood WJ, Smith R, Watson B. Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia IV. The mechanism of phagocytosis in the absence of antibody. *J Exp Med.* 1946;84:387-401.
- Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev.* 1997;77:931-2.
- Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG. Dendritic cells interact directly with naïve B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol.* 1998;161:1313-9.
- Xu Y, Minghe M, Gregory CI, Harry WS, Jr., Michael CC, et al. Complement activation in factor D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:14577-82.
- Yoshimura A, Egil L, Robin RI, Elaine T, Roman D, Douglas G. Recognition of gram-positive bacterial cell wall components by the innate system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 1999;163,1-5.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)